



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

Résumés non techniques des projets autorisés (56)

5601. Le microbiote digestif des herbivores joue un rôle central dans la nutrition de son hôte, et influence directement sa santé et la qualité de ses productions. Les études sur le microbiote ruminal soulignent un effet important du facteur « individu », sans que la variabilité du microbiote due à la génétique de l'hôte soit analysée. L'objectif de cette étude est donc d'explorer l'influence de la génétique de la brebis laitière sur les bactéries contenues dans son rumen, et les conséquences en termes de production laitière et de santé.

Les brebis laitières support sont de race Lacaune et appartiennent à l'une des 4 lignées génétiquement extrêmes (persistance de la production laitière forte ou faible, sensibilité ou résistance aux mammites). Dans cette étude, le recours aux animaux est inéluctable. Le modèle ovin a été retenu car il présente l'intérêt d'avoir à la fois des troupeaux de grands effectifs et une sélection génétique efficace, soit des atouts indispensables pour une approche génétique efficace. L'impact du génome de la brebis sur la composition bactérienne de son microbiote ruminal sera étudié. Dans un premier temps, nous estimerons l'héritabilité des quantités relatives des bactéries présentes dans le rumen en utilisant les relations de parentés entre brebis. Les corrélations génétiques avec les caractères de qualité seront aussi estimées. Puis dans un second temps nous réaliserons une analyse d'association grâce à la connaissance des génotypes de chaque brebis dont les bactéries ruminales auront été quantifiées. Afin de constituer une base de données conséquente pour une approche génétique suffisamment précise, nous devons cumuler les prélèvements de jus de rumen sur un total de 700 brebis. De plus, l'appartenance de ces brebis à des lignées divergentes permettra de tester l'impact des sélections (sur le comptage de cellules somatiques et sur la persistance laitière) sur les caractéristiques bactériennes du microbiote ruminal. Les résultats de cette étude nous permettront enfin de déterminer s'il existe plusieurs types de métagénomes chez la brebis de race Lacaune et quelle est l'expression en termes de santé et de production laitière de chaque « métagénotype ». L'intérêt est indéniable pour l'éleveur dans la mesure où une sélection génétique sur le microbiote pourrait optimiser l'animal sur plusieurs caractères d'intérêt en même temps.

Sur 5 ans, nous prévoyons de prélever 10 mL de contenu ruminal de 700 brebis adultes à l'aide d'une sonde gastrique et d'une pompe à vide. Pour limiter au maximum les facteurs de variation alimentaire, les prélèvements auront lieu, avant la mise à l'herbe et le lendemain d'un contrôle laitier. Les animaux ne seront prélevés qu'une seule fois au cours de leur vie. L'ARN extrait du jus de rumen sera séquencé, et nous obtiendrons la quantification relative des différentes bactéries présentes dans le rumen (les champignons et les protozoaires ne seront pas quantifiés). L'analyse de l'échantillon de lait de chaque brebis prélevé lors du contrôle permettra de connaître la qualité du lait, c'est à dire les taux de butyreux et protéique, le comptage de cellules somatiques et une prédiction des quantités d'acides gras du lait grâce aux spectres MIR (moyen Infra-Rouge). Par ailleurs, une prise de sang aura été effectuée pour chaque brebis et le génotype de leur ADN réalisé à l'aide d'une puce composée de 54 000 marqueurs SNP.

Les prélèvements seront réalisés par du personnel qualifié à l'aide d'une cage de contention adaptée aux ovins adultes et à laquelle les brebis sont habituées. Après le prélèvement, les brebis poursuivront leur carrière normale d'animaux d'élevage : elles seront logées dans une bergerie identique à un élevage conventionnel, sur des aires paillées et recevront une ration complète à base d'ensilage d'herbe et de foin.

5602. Les virus Influenza A sont responsables d'infections dans de nombreuses espèces animales, dont l'homme. Les virus influenza A causent chez l'homme une affection respiratoire aiguë accompagnée de signes généraux, appelée grippe. La gravité de l'infection dépend du statut immunitaire de l'hôte infecté. Ainsi les symptômes sont plus sévères et la mortalité est plus élevée chez les personnes immunodéprimées. Par conséquent les personnes âgées sont les principales victimes de la grippe due aux virus dits saisonniers, qui sont ceux qui circulent habituellement en hiver dans l'hémisphère nord et l'autre moitié de l'année dans l'hémisphère sud. Le rôle du statut immunitaire est également illustré par la nécessité de mettre à jour les vaccins de façon périodique pour faire face à la dérive antigénique des virus qui accumulent des mutations dans leur génome, permettant d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Enfin, l'introduction d'un nouveau virus contre lequel la population humaine n'est pas immunisée est responsable d'infections plus graves, associées à une mortalité plus forte dans la population générale et également à une diffusion géographique mondiale. On parle alors de pandémie.

La vaccination ne suffit pas à protéger la population lorsqu'il existe une discordance entre les souches vaccinales et les souches circulantes. Il existe des molécules antivirales ciblant l'activité enzymatique de la neuraminidase virale, malheureusement la capacité évolutive intrinsèque des virus Influenza A conduit rapidement à l'apparition de mutants résistants à ces antiviraux. Il convient donc de réaliser des recherches pour identifier des traitements complémentaires.

La morbidité et la mortalité associée à l'infection par les virus Influenza sont en grande partie dues à des mécanismes immunopathologiques, au cours desquels une réponse immunitaire inadaptée ou excessive contre le virus entraîne des dégâts tissulaires importants. La molécule metformine récemment identifiée comme un modulateur de la réponse immunitaire innée pourrait

être bénéfique au cours d'infections par le virus Influenza en entraînant une réduction de l'inflammation. Le but de ce projet est de déterminer si le traitement de souris à la metformine est bénéfique au cours d'infections par des virus Influenza.

Nous allons tester l'effet antiviral de la molécule metformine contre deux virus et nous allons utiliser deux lots de 79 animaux, soit au total 158 animaux.

Ce projet respecte la règle des 3 R :

- Remplacer : il n'existe aucune méthode alternative permettant d'évaluer les effets bénéfiques d'une molécule luttant contre des phénomènes immunopathologiques. Le recours aux animaux est donc indispensable.

- Réduire : nous avons calculé le nombre d'animaux de façon à obtenir des données statistiquement fiables avec le moins d'animaux possible.

- Raffiner : les animaux sont hébergés selon les normes décrites dans le Décret no 2013-118 du 1er février 2013 et la Directive 2010 63 UE. Afin de minimiser l'angoisse que pourrait éprouver les souris, celles-ci seront manipulées uniquement sous une hotte prévue à cet effet par du personnel qualifié et les expériences commencées qu'après une période d'acclimatation d'un minimum de cinq jours.

5603. L'ostéoporose est caractérisée par une perte osseuse pouvant être sévère et très invalidante due à une différenciation augmentée des ostéoclastes, cellules responsables de la résorption osseuse. Des études très récentes ont démontré l'existence de 2 populations d'ostéoclastes, les ostéoclastes immunosuppresseurs permettant le remodelage osseux physiologique, et les ostéoclastes inflammatoires responsables de la destruction osseuse pathologique. Comprendre les mécanismes qui contrôlent la différenciation de ces 2 types d'ostéoclastes est donc essentiel pour pouvoir limiter celle des ostéoclastes inflammatoires pathogéniques, sans affecter celle des ostéoclastes immunosuppresseurs. Le microbiote intestinal a été récemment impliqué dans le contrôle de la différenciation des ostéoclastes dans le contexte de la perte osseuse liée à l'ostéoporose post-ménopausique. Cela suggère son implication plus spécifique dans l'émergence des ostéoclastes inflammatoires mais qui reste à démontrer.

Notre but est donc de confirmer le lien entre modification du microbiote intestinal, réaction inflammatoire et émergence des différents types d'ostéoclastes et de vérifier si en modifiant le microbiote intestinal par traitement antibiotique ou probiotique, il est possible de limiter la différenciation des ostéoclastes inflammatoires versus celle des ostéoclastes immunosuppresseurs. Ce projet aura donc des retombées importantes pour les maladies inflammatoires et pour le traitement de la perte osseuse qui leur est associée. Il n'existe pas de lignées cellulaires présentant les caractéristiques qui nous intéressent (ostéoclastes inflammatoires et immunosuppresseurs). De plus, étant donnée la complexité des mécanismes impliqués, aborder ce problème par des analyses *in vitro* n'est pas suffisant et le recours à des modèles animaux reste indispensable pour comprendre les mécanismes impliqués dans le lien entre microbiote, inflammation et ostéoclastes inflammatoires. Les interventions réalisées chez les souris auront pour but l'analyse de la modification du microbiote sur la différenciation des ostéoclastes inflammatoires dans le contexte de l'ostéoporose post-ménopausique. Il fera donc appel au modèle extrêmement bien caractérisé et largement utilisé de la souris ovariectomisée qui reproduit les signes cliniques de la ménopause chez la femme.

Le nombre d'animaux a été calculé au plus juste en fonction du nombre de cellules nécessaires aux différentes analyses et de l'évaluation statistique (risque <5%), en tenant compte de pertes éventuelles afin de ne pas avoir à répéter inutilement les procédures. Chaque animal inclus dans l'analyse est utilisé de façon optimale pour permettre l'analyse simultanée d'un maximum de paramètres et réduire encore le nombre d'animaux. Nous ne produisons ni ne commandons plus d'animaux que ceux nécessaires à chaque expérience. Au total, nous utiliserons au maximum 2592 souris pour l'expérimentation. Les animaux en expérimentation sont suivis quotidiennement selon la grille de score. Des points limites bien définis seront utilisés pour limiter leur souffrance et la variabilité statistique. Tout cela nous permet de respecter au mieux la règle des 3R en limitant au maximum le nombre d'animaux.

5604. Les infections sévères (sepsis) sont un problème de santé publique majeur avec une morbidité (séquelles après une maladie) et une mortalité importante. L'apparition d'une dysfonction cardiaque et circulatoire, avec hypotension artérielle, est fréquente. Le sepsis entraîne plusieurs phénomènes dont une dilatation excessive des vaisseaux, une altération des petits vaisseaux de l'organisme et du cœur ; les organes sont alors moins bien perfusés et fonctionnent moins bien ce qui peut aboutir au décès.

Notre objectif est de tester des anticorps dirigés contre une enzyme, et susceptibles de réduire le mauvais fonctionnement du cœur et de la circulation au cours du sepsis. Cette enzyme agit sur le contrôle de la pression artérielle, la dilation des vaisseaux et la fonction cardiaque. Ces anticorps pourraient ainsi améliorer la perfusion et le fonctionnement des organes lors du sepsis et potentiellement diminuer la mortalité.

L'objectif est d'analyser les effets fonctionnels de ces anticorps sur le cœur et la circulation lors d'infections sévères telles qu'un modèle d'infection abdominale (péritonite) murin. Les infections sévères reposent sur une interaction complexe entre différents organes. L'étude de ces derniers ne peut pas être remplacée par un modèle expérimental *in vitro* qui ne refléterait pas ces interactions. Le projet utilisera au total 245 à 303 animaux (rats et souris). Les groupes expérimentaux ont été conçus de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, les groupes contrôles permettront de tester en parallèle 2 anticorps pour réduire le nombre d'animaux. Quand cela est possible, les animaux seront leurs propres contrôles pour un suivi au cours du temps, ceci afin de réduire leur nombre. Le raffinement portera sur l'anesthésie pour les procédures chirurgicales, la prévention de la douleur à l'aide de protocoles déjà validés.

Si les effets bénéfiques sont confirmés, nous pourrions envisager l'utilisation de ces molécules chez l'Homme comme traitement des infections sévères afin de diminuer leur mortalité.

5605. Les cancers du côlon (CRC) sont un problème majeur de santé dans les pays occidentaux. Malgré les progrès réalisés ces dernières années, la réponse au traitement reste décevante, avec un taux de survie à 5 ans ne dépassant pas les 50%. Un des objectifs du laboratoire est de mieux comprendre les processus de tumorigenèse, de progression tumorale et de résistance aux thérapies dans plusieurs types de cancers parmi lesquels les CRC. Ce projet particulier a pour but d'étudier le rôle d'une protéine nucléaire dans le développement de tumeurs intestinales chez la souris.

Cette protéine nucléaire est présente dans toutes les cellules, chez les vertébrés et les plantes. Elle a été formellement impliquée dans de nombreux processus cellulaires normaux se déroulant dans différents compartiments cellulaires et dans de nombreuses situations pathologiques. De plus, de multiples liens existent entre cette protéine et l'initiation et la progression des cancers. Plusieurs études montrent que son gène peut être considéré comme un proto-oncogène (c'est-à-dire, un gène pouvant favoriser la survenue et le développement de cancers) car il agit en synergie avec d'autres oncogènes dans le processus tumoral. Il a été montré qu'elle est importante pour la réparation de l'ADN, mécanisme clé des processus oncogéniques. De plus, elle joue un rôle dans la croissance tumorale et l'angiogenèse. Cette protéine est une cible thérapeutique prometteuse visée par deux classes de drogues en cours d'évaluation dans des essais cliniques: des aptamères nucléotidiques et des pseudos peptides.

Malgré d'importants efforts de recherche à travers le monde, la nature précise des mécanismes impliquant cette protéine restent mal comprise. De plus, la majorité des connaissances ont été acquises dans des modèles cellulaires en culture qui ne rendent pas compte de la complexité des pathologies. Cela nous conduit à utiliser un modèle murin d'inactivation du gène pour caractériser *in vivo* l'importance de cette protéine dans les cancers. La souris est le modèle de choix : d'une part la protéine d'intérêt y est très conservée (>90 % d'identité), d'autre part l'inactivation de gènes chez la souris est relativement aisée et commune pour mieux en appréhender les nombreuses fonctions du gène cible. Enfin, le modèle animal rassemble tous les acteurs physio-pathologiques impliqués dans la tumorigenèse (tissus sains, cellules tumorales, systèmes immunitaire et hormonal, etc.) que l'on ne peut pas avoir en culture.

Le présent projet s'inscrit dans la suite logique. Etant donné le rôle globalement pro-tumoral du gène étudié, nous allons réaliser l'inactivation de ce gène chez des souris qui développent spontanément des tumeurs de l'intestin. Ces souris constituent un modèle classique de cancérogenèse de l'intestin, très utilisé pour la recherche. En ciblant l'inactivation du gène dans l'intestin, nous devrions assister à un retard d'apparition des lésions et/ou une progression ralentie.

La durée du projet est prévue sur 5 ans avec l'utilisation de 422 souris au maximum, ce qui garantira une bonne robustesse statistique des résultats tout en limitant au maximum l'utilisation des animaux. Les expériences sont conçues pour pouvoir tirer un maximum d'informations de chaque animal. En pratique, nous allons d'abord créer une lignée de souris génétiquement modifiées dans le but d'inactiver le gène cible dans les cellules épithéliales de l'intestin, en partant de la lignée invalidée conditionnellement que nous avons déjà créée. Nous vérifierons que cette nouvelle lignée ne présente pas de problèmes particuliers depuis leur naissance jusqu'à leur âge adulte. Si tel est le cas, nous créerons grâce à des croisements successifs la lignée, et les contrôles *ad hoc*, qui développera les tumeurs tout en inactivant le gène cible. Nous les suivrons au cours du temps avec une surveillance particulière pendant la période critique de l'apparition des tumeurs (6 à 8 mois).

Durant cette période, des souris seront analysées à différents temps pour suivre la progression tumorale dans l'intestin. Nous caractériserons les effets de l'inactivation du gène d'intérêt au niveau moléculaire (en mesurant en particulier l'expression des autres gènes par des analyses dites de transcriptomiques à haut débit, l'apparition de marqueurs tumoraux...), au niveau cellulaire et histologique, (en analysant la cyto-architecture), et au niveau de l'animal, par imagerie et examen cliniques.

Tout au long du projet, les souris seront élevées dans des conditions favorables à leur bien-être, dans des cages de taille appropriée, avec une alimentation contrôlée. Elles bénéficieront d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié. Des mesures appropriées seront prises pour éviter la souffrance des animaux.

A terme, ce projet apportera des connaissances nouvelles fondamentales, nécessaires pour la compréhension du rôle de cette protéine dans les processus tumoraux, et pour le développement et la bonne utilisation des tests et traitements en cours de mise en place.

5606. L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une affection grave, caractérisée par une élévation des résistances artérielles pulmonaires, faisant obstacle à l'éjection du ventricule droit et compromettant le débit cardiaque. Plusieurs anomalies fonctionnelles et structurales de la paroi vasculaire pulmonaire participent au développement de l'HTAP incluant : prolifération des cellules musculaires lisses avec hypertrophie vasculaire, une accumulation de matrice extracellulaire, une raréfaction vasculaire avec réduction de la densité capillaire périphérique. Des situations cliniques très diverses peuvent conduire au développement d'une HTAP: sujets résidant en altitude, maladies respiratoires hypoxémiantes, maladies cardiaques congénitales ou acquises, maladies vasculaires, formes primitives d'HTAP ou persistante du nouveau-né. Outre la transplantation pulmonaire dont les résultats restent insatisfaisants, il n'existe actuellement aucun traitement disponible de l'HTAP dans ses formes graves. Il est donc essentiel de pouvoir définir de nouvelles stratégies thérapeutiques dans l'HTAP.

L'objectif général de ce projet est d'étudier l'implication de la protéine Angiopoïétine like 4 (ANGPTL4) dans le développement de l'HTAP par l'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés et évaluer les effets d'une modification de la fonction d'ANGPTL4 sur la prolifération des cellules vasculaire de souris. ANGPTL4 est en effet impliqué dans la formation de nouveaux vaisseaux et pourrait donc être une cible thérapeutique intéressante.

Tout au long de l'étude *in vivo*, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal. Dans cette étude, nous ne pouvons pas remplacer les animaux, mais avons tout mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux (10 par groupe), pour éviter la répétition, et l'hébergement et la mise en place de l'hypoxie font l'objet d'un raffinement permettant de réduire le stress des animaux. Le nombre de souris utilisés dans cette étude est de 60, la durée du projet sera de 2 ans. Avant toute expérimentation, un protocole expérimental sera soigneusement rédigé avec des points limites et transmis aux personnels techniques.

Les animaux seront suivis quotidiennement afin de respecter leur bien-être.

5607. La sclérose en plaques est une maladie inflammatoire chronique affectant le système nerveux central et débutant dans la grande majorité des cas chez l'adulte jeune. Ses causes restent encore mal connues. Les troubles neurologiques qui l'accompagnent touchent diverses fonctions comme la motricité, la sensibilité ou la vision. Ils sont la conséquence d'une perte des gaines de myéline entourant les fibres nerveuses du cerveau et de la moelle épinière. Les épisodes de démyélinisation peuvent régresser sur le plan clinique, ce qui reflète une réparation des gaines de myéline. Mais pour des raisons méconnues, cette capacité de régénération de la myéline peut être très variable. Les traitements actuellement disponibles permettent de réduire la fréquence des épisodes de démyélinisation, mais aucun traitement n'est pour l'instant disponible pour accroître la réparation de la myéline.

Nous venons de montrer que deux voies de signalisation pourraient être intéressantes pour promouvoir cette réparation. Des molécules chimiques capables de moduler l'activité de ces voies sont disponibles et leur utilisation chez l'animal a précédemment été rapportée dans d'autres contextes pathologiques. Nous avons montré que certaines de ces molécules utilisées seules ou en association permettent de favoriser la production de la myéline dans des modèles de cultures cellulaires. Il est maintenant indispensable d'étudier l'effet de ces molécules dans différents modèles animaux de sclérose en plaques et de déterminer si ces molécules pourraient être une option thérapeutique intéressante. Nous utiliserons trois modèles réalisés chez la souris qui miment la démyélinisation de la matière blanche ou de la matière grise du cerveau ou une démyélinisation de la moelle épinière. Ces modèles reflètent les diverses formes que peut prendre la pathologie chez l'Homme. Ils sont utilisés depuis des années dans de nombreux laboratoires à travers le monde et ont permis d'identifier les molécules chimiques qui sont à l'heure actuelle utilisées pour traiter les patients. Les souris recevront d'abord les molécules qui induisent la démyélinisation, puis les molécules à tester. Le test des molécules dans des cultures de cellules ne peut se substituer au test chez l'animal qui est bien sûr requis avant de pouvoir envisager une application thérapeutique chez l'Homme. Cependant, nous réduisons au maximum le nombre d'animaux utilisés en regroupant toutes les analyses histologiques que nous devons réaliser afin d'obtenir un maximum de résultats sur chaque animal. Sur la totalité des 4 années, 336 animaux permettront de réaliser le projet. De plus, nous raffinons au mieux les modèles notamment en utilisant des protocoles qui ont été préalablement optimisés et qui permettent d'induire des démyélinisations très reproductibles évitant d'avoir à augmenter le nombre d'animaux et ne produisant pas de trouble de la motricité ou alternativement un trouble modéré et temporaire, mais toutefois suffisant pour pouvoir conclure sur l'effet des molécules à tester. Par ailleurs, les animaux sont placés sous surveillance étroite de leur poids et de leur comportement. Ils sont hébergés par groupes de 5 dans un environnement enrichi.

5608. Les Bactéries sont dites résistantes ou MultiRésistantes aux antibiotiques (BMR) lorsque, du fait de l'accumulation de résistance naturelle ou acquises, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique. La multirésistance concerne des bactéries communautaires et certaines bactéries responsables des infections nosocomiales qui surviennent dans le milieu hospitalier. Les germes le plus souvent impliqués sont : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (ENP\*, 2012).

L'augmentation des BMR est un problème de santé publique. La situation en France et dans le monde reste problématique. Pour cela, des plans stratégiques ont été élaborés (Ministère de la santé, Organisation Mondiale de la Santé) afin d'optimiser et coordonner les différentes actions pour lutter contre ce fléau (réseaux de surveillance, mesures d'hygiène, utilisation rationnelle des antibiotiques...).

La recherche fondamentale en microbiologie, en particulier l'étude des mécanismes de résistances (génomique, protéinique) a permis d'identifier des gènes ou des protéines cibles qui pourraient être bloqués favorisant ainsi l'action des antibiotiques: c'est des composés antivirulence. D'autre part, le développement de la nanobiotechnologie (nanoformulation, nanoparticules) tente d'optimiser l'acheminement ciblé des antibiotiques ainsi que leur efficacité permettant ainsi de livrer et concentrer les molécules antimicrobiennes au niveau du site de l'infection. Cette approche est très importante pour réduire l'antibiorésistance. Elle permettra d'optimiser le traitement (diminution des quantités) réduisant ainsi le risque d'apparition de résistance. Elle permettra également l'utilisation des antibiotiques qui ont prouvé leur efficacité *in vitro* mais qui ont une faible biodisponibilité *in vivo*.

L'objectif de notre étude est de mettre au point et valider des modèles murins infectés par des souches cliniques multi-résistantes de *Staphylococcus aureus* et ceci dans le but d'étudier l'efficacité de plusieurs nano-formulations d'antibiotiques associées ou non à des produits capables de bloquer spécifiquement l'expression de certains gènes notamment ceux impliqués dans le développement de la résistance.

Nous utiliserons des souris neutropéniques (caractérisé par un taux bas de granulocytes (ou polynucléaires) neutrophiles dans le sang). Elles offrent des modèles précliniques intéressants car ils permettent de mimer les conditions d'infection chez l'Homme. Elles permettent ainsi d'étudier les différents aspects évolutifs de l'infection : contamination, virulence, dissémination et traitement. Un maximum de 2130 souris sera utilisé sur 5 ans, ce nombre pourrait être inférieur et ceci en fonction des tests d'efficacité des composés candidats.

Pour réduire le nombre de souris, seuls les candidats ayant démontré une activité et une faible toxicité *in vitro* seront testés. Nous avons déterminé aussi en collaboration avec les biostatisticiens le nombre minimal d'animaux à utiliser pour pouvoir appliquer des tests statistiques pour petits échantillons (test de Kruskal et Wallis, ANOVA...).

Par ailleurs, nous allons utiliser des souches bioluminescentes ce qui permettra un suivi quotidien (non invasif) de l'infection à travers l'utilisation des systèmes d'imagerie du petit animal. Enfin, afin de prendre en compte la souffrance des animaux, un suivi clinique sera mis en place basé sur des observations quotidiennes des souris.

\* Enquête Nationale de Prévalence (ENP) des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012

5609. L'intoxication aiguë à l'alcool de type "Binge Drinking" est un problème majeur de santé publique. Ces habitudes d'intoxication sont en forte progression chez les jeunes adultes en Europe et partout dans le monde. Cette pratique consiste à ingérer de grandes quantités d'alcool sur une courte période de temps dans le but d'atteindre un état d'ivresse lié à une augmentation aiguë de l'éthanol dans le sang. Contrairement à la consommation chronique d'alcool, les effets de l'intoxication aiguë sur le foie sont peu caractérisés. Par ailleurs, les études scientifiques de l'alcoolisation aiguë sont basées sur des analyses moléculaires suite à un ou plusieurs gavages gastriques d'éthanol à très court terme chez les rongeurs, et montrent l'implication de mécanismes moléculaires différentiels de l'alcoolisation aiguë et chronique sur la fonction hépatique. De plus, la pratique de "Binge Drinking" semble favoriser une évolution de la stéatose vers des formes sévères de la maladie alcoolique du foie chez les alcooliques chroniques. Dans ce contexte, la mise en place de modèles précliniques est nécessaire pour une meilleure compréhension des conséquences à long terme d'intoxications alcooliques répétées mimant la pratique réelle du "Binge Drinking" dans notre société. Nous proposons aujourd'hui une étude longitudinale caractérisant l'impact à long terme de l'hyperalcoolisation répétée sur l'évolution de la pathologie du foie chez la souris (mâles et femelles). Afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre la maladie alcoolique du foie, cette étude vise en parallèle à évaluer le potentiel d'une supplémentation alimentaire permettant de limiter les dégâts hépatiques. Nous proposons de coupler cette étude à l'utilisation d'outils d'imagerie non-invasifs de mesure d'élasticité (élastographie par ondes de cisaillement). Initialement validée pour l'évaluation de la fibrose dans l'hépatite chronique virale, cette technique a été validée pour la détection de l'hépatite et de classification du degré de fibrose dans un contexte de maladie hépatique métabolique non alcoolique chez le rat. Cependant, la performance de cette technique n'a pas été validée quant à la détection des différents stades de la maladie hépatique alcoolique. La mise au point des protocoles d'imagerie dans ce nouveau modèle de "Binge Drinking" permettrait dans l'avenir d'utiliser le moins de souris possible évitant des sacrifices séquentiels de souris. Pour la totalité de l'étude 125 souris C57Bl/6 âgées de 20 semaines seront utilisées et suivies par élastographie. Cette méthode d'examen est pratiquée sous anesthésie gazeuse et est donc sans souffrance ni stress pour l'animal. Avec le contrôle d'analyses histologiques et moléculaires chez des souris sacrifiées à différents stades de cette étude, nous visons à valider le potentiel et la précision de l'élastographie *in vivo* dans le contexte de la maladie alcoolique chez la souris. La procédure de gavage fait l'objet d'une prise en charge spécifique incluant une heure précise et une surveillance sur 4 heures pour éviter tout effet adverse.

5610. Quand l'organisme rencontre un microbe, il met en place une réponse pour se défendre : la réponse immunitaire. Cette réponse fait rentrer en jeu des cellules spécialisées, les lymphocytes, qui vont se multiplier et combattre le pathogène. Parmi les lymphocytes, il y a des lymphocytes tueurs qui vont combattre directement le pathogène, et qui ont besoin de recevoir des signaux d'aide de lymphocytes coordinateurs.

Dans certaines maladies telles que des infections virales, il arrive que les signaux d'aide soient absents. Dans ces conditions les lymphocytes tueurs vont éliminer le pathogène une première fois mais ne seront pas capables de le combattre à nouveau s'il y a une réinfection : on parle alors de "mémoire immunitaire" défaillante.

Le but de notre projet est de travailler sur ces mécanismes d'aide, indispensables à une bonne mémoire immunitaire. Nous voulons mieux connaître les cellules impliquées dans ces mécanismes.

Nous allons donc utiliser le modèle animal de la souris. Le système immunitaire de la souris est très proche de celui de l'homme. Nous utiliserons des souches de souris transgéniques, dans lesquelles nous pouvons supprimer de manière ciblée les lymphocytes dont nous souhaitons étudier le rôle.

Les lymphocytes tueurs "naïfs", c'est-à-dire qui n'ont jamais rencontré leur antigène, sont très rares et très difficilement détectables dans l'organisme. Pour faciliter la détection, les souris recevront une injection de lymphocytes tueurs spécifiques d'un antigène bactérien et seront ensuite infectées par la bactérie. Cette technique va nous permettre d'avoir une réponse immunitaire détectable très précocement.

L'intérêt de ce projet est de comprendre les anomalies du système immunitaire que l'on observe lors d'infections virales (Sida, hépatite) ou de cancers. Dans ces maladies, les lymphocytes tueurs ne jouent pas leur rôle d'élimination du virus, de la bactérie ou de la cellule cancéreuse. Le plus souvent il s'agit d'une anomalie des signaux d'aide. Comprendre précisément quels signaux interviennent, à quel moment, pourra dans le futur permettre de développer des médicaments ciblant très précisément les bonnes cellules et les bonnes molécules, afin de rétablir le contrôle des microbes ou des cellules cancéreuses.

Dans ce projet nous avons absolument besoin de réaliser des expériences dans un modèle animal : en effet la réponse immunitaire est un phénomène complexe qui implique plusieurs cellules, dans des environnements biologiques et anatomiques bien définis, et des phénomènes de migration et d'interaction. Il est impossible de reproduire *in vitro* l'ensemble de ce phénomène. C'est pourquoi l'utilisation d'un organisme vivant est requise.

Pour ce projet nous avons besoin de souris donneuses de lymphocytes tueurs. Les lymphocytes tueurs seront ensuite injectés à d'autres souris dites "receveuses", chez qui la réponse immunitaire sera étudiée après infection par la bactérie. Nous avons évalué le nombre de souris qui recevront cette injection à 490.

La majorité du projet est réalisée chez des souris C57BL/6/J WT. Afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés, nous omettrons les analyses cinétiques du phénotype chez les souches transgéniques, et ne réaliserons dans ces souches de souris que les expériences clés (analyse de l'efficacité des lymphocytes tueurs au jour 4 post-infection, et au jour 4 après ré-infection au stade mémoire). Un calcul de puissance a été réalisé afin de déterminer le nombre d'animaux nécessaire à ce projet.

Afin de limiter le stress des souris, elles sont manipulées par petits groupes de 5 individus au maximum. Le milieu est enrichi par l'ajout de cabanes dans les cages. En plus de la sciure, les souris disposent de lamelles de papier découpé afin de se faire des nids et

des cachettes. La procédure d'injection est réalisée sur des animaux anesthésiés par isoflurane, gaz anesthésique qui permet une anesthésie transitoire et rapide.

5611. La santé cérébrale, capacités cognitives incluses, a 2 composantes majeures : la neuroplasticité (aptitude du cerveau à remodeler ses circuits neuronaux) et le débit sanguin cérébral (DSC). Ces 2 composantes sont influencées par le risque cardiovasculaire (risque à l'origine d'une mort prématurée, secondaire à la formation de plaques d'athérome) et plus précisément par la fonction endothéliale. La fonction endothéliale peut se définir comme la capacité des cellules endothéliales (cellules les plus internes des vaisseaux et en contact direct avec le sang) à exercer un effet vasodilatateur et anti-athéromateux. Plus récemment, il a été suggéré que les cellules endothéliales formant les capillaires sanguins du cerveau pourraient contrôler le fonctionnement des neurones. Ainsi, les situations associées à une dysfonction endothéliale (hypertension, diabète, obésité, polyarthrite rhumatoïde, sédentarité, etc...) s'accompagnent de moindres performances cognitives ou d'une accélération du déclin cognitif associé à l'âge. En revanche, l'exercice physique qui augmente la fonction endothéliale est l'un des meilleurs stimulants de la cognition. Nous avons récemment découvert que l'endothélium des vaisseaux cérébraux exprimait en abondance le BDNF (brain-derived neurotrophic factor), une protéine que l'on croyait jusque-là présente uniquement dans les neurones. Alors que le BDNF synthétisé par les neurones est un acteur clé dans l'induction et le maintien de la neuroplasticité, tout reste à découvrir sur le rôle du BDNF synthétisé par l'endothélium. Notre projet vise à tester l'hypothèse selon laquelle les capacités cognitives sont influencées par le BDNF exprimé par l'endothélium cérébral. Sa conduite nécessite la réalisation d'expériences sur des modèles animaux. Nous utiliserons 2 procédures pour moduler l'expression endothéliale du BDNF : l'exercice physique (augmentation) et l'arthrite (diminution). En effet, il nous est impossible de REMPLACER les modèles animaux puisque les interactions cellules endothéliales/neurones, provoquées par le flux sanguin, ne peuvent pas être mimées par des modèles *in silico* ou culture de cellules. Nous explorerons également l'impact des modifications de l'expression endothéliale du BDNF sur les taux de BDNF mesurés dans le cerveau (dont les cellules sont les neurones, les cellules gliales et les cellules endothéliales). Le projet est en continuité avec les travaux antérieurs du laboratoire. Ainsi, les procédures proposées, les souches d'animaux ainsi que leur âge, leur nombre par lot et par groupe sont appropriées à la validation/invalidation de notre hypothèse. Le nombre d'animaux par groupe est compris entre 10 et 20, un compromis entre l'obtention d'une analyse statistique fiable et la REDUCTION du nombre d'animaux à mettre à mort. Ce nombre inclut les animaux dédiés à la réalisation du projet (1625 rats) et les animaux destinés à la formation initiale et continue des chercheurs (165 rats). Nous prévoyons d'utiliser entre 300 et 400 rats par an. Le projet prévoit - pour une période de 5 ans - 1790 rats (nombre maximal). Il n'y a pas de redondance dans les procédures proposées qui sont par ailleurs parfaitement maîtrisées par le personnel statutaire du laboratoire, évitant ainsi la multiplication des animaux à utiliser ainsi que leur souffrance potentielle qu'elle soit physique ou psychologique, répondant ainsi au principe de RAFFINEMENT. Les rats, selon leur poids, seront hébergés au nombre de 4 ou 5 par cage (42 x 43 cm) afin de maintenir une interaction sociale. Pendant les procédures, les animaux restent hébergés avec les mêmes congénères évitant ainsi de rompre la hiérarchie mise en place par les rats. Pour les procédures s'étalant sur plusieurs jours, les animaux font l'objet d'une surveillance quotidienne.

5612. La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) est une affection regroupant différentes pathologies du foie allant de la simple stéatose, caractérisée par une accumulation de lipides neutres (>5% des hépatocytes sont atteints à l'histologie) à la stéato-hépatite non alcoolique (NASH), où s'ajoutent une inflammation ainsi que des lésions hépatiques. En l'absence de toute intervention préventive ou curative de la stéatose, un faible pourcentage de patients atteints de NASH évolue vers la cirrhose, voire en carcinome hépatocellulaire.

Cause numéro une des maladies hépatiques dans les pays occidentaux, la NAFLD est considérée comme la représentation hépatique du syndrome métabolique et est étroitement liée à l'insulinorésistance, la dyslipidémie et l'obésité viscérale. De récentes études indiquent que le stress oxydant (SO) est le mécanisme principal impliqué dans la progression des NAFLD/NASH, il serait donc intéressant d'élaborer de nouvelles stratégies antioxydantes pour lutter contre ces affections hépatiques.

Lors d'une étude préliminaire, nous avons mis en évidence que le hamster nourri avec un régime hyperlipidique développe, au bout de 2 semaines, une accumulation hépatique de triacylglycérols et de cholestérol, réversible par un traitement avec de l'extrait liquide de spiruline. Cette dernière est une microalgue riche notamment en phycocyanine, une molécule antioxydante. Cette amélioration du métabolisme hépatique des lipides est accompagnée d'un renforcement des défenses antioxydantes.

Dans le présent projet, notre objectif est tout d'abord de rechercher la dose optimale de l'extrait liquide de spiruline permettant de prévenir les différents stades histologiques de la pathologie allant de la simple accumulation hépatique de lipides (triacylglycérols et cholestérol) jusqu'à la stéato-hépatite, voire au développement d'une cirrhose. Puis, nous investiguerons les mécanismes potentiels sous-jacents (SO, fonction mitochondriale, inflammation, fibrogenèse, métabolisme lipidique et glucidique). Ce projet sera réalisé chez la souris C57BL/6 nourrie en régime hyperlipidique supplémenté en fructose dans l'eau de boisson. 200 souris seront au total nécessaires pour ce projet.

La règle des 3 R sera respectée :

Remplacement : Seule une étude *in vivo*, c'est-à-dire incluant la complexité des mécanismes physiologiques mis en jeu lors du développement de maladies métaboliques, peut permettre d'atteindre l'objectif de ce projet. Aucune méthode de remplacement ne peut donc être employée.

Réduction : Le nombre de souris a été réduit au minimum (n=10/groupe) pour permettre une bonne évaluation statistique d'une intervention nutritionnelle entre deux groupes indépendants sur le développement de la NAFLD/NASH (test Mann-Whitney).

Raffinement : Les animaux ne subiront que très peu de contraintes et la douleur sera minimisée. Les cages seront enrichies (papier et/ou carton), les rares prélèvements de sang seront effectués au niveau de la queue ou de la veine submandibulaire sous anesthésie

à l'isoflurane. La mise à mort sera effectuée par dislocation cervicale. Les souris seront surveillées quotidiennement. Dans le cas de toute modification physique ou comportementale, la surveillance sera accentuée et les souris seront soignées et/ou placées sous antidouleurs afin de minimiser toute souffrance, détresse ou inconfort. Les prélèvements de sang seront stoppés momentanément jusqu'au rétablissement de l'animal. Enfin, si l'animal ne parvenait pas à se rétablir, la mise à mort serait envisagée.

5613. Les techniques d'examen et d'approche endoscopiques des voies respiratoires chez le cheval se sont beaucoup développées ces dernières années, qu'elles soient à visée diagnostique ou chirurgicale. Afin de garantir la sécurité des opérateurs et des animaux, et de préserver le matériel utilisé et d'optimiser les conditions d'observation, ces techniques doivent être pratiquées en ayant recours à des protocoles de sédation/analgésie. Toutefois, ces protocoles ne sont pas établis de façon fiable et sont utilisés de manière empirique par les praticiens vétérinaires.

L'objectif de cette étude est donc de comparer l'efficacité de différents protocoles de sédation/analgésie pour l'insensibilisation du pharynx et du larynx chez des chevaux sains, afin de définir des conditions optimales d'utilisation chez l'animal malade, applicables en clinique.

Dans le cadre des 3Rs :

Remplacer : Il n'existe pas de modèle in-vitro permettant de simuler les réactions d'un cheval suite à une stimulation tactile du pharynx / larynx en fonction de différents protocoles de sédation/analgésie.

Réduire : Le nombre d'animaux est réduit à 8 chevaux afin de pouvoir réaliser une exploitation statistique des résultats.

Raffiner : Afin de réduire le stress, les animaux resteront sous surveillance étroite d'un vétérinaire, au box le temps nécessaire à la disparition des effets de la sédation, avant d'être réintégrés dans leur paddock avec leurs congénères habituels.

5614. Etudes de Toxicité et de Toxicocinétique et études supports à celles-ci chez le Chien Beagle (5 ans).

Dans le cadre du diagnostic, de la prévention et du traitement des maladies humaines et animales, la recherche de nouveaux médicaments apportant une meilleure sécurité d'emploi, une efficacité accrue ou tout autre avantage thérapeutique reste essentielle. Compte tenu de la complexité des organismes visés par cette recherche, il n'existe pas à ce jour de méthode alternative fiable au recours à l'animal. Dans un souci de protection de la santé publique, la loi exige que l'innocuité des candidats médicaments soit évaluée lors d'études précliniques chez une espèce de rongeur et une espèce non-rongeur. Ces études doivent en outre être conduites en respectant les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) qui garantissent leur qualité et intégrité. Elles sont à ce titre l'objet d'inspections réglementaires spécifiques et sont destinées à être soumises à différentes autorités réglementaires à diverses étapes du développement de médicament.

Ce projet couvre les études réglementaires de toxicologie et préliminaires ou investigatrices associées ainsi que les études de toxicocinétique réalisées chez le chien dans le cadre défini ci-dessus. Des études d'efficacité, de pharmacologie, de pharmacocinétique, d'interaction entre médicaments ou à des visées plus mécanistiques (biomarqueurs) permettant de comprendre ou prédire les effets toxiques, et de sélection de candidats médicaments/doses, sont aussi couvertes par cette demande, de même que les études visant à l'acquisition/maintien des compétences techniques, le développement des techniques/méthodes, la validation d'équipements et/ou la génération de données historiques. Le nombre total d'animaux couverts par ce projet est 1500 sur une période de 5 ans (une soixantaine d'études).

L'objectif de cette autorisation de projet est de définir les procédures opératoires mises en œuvre chez le chien dans le cadre des études précliniques de toxicologie générale/toxicocinétique pour les candidats médicaments humains et vétérinaires en vue de soumissions réglementaires internationales incluant les INDA (Investigational New Drug Applications), les CSA (Clinical Study Applications), les NDA (New Drug Applications), les WMA (World Wide Marketing Applications) et IB (Investigational Brochures). Ces études sont exigées par les réglementations nationales (par exemple en France l'Arrêté du 9 septembre 1996 NOR:TASP9624370A) et précisées dans les lignes directrices internationales (OCDE, ICH, ...).

La composition, le contenu et le déroulement des études réglementaires couvertes par ce projet sont précisées dans des lignes directrices internationales (OCDE, ICH, VICH...) afin d'obtenir les résultats les plus fiables et scientifiquement pertinents tout en garantissant les plus hauts standards en matière de qualité, bien-être animal, et d'éthique (remplacement, réduction, et raffinement).

A ce titre, celles-ci requièrent :

- des chiens des 2 sexes, dont l'âge et poids peuvent varier ;
- le nombre minimal d'animaux est dicté par les lignes directrices réglementaires internationales (OCDE notamment) ;
- une durée (de un jour à environ 12 mois, éventuellement suivis d'une période de récupération/réversibilité) ;
- et des procédures (administration du candidat médicament, observations et examens réguliers, suivi médical individuel, et examens terminaux).

Pour les études « non réglementaires », les critères ci-dessus peuvent être modulés (e.g. nombre de chiens plus faible, un sexe seulement) dans la mesure où les objectifs diffèrent.

Les études réglementaires sont réalisées séquentiellement afin d'obtenir toutes les informations scientifiques nécessaires tout en minimisant les dommages pour les animaux ; de fait, la plupart des animaux des premières études, réalisées sur la base d'informations très limitées, auront des effets légers à modérés, et un très faible nombre d'entre eux pourra avoir des effets substantiels. Dans les études suivantes, ceux-ci ne devraient avoir pas d'effets ou seulement avoir des effets légers à modérés. Des effets sporadiques, généralement légers et transitoires, peuvent aussi être observés du fait des propriétés pharmacologiques du candidat médicament.

Une attention particulière est apportée aux exigences de remplacement, réduction et raffinement tout au long des études, depuis leur conception jusqu'aux données présentées aux agences afin de conduire les essais cliniques chez l'homme. En particulier, le nombre d'animaux par groupe et le nombre de groupes sont définis par les lignes directrices internationales, les chiens sont hébergés en

groupes stables d'animaux compatibles avec des enrichissements sociaux (interaction avec les congénères, interaction avec l'homme), des enrichissements de l'environnement et des récompenses alimentaires, et l'inconfort et le stress sont limités au maximum (habituation des chiens à certaines procédures, méthode du clicker training, état de santé des animaux contrôlé quotidiennement, intervention du vétérinaire dès que nécessaire).

5615. La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est la maladie musculaire la plus fréquente chez l'enfant avec une prévalence d'environ 1 garçon sur 5 000 à la naissance. Elle est due à une mutation sur le gène *Dmd* situé sur le chromosome X qui code la protéine Dystrophine, indispensable au maintien de l'intégrité des fibres musculaires. L'absence de Dystrophine entraîne une fragilisation des muscles à chaque contraction et donc une dégénérescence musculaire progressive. La DMD se traduit dans un premier temps par une faiblesse musculaire importante des membres inférieurs, puis, la faiblesse musculaire atteint les membres supérieurs. L'atteinte du diaphragme entraîne également une défaillance respiratoire. Avec le progrès de la prise en charge multidisciplinaire, l'espérance de vie des patients s'est considérablement allongée. Cependant, l'apparition inéluctable d'une cardiomyopathie dilatée, entraînant une insuffisance cardiaque, reste responsable d'une majorité de décès des patients avant l'âge de 30/40 ans. A ce jour, la prise en charge symptomatique et préventive de la défaillance cardiaque reste insuffisante pour obtenir une stabilisation de la maladie et il n'existe aucune solution thérapeutique satisfaisante pour la prise en charge de cette atteinte dans le contexte des myopathies. Il est donc primordial de développer un traitement pour l'atteinte cardiaque chez le patient DMD.

Pour que l'évaluation pré-clinique d'une approche thérapeutique soit pertinente, il est nécessaire d'utiliser un modèle animal qui mime au plus proche le phénotype du patient. Et jusqu'à ce jour, faute de modèle animal pertinent exhibant le phénotype cardiaque DMD, la recherche pour le traitement de la DMD s'est essentiellement concentrée sur le traitement de l'atteinte des muscles squelettiques. La génération récente d'un nouveau modèle animal de la DMD, le rat DMDmdx, donne un nouvel essor pour la recherche d'un produit de thérapie génique de l'atteinte cardiaque des patients DMD. En effet, ce rat DMDmdx développe une cardiomyopathie comparable à celle observée chez le patient, contrairement aux autres modèles animaux de la DMD (chien GRMD, souris mdx). Il présente également l'avantage d'être facile et peu coûteux à élever, permettant d'inclure un nombre plus important d'animaux que dans des études réalisées chez le chien GRMD et donc d'augmenter la puissance statistique de notre étude.

La thérapie génique est une des approches prometteuses pour le traitement de cette pathologie. L'efficacité thérapeutique passe par le transfert dans les muscles (squelettiques et cardiaque), à l'aide d'un vecteur viral recombinant dérivé du virus adéno-associé (AAVr), d'un gène thérapeutique. La très grande taille du gène de la dystrophine empêche son insertion dans un vecteur AAVr (capacité maximale d'encapsulation = 4,7kb). Cependant, d'autres gènes thérapeutiques compatibles avec cette contrainte semblent prometteurs pour traiter l'atteinte cardiaque.

L'objectif de notre projet sera d'évaluer les effets de quatre produits de thérapie génique différents après administration IV (veine péniennne) sur le phénotype cardiaque du rat DMDmdx.

Lors d'une précédente étude, notre équipe a pu observer que l'atteinte cardiaque présentait un profil évolutif. En effet, on observe tout d'abord un processus d'hypertrophie du cœur associé à des dysfonctionnements de remplissage dès 2 mois suivi d'un processus de dilatation du cœur qui s'accompagne d'une dysfonction d'éjection entre 8 et 11 mois d'âge. Pour cette étude, il paraît donc pertinent d'évaluer l'efficacité des différentes stratégies thérapeutiques à deux stades d'avancement de la pathologie cardiaque. La réponse à cette question aura des conséquences potentielles sur le design des essais cliniques prévus ensuite chez l'Homme (âge d'injection des patients). Ainsi, nous avons choisi d'injecter des animaux à l'âge de 2 et 7 mois, correspondant à un stade précoce et un stade plus avancé de la maladie.

Un nombre de 120 rats sera utilisé dans cette étude. Des groupes de 10 rats DMDmdx seront injectés avec chaque vecteur (4 produits de thérapie génique) et 10 rats DMDmdx ainsi que 10 rats témoins sains (WT) recevront une solution saline, et cela à 2 et 7 mois d'âge. Les animaux des groupes expérimentaux et contrôles, seront suivis 3 mois post-injection. Des analyses exhaustives seront réalisées chez tous les animaux afin d'évaluer l'efficacité du traitement au niveau phénotypique (évaluation de la force musculaire et de la fonction cardiaque), mais aussi au niveau histologique.

Le nombre de 10 animaux par groupe est basé sur notre expérience précédente de protocoles de thérapie génique lors desquels nous avons pu obtenir des résultats cohérents et reproductibles dans des groupes de cette taille. Cela semble être un nombre minimal qui permette d'assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en termes d'animaux à inclure. Une analyse statistique sera réalisée (tests non paramétriques de type Kruskal-Wallis).

Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en places en fonction des procédures expérimentales:

- Les injections IV du vecteur (veine péniennne) seront réalisées sous anesthésie. Une prémédication analgésique sera effectuée par injection sous-cutanée de Buprénorphine (Véteergésic®) avant injection de l'anesthésique en intra péritonéale, l'Etomidate (Hypnomidate®). Les prélèvements sanguins pré-injection seront effectués à cette occasion.

- Les échocardiographies 2D seront réalisées sous anesthésie après injection intra péritonéale d'Etomidate.

- Les tests d'évaluation de la force (Grip test), seront effectués sur animal vigile.

Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu.

L'évolution de la maladie pouvant entraîner un déclin de l'état de santé (difficultés locomotrices, d'alimentation, respiratoires), l'état général de chaque animal sera surveillé de façon quotidienne par le personnel animalier pour estimer une éventuelle gêne ou douleur liées à l'expression clinique de la maladie. Ces observations seront automatiquement fournies à un vétérinaire. Un tableau de points limites sera disponible. Si nécessaire, le sacrifice de l'animal sera anticipé.

5616. Nous évaluons l'efficacité de traitements sur des rétinoblastomes, tumeurs rares de l'œil de l'enfant.

Les tumeurs de l'œil du fait de leur localisation nécessitent des développements thérapeutiques et des protocoles de traitements particuliers. Les essais précliniques dans ce domaine sont rares jusqu'ici du fait des difficultés à mettre en place les techniques d'administration et de surveillance nécessaires aux essais chez les petits rongeurs (souris). Grâce à des collaborations multidisciplinaires (du physicien au médecin), nous disposons aujourd'hui des techniques pour répondre à ce besoin.

Après une série de validations par des tests *in vitro* nous devons maintenant évaluer sur l'organisme entier l'efficacité des molécules ayant eu les meilleurs résultats aux différents tests précédents.

Les molécules testées sont de nouveaux agents potentiellement anticancéreux. Pour cela, nous utilisons des souris immunodéprimées sur lesquelles sont implantées des tumeurs soit sous la peau ou directement dans l'organe cible (œil). Ces greffes sont réalisées à partir d'une tumeur issue d'un patient atteint de cancers de l'œil (rétinoblastome). Ce modèle de tumeur oculaire généré chez la souris notamment lorsque les greffes sont faites dans l'œil permet de mimer le cancer des patients. Il est donc très utile pour tester les nouvelles molécules avant d'éventuels essais cliniques chez les patients et pour évaluer également l'efficacité et la toxicité dans l'œil de la chimiothérapie conventionnelle. Même si la plupart des enfants guérissent de leur cancer, une majorité d'entre eux se font retirer l'œil (énucléation) pour éradiquer leur cancer perdant ainsi toute acuité visuelle et subissant un traumatisme esthétique. Nous voulons donc trouver de nouveaux traitements pour pouvoir conserver au maximum les yeux des patients (éviter l'énucléation) et guérir leurs cancers.

Nous utilisons plusieurs techniques d'imageries (IRM, imagerie de l'œil) pour permettre la caractérisation de la croissance tumorale, le suivi de la molécule dans l'organisme ainsi que sa toxicité dans l'œil et son efficacité sur la tumeur. Ces techniques d'imagerie du petit animal, nous permettent d'homogénéiser les groupes constitués en s'assurant que chaque souris a bien une croissance tumorale et de réaliser un suivi dans le temps du même individu quand cela est possible. Ces techniques permettent donc de diminuer le nombre d'animaux utilisés. Au total nous utiliserons 1489 souris sur 5 ans.

En accord avec les recommandations 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.

5617. Les carcinomes du cortex surrénalien (corticosurrénales) sont des tumeurs endocrines agressives pour lesquels les traitements actuels sont peu efficaces quand elles ont atteint un stade avancé. Nous avons donc un besoin urgent de nouveaux médicaments actifs contre ces tumeurs.

Dans ce contexte, notre plateforme propose à ses partenaires une approche permettant de tester l'effet potentiellement bénéfique de leurs produits à l'aide de modèles précliniques faisant appel à des souris immunodéficientes xéno greffées avec des cellules tumorales humaines. Un de nos partenaires a démontré *in vitro* qu'une nouvelle molécule (HA15), qui a été récemment décrite pour être très active contre différents types de tumeurs (sein, pancréas, prostate, colon...), est également capable d'inhiber significativement la prolifération de cellules de corticosurrénales *in vitro* et de provoquer leur mort. C'est pourquoi, l'objectif de ce projet est d'apporter la preuve qu'HA15 offre un bénéfice thérapeutique *in vivo* dans le cadre des corticosurrénales.

Dans ce but, nous réaliserons un modèle de xéno greffe de corticosurrénales *via* transplantation par voie sous cutanée de cellules tumorales humaines H295R chez des souris immunodéprimées (nudes). Dans le respect de la règle des 3R et donc par souci de raffinement, cette phase de greffe sera réalisée sous anesthésie gazeuse (Vetflurane 3%). Après apparition des tumeurs, les souris seront réparties aléatoirement dans les différents groupes de traitements. Le volume tumoral sera alors mesuré au pied à coulisse pour évaluer la capacité de HA15 à inhiber la croissance tumorale de ce sous-type de cancer. Les résultats seront confirmés dans une seconde expérience ce qui implique que ce projet fera appel à 60 souris au total. Durant l'ensemble de ces procédures, afin de réduire le stress et d'améliorer le cadre de vie des animaux, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux, par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton), et par le maintien des animaux en groupes de 4 à 6 afin d'éviter le stress de l'isolement.

Ces études seront essentielles pour prouver l'efficacité thérapeutique de la nouvelle molécule et ouvrir la route à de nouveaux traitements cliniques pour le corticosurrénales en stade avancé.

5618. L'implication essentielle dans la régulation de la physiologie de l'hôte de l'ensemble des micro-organismes hébergés par le tractus digestif, communément appelé microbiote digestif, a été démontrée, notamment pour la digestion, le métabolisme et l'immunité. Afin d'évaluer l'implication du microbiote dans des mécanismes physiologiques de nombreuses études ont recours à l'inoculation de microbiote. Dans le cadre de la recherche de méthodes alternatives à la prise forcée d'aliment chez les palmipèdes gras, l'effet du microbiote sur l'engraissement hépatique sera évalué. Aucune méthode d'inoculation n'ayant été mise au point chez l'oie, l'objectif de ce projet est d'évaluer une méthode d'inoculation chez l'oison sur la base des méthodes employées dans d'autres espèces. Afin d'être efficace l'inoculation devra permettre une implantation précoce d'un microbiote de façon durable dans le temps (modification pérenne du microbiote) tout en respectant le bien être de l'oison. C'est ce que le présent projet vise à évaluer.

Pour répondre à cet objectif un lot de 30 oisons mâles d'1 jour sera utilisé. 6 animaux seront abattus à 1 jour d'âge pour définir le microbiote avant inoculation. Les animaux restants (n=24) seront ensuite répartis aléatoirement en 3 lots de 8 animaux chacun et recevant un inoculum spécifique à 1, 2 et 4 jours d'âge. Les 24 animaux seront euthasiés à 8 semaines d'âge pour évaluer l'implantation du microbiote.

Les 30 oisons impliqués dans ce projet représentent un nombre minimal d'animaux à utiliser pour observer un effet des modalités testées. En effet, la communauté bactérienne et la cinétique d'implantation est très variable d'un animal à un autre, un effectif de 8 animaux par lot est donc un minimum pour pouvoir obtenir des résultats robustes et fiables. Aucune procédure provoquant de la

douleur ne sera appliquée aux animaux durant leur élevage. Tous les animaux seront élevés selon des pratiques standard d'élevage avec des conditions d'ambiance adaptées à leur stade de développement et un accès à volonté à l'aliment et à l'eau.

5619. Une protéine localisée à la membrane des cellules, et qui est le récepteur d'une molécule nommée GRP (pour Gastrin Releasing Peptid) a été identifiée comme étant exprimée dans plusieurs types de cancers dont les tumeurs stromales gastrointestinales. Ce récepteur de GRP est considéré comme une cible pertinente à des fins diagnostiques et thérapeutiques.

L'objectif de ce projet est la détermination de la biodistribution et de l'efficacité thérapeutique d'un analogue de la bombésine radiomarqué au Lutétium-177 et spécifique du récepteur à la GRP (GRPR, ou BB2). La biodistribution des composés sera évaluée chez des souris nude immunodéficientes implantées en sous-cutané au niveau du flanc avec une lignée cellulaire tumorale exprimant le GRPR (GIST-882). L'étude de la biodistribution du composé sera réalisée à 7 temps, ce qui représente un total de 42 souris. L'efficacité thérapeutique sera évaluée sur le même modèle animal. Cette seconde étude sera réalisée avec deux doses différentes et l'effet sera comparé à un groupe contrôle, ce qui représente un total de 36 souris. L'étude comprendra ainsi au total 78 animaux. Tout sera mis en œuvre lors de cette étude pour respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner) : le nombre minimum de mesures et d'animaux permettant le recueil de données statistiquement exploitables sera utilisé, les animaux seront hébergés en groupe avec enrichissement du milieu de vie ; un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé ; enfin, des points limites adaptés, tel qu'un volume tumoral maximal, seront utilisés afin de réduire le stress et la souffrance.

5620. Il est maintenant bien établi qu'il existe une formation de nouveaux neurones (néo-neurogénèse) tout au long de la vie dans l'hippocampe des mammifères, et que ce phénomène joue un rôle dans la mémoire spatiale. L'hippocampe est une structure clé impliquée dans les processus mnésiques. En outre, il appartient au cerveau dit « émotionnel » et joue un rôle majeur dans la régulation de l'humeur et des émotions. Les nouveaux neurones nés à l'âge adulte (Adu) s'intègrent aux réseaux des neurones formés au cours du développement (Dev). Ces neurones adultes semblent posséder des propriétés différentes des neurones développementaux. En effet, des études réalisées sur le rat mâle adulte ont montré que seuls les neurones nés à l'âge adulte (Adu) présentent une plasticité structurelle en réponse à un apprentissage spatial. De plus, les neurones formés à l'âge adulte sont impliqués dans la résolution de problèmes d'orientation spatiale tandis que les neurones développementaux sont impliqués dans la reconnaissance de contexte. Enfin, les neurones Adu jouent un rôle clé dans la régulation des émotions.

A partir de ces données, nous avons émis l'hypothèse que le rôle des néo-neurones dépend du moment (stade ontogénique) auquel ils sont formés : développement ou adulte. Les neurones ne changent pas de fonction en vieillissant (Adu) mais représentent une population de neurones avec une fonction différente et complémentaire des neurones formés au cours du développement (Dev).

Pour tester cette hypothèse, nous proposons d'étudier le rôle spécifique des deux populations de neurones (Adu et Dev) dans la mémoire et la régulation des émotions, plus particulièrement l'anxiété et la dépression.

Puisque ce projet repose sur une approche intégrée nécessitant les capacités cognitives de l'animal, une approche *in vitro*, ou *in silico*, ne peut être envisagée et le projet sera réalisé sur des rats mâles de la souche Sprague-Dawley (n=1176). Tous les efforts seront portés afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, et de raffiner les approches utilisées afin de préserver au mieux leur bien-être durant les procédures. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, certains seront utilisés dans plusieurs procédures expérimentales. Les animaux seront hébergés dans des cages collectives enrichies avec des rondelles de nid de peuplier compressées jusqu'aux procédures comportementales où ils seront alors hébergés en cage individuelle enrichie (rondelles de nid de peuplier compressées).

5621. Le syndrome du X fragile est une maladie neuro-développementale caractérisée par les troubles de retard mental, l'épilepsie et les troubles du déficit de l'attention / hyperactivité, l'anxiété, et souvent les troubles de spectre autistique. Suite aux études effectuées sur le modèle murin de cette maladie, plusieurs traitements thérapeutiques expérimentaux ont été élaborés et testés en essais cliniques chez l'homme. Malgré la forte promesse de ces traitements expérimentaux, trois essais cliniques de grande échelle ont récemment été annulés par raison d'un manque d'efficacité de ces traitements. Une des explications pour le manque d'efficacité était une insuffisance de mesures biologiques adaptées pour évaluer l'efficacité des drogues. Le développement des nouvelles mesures – plus particulièrement les bio-marqueurs translationnels – est une priorité pour informer et évaluer les futurs essais cliniques sur le syndrome de l'X fragile.

Notre étude actuelle vise à évaluer le potentiel d'un nouveau biomarqueur pour l'évaluation de l'efficacité d'un traitement chronique chez les souris modèle de syndrome de l'X fragile.

En accord avec le principe des 3Rs (réduction, raffinement, remplacement), nous avons réfléchi à notre projet de recherche de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés ainsi que la souffrance imposée par les procédures détaillées dans ce document. Remplacement : notre projet porte sur l'étude de la connectivité neuronale, en particulière en cohérence avec les études chez l'homme, et nécessite donc l'utilisation des systèmes complexes et entiers. Pour ces raisons, le remplacement avec les animaux de plus faible sensibilité, ou par les méthodes *in vitro* ou *in silico* ne sont pas possible à ce jour. Réduction : nous avons réfléchi aux expériences de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux nécessaire à l'exploitation statistique des résultats. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire pour la réalisation de ce projet crucial à 104 animaux. Raffinement : Les animaux sont hébergés d'une manière adaptée à leurs besoins et reçoivent une surveillance quotidienne et les soins adaptés.

5622. La maladie de Parkinson (PD) est l'une des maladies neurodégénératives les plus courantes qui touche rien qu'en France plus de 150 000 personnes de plus de 65 ans. La L-DOPA qui peut remplacer le manque de dopamine dans le cerveau des patients atteints est le seul traitement disponible et efficace. Malheureusement, ce traitement chronique finit par provoquer l'apparition de complications motrices sévères appelées dyskinésies ou MIAs (mouvements involontaires anormaux). Le développement de dyskinésies contrecarre le gain procuré par la L-DOPA et diminue beaucoup la qualité de vie des patients. Dans des études préliminaires, il a été montré que le gaz xénon réduit les MIAs avec efficacité dans deux modèles mimant la maladie de Parkinson, chez le rat lésé avec la neurotoxine 6-OHDA et chez le singe macaque traité au MPTP. Dans ce projet, nous souhaitons étudier les mécanismes d'action du xénon au niveau synaptique en utilisant un modèle 6OHDA de souris transgéniques dans laquelle les neurones dopaminergiques sont fluorescents. Le recours à des modèles *in vitro* n'est donc pas possible ici. Dans le respect de la règle des 3R nous utiliserons environ 55 animaux afin d'en réduire le nombre tout en ayant assez de données pour établir des statistiques solides. Les animaux témoins auront reçu la solution véhicule de la 6OHDA, du NaCl. Les animaux auront un suivi particulièrement adapté aux troubles générés par ce modèle bien connu de maladie invalidante.

5623. Le cancer est désormais la première cause de mortalité dans les pays développés, devant les pathologies cardiovasculaires. Dans ce contexte, l'objectif de nos recherches est le développement de nouvelles techniques d'imagerie pour évaluer la réponse aux traitements anti-cancéreux et permettre d'adapter les traitements de façon la plus individualisée possible à chaque patient grâce à un examen indolore d'imagerie médicale.

Au cours de nos travaux d'imagerie, nous distinguerons 2 approches distinctes :

1°) Approche diagnostique : cette stratégie permet d'identifier une caractéristique particulière propre à une tumeur donnée, comme par exemple la surexpression d'une protéine qui sera la cible du futur traitement. Pour cela, nous identifierons la molécule se liant le mieux possible à la cible choisie (protéine surexprimée), puis nous y ajouterons une molécule « signal » permettant sa détection (radioactivité ou fluorescence). Toutes ces étapes menées sur culture cellulaire permettront également de vérifier l'absence de toxicité du traceur développé. Ce n'est qu'ensuite que nous administrerons ce traceur par voie intraveineuse à des souris afin de suivre celui-ci dans le temps par imagerie (qui va détecter la molécule signal grâce à des caméras spécifiques, identiques à celles utilisées chez l'homme) et de vérifier qu'il se lie bien spécifiquement à la tumeur.

2°) Approche thérapeutique : cette stratégie permet d'évaluer dans le temps l'efficacité de molécules anticancéreuses en suivant l'évolution d'un traceur d'imagerie tumorale. Il est ainsi possible dans certains types de cancer de détecter l'efficacité d'un traitement très tôt (après seulement une cure de chimiothérapie) avant que le volume de la tumeur commence à diminuer. Cette technique permet également de modifier le traitement s'il n'est pas assez efficace. Dans notre travail, nous essaierons d'élargir cette technique à de nouveaux types tumoraux. Pour cela, des souris porteuses de tumeurs seront traitées par un médicament anticancéreux et des imageries hebdomadaires seront réalisées pendant la période de traitement afin de vérifier si le marqueur d'imagerie est modifié avant que la taille de la tumeur ne soit réduite.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, en comparaison avec une étude « classique » qui nécessite l'euthanasie des animaux à chaque point de temps examiné, l'imagerie nous permet de répéter l'imagerie à différents temps chez le même animal et donc de réduire le nombre d'animaux d'autant. L'étude préalable des molécules d'intérêt sur culture cellulaire permet de s'affranchir de l'utilisation d'animaux non justifiée (remplacement). Pour chaque étude diagnostique, nous formerons 2 groupes de 10 animaux (groupe 1 : signal seul, groupe 2 : signal + molécule vecteur). A raison de 3 études / an, 60 animaux seront utilisés par an, soit 300 sur 5 ans. Pour chaque étude thérapeutique, nous formerons 3 groupes de 10 animaux (groupe 1 : non traité, groupe 2 : traité dose 1, groupe 3 : traité dose 2). A raison de 2 études / an, 60 animaux seront utilisés par an, soit 300 sur 5 ans. Sur 5 ans nous estimons donc le nombre total d'animaux à n=600 souris.

Enfin, la totalité des procédures impliquant les animaux (injection sous-cutanée, intraveineuse et imagerie) est réalisée sous anesthésie suivie d'un réveil sous lampe chauffante réduit l'inconfort potentiel à son minimum permettant ainsi le raffinement de l'étude.

5624. Les troubles de la croissance périnatale liés à un faible poids à la naissance ou à une nutrition inadéquate du nouveau-né prématuré constituent un problème de santé général dans le monde. La prévention est le moyen d'action privilégié par les autorités sanitaires. Le ciblage spécifique des microARNs endogènes qui jouent des fonctions cruciales dans la physiologie cellulaire, pourrait permettre de dégager une piste thérapeutique en concevant une supplémentation orale avec des micronutriments déjà présents dans le lait. Par conséquent, de nouvelles classes de vecteurs doivent être conçues et optimisées pour la délivrance intracellulaire dans les cellules gastro-intestinales suite à une prise orale. Nous avons l'intention de concevoir une méthode pour fournir des microARNs intégrés dans des vésicules biomimétiques, inoffensives et efficaces sur primocultures de cellules gastriques. Puis nous explorerons les conditions d'inoculation *in vivo* de ces vecteurs. Les points cruciaux du verrou scientifique résident dans la reproductibilité de l'incorporation de microARNs synthétiques. Ensuite, sur la capacité de transférer des microARNs fonctionnels à des cellules gastriques de rat ou humaines en culture. Enfin, sur la capacité de transférer des microARN chez les rats, ce qui permettra de tracer la distribution de ces vésicules le long du tube digestif. Le critère final est de doser l'impact fonctionnel de microARN ou d'ARN de silençage sur la physiologie des cellules gastriques de bébés (rats et humains). Dans le présent projet, notre objectif est tout d'abord de rechercher la dose optimale de NanoTaxi permettant d'obtenir une inhibition d'une cible-clé du microARN. Puis, nous investiguerons les mécanismes potentiels sous-jacents (expression nucléaire et/ou cytoplasmique) avec la dose retenue. L'étude *in vivo* sera précédée d'une évaluation *in vitro* de la dose efficace de microARN encapsulé dans un Nanotaxi sur glandes gastriques maintenues en survie. La dose retenue sera utilisée pour les expériences *in vivo*.

Ce projet sera réalisé chez le raton Wistar sur deux ans le nombre total de ratons sera de 160. Cela représente 20 portées de 8 ratons (mâles et femelles) à partir du jour-12. Soit un nombre total de ratons (mâles et femelles) pour une seule formule de Nanotaxi et un seul microARN de 80. Pour des raisons de comparaison scientifique, nous nous réservons la possibilité d'ajouter soit une formule de Nanotaxi soit un autre microARN (ce qui fait 160 ratons).

Concrètement pour deux cycles lumineux inversés (Phase éclairée : 8H00-20H00 et Phase éclairée : 20H00-8H00). Les 40 ratons de 4 groupes expérimentaux (ou portées) seront donc mis à mort après inoculation (deux ratons, 1 mâle et 1 femelle, témoin 0H), puis en cas de recherche d'un effet circadien : mise à mort d'un raton mâle et d'un raton femelle toutes les 4 heures par point temporel jusqu'à 24 heures (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h). Dans le cas de recherche d'un effet à long-terme, nous garderons 2 mâles et 2 femelles à 24 heures (ou au temps déterminé optimal par l'essai précédent) puis à 35 jours de vie pour les deux mâles et les deux femelles restantes. L'heure de l'inoculation sera le début de nuit pour un groupe de 2 portées et le début du jour pour l'autre groupe de 2 portées (correspondant à une inoculation entre 8H00 et 9H00. Le jour de la mise à mort, le sang sera collecté dans des tubes héparinés ; l'estomac et l'intestin grêle seront prélevés ainsi que le foie et le cerveau. Les morceaux de foie seront conservés à -80°C, après congélation dans l'azote liquide, en vue de l'analyse de l'expression génique et protéique.

La règle des 3 R sera respectée :

Remplacement : L'étude *in vivo* est nécessaire pour tenir compte de la complexité physiologique de l'interférence à ARN pour prévenir le risque de syndrome métabolique. Aucun modèle cellulaire ou mathématique ne peut reproduire la complexité de cette pathologie. Le raton représente un bon modèle largement exploité au laboratoire.

Réduction : Le nombre de ratons a été réduit au minimum (4 ratons par point de cinétique) pour pouvoir tester un effondrement qualitatif de l'expression de la cible-clé du microARN (correspondant soit au microARN, à l'ARN messager-cible ou à la protéine correspondante).

Raffinement : Les animaux ne subiront qu'une seule contrainte, un bolus oral d'une solution de Nanotaxi et la douleur sera minimisée. Les cages seront enrichies pour le bien-être des animaux.

Les ratons seront surveillés quotidiennement. Dans le cas d'une perte de poids, d'une modification de la prise alimentaire, de l'apparence générale ou du comportement, la surveillance sera accentuée et les ratons seront soignées et/ou placées sous antidouleurs afin de minimiser toute souffrance, détresse ou inconfort. Enfin, si l'animal ne parvenait pas à se rétablir, la mise à mort serait envisagée. Le nombre d'animaux pour chacune des expériences a été fixé de façon à éviter une sur-utilisation d'animaux tout en permettant une bonne exploitation statistique des résultats.

5625. Ce projet vise à comprendre les bases développementales et neuronales de l'adaptation comportementale d'un poisson téléostéen à des changements d'environnements. Nous utilisons une approche comparée de l'étude du système nerveux entre une population de poisson de rivière et une population cavernicole aveugle de poisson de la même espèce. Des études précédentes ont montré qu'il existe entre ces deux populations de poissons des différences de taille du cerveau antérieur ainsi que du système sensoriel olfactif. Ils sont proportionnellement plus larges chez le poisson cavernicole aveugle que chez le poisson de surface. Il est supposé que ces variations neuronales ont une origine développementale, qu'elles sont apparues au cours de l'évolution, et qu'elles se caractérisent par des différences de comportement.

Nous voulons donc étudier si ces variations neuronales entre poissons de surface et poissons cavernicoles ont une origine embryonnaire précoce.

Nous savons déjà grâce à des travaux précédents que les signalisations qui influencent le développement de l'embryon sont modifiées chez le poisson cavernicole. D'autre part, la prolifération est un mécanisme biologique complexe qui permet de produire de nouvelles cellules et dont la régulation joue un rôle majeur dans le développement et le contrôle de la taille adulte d'un organe. Nous voulons donc déterminer si ce sont des différences au cours du développement ou dans la régulation de la prolifération plus tardive qui sont impliquées dans les différences précitées entre les poissons cavernicoles et les poissons de surface.

Ainsi, nous voulons (i) analyser les effets de la modification du système nerveux embryonnaire sur la neurotransmission dans le cerveau et (ii) quantifier et décrire précisément les événements de prolifération au cours du développement des alevins et au stade juvénile.

La stratégie technique consiste à effectuer par balnéation des traitements pharmacologiques qui permettront soit de modifier au cours du développement les territoires présomptifs du système nerveux soit de marquer les cellules en prolifération. Cette stratégie permettra de quantifier et caractériser les cellules en prolifération en condition normale et en condition modifiée chez les différentes populations de poissons.

Les résultats obtenus nous permettront ainsi de mieux comprendre les mécanismes développementaux et cellulaires du cerveau qui sous-tendent l'adaptation à un nouvel environnement.

Les animaux utilisés dans cette procédure seront des poissons de surface, des cavernicoles et des hybrides (les deux populations, étant de la même espèce, se reproduisent naturellement et donnent des hybrides féconds). Nous utiliserons au total 1800 larves et 1800 juvéniles.

Nous prendrons soin de respecter la règle des 3R grâce aux mesures suivantes :

Les mécanismes moléculaires, cellulaires et développementaux mis en place au cours de l'évolution qui permettent à une espèce de s'adapter à son environnement sont complexes et non prévisibles. Le recours à l'utilisation d'animaux ne peut être remplacé. Cependant, afin de réduire les nombres nous utiliserons des tests statistiques non paramétriques. De plus, nous utiliserons les animaux traités pour deux questions scientifiques distinctes, (i) la différence de taille du système olfactif, (ii) la différence de taille du cerveau antérieur. Les conditions d'élevage des alevins sont optimisées afin d'obtenir des alevins vifs et non stressés. La technique de balnéation (remplace l'injection) n'est pas invasive et est sans angoisse pour les animaux puisque l'agent pharmacologique est

dilué dans l'eau des poissons. Dans tous les cas, nous suivrons les signes de souffrance éventuels des animaux et procéderons si nécessaire à une interruption de l'expérience et à une euthanasie.

5626. Ce projet fait partie d'un projet de recherche plus large mené par l'équipe de recherche dirigé par le chercheur responsable, et vise à l'étude d'un nouveau facteur important pour le contrôle de la réplication de l'ADN et de la prolifération cellulaire. Nous avons observé que cette protéine est surexprimée dans certains cancers chez l'homme et possède une activité oncogénique (proto-oncogène). Nous voulons caractériser différents aspects de la protéine endogène : expression, localisation sub-cellulaire, association à la chromatine, interactome, etc. Ces essais seront conduits à partir de cellules en culture et/ou des tissus et nécessite impérativement la production d'anticorps spécifiques dirigés contre le facteur d'intérêt. Il est envisageable que les anticorps ainsi générés pourraient avoir d'autres applications, comme par exemple marqueur pronostic de la survie de patients atteints de cancer.

Nécessité du recours à l'animal:

Ces études nécessitent le développement de plusieurs anticorps spécifiques dirigés contre notre facteur d'intérêt. La génération d'anticorps nécessite un organisme hôte qui produira une réponse humorale face à l'antigène, deux fragments de la protéine d'intérêt dans notre cas. Nous allons produire les anticorps chez le lapin car ce modèle est peu coûteux, nécessite peu d'investissement humain et permet d'obtenir une bonne quantité de sérum qui sera largement suffisante pour toutes les études décrites plus haut. Cette approche est courante pour le développement d'anticorps et est exécutée dans la plupart des laboratoires de recherche en France et dans le monde. Deux lapins par protocole d'immunisation seront utilisés. Ceci est nécessaire afin de compenser la perte éventuelle d'animaux qui n'auront pas supportés le protocole d'immunisation. Également, les réponses immunitaires individuelles sont quelquefois hétérogènes, ce qui peut conduire à l'écart d'animaux du protocole. Pour ces protocoles d'immunisation, nous utiliserons 4 lapins (2 par protocole), qui seront injectés avec deux antigènes différents (un antigène, 2 lapins). L'utilisation de deux antigènes distincts (fragments N- et C-Terminals) est pratique commune dans la production d'anticorps, car elle permet d'augmenter la probabilité d'obtenir l'anticorps désiré. L'utilisation de deux lapins par antigène constitue la quantité minimale d'animaux pour l'exécution de tels protocoles.

En ce qui concerne la règle des 3R, nous ne pouvons pas Remplacer les lapins comme hôte afin d'obtenir les anticorps souhaités. Nous avons Réduit au minimum le nombre de lapins pour mener à bien ce projet. Pour le Raffinement du protocole, nous avons utilisé des fragments de la protéine d'intérêt qui devraient générer une bonne réponse humorale. En effet, nous avons généré par le passé des anticorps chez le lapin contre l'isoforme de xénope de la même protéine d'intérêt. Nous avons utilisé les mêmes fragments N et C-terminal comme immunogènes et avons obtenu une bonne réponse humorale. De plus, nous allons monitorer la réponse humorale des lapins, afin de minimiser le nombre d'injection de l'immunogène.

5627. Il est maintenant bien démontré que les cellules du système immunitaire et notamment les leucocytes (globules blancs) présents dans le microenvironnement tumoral jouent un rôle majeur dans l'évolution de la tumeur et la réponse aux traitements, notamment dans le contexte de la radiothérapie conventionnelle.

Le rôle principal de la radiothérapie est de traiter une tumeur locale tout en épargnant les tissus sains périphériques, ce que l'on appelle « l'effet différentiel ». De grandes avancées en physique médicale ont été réalisées pour améliorer cet effet différentiel en faisant varier soit la dose par fraction, soit la modulation d'intensité du rayonnement ionisant. Ainsi, les nouveaux protocoles utilisant des débits plus élevés que celui utilisé en radiothérapie conventionnelle ont montré une diminution significative du risque de développement d'effets secondaires à long terme. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués ne sont pas encore complètement compris, en particulier l'impact sur la réponse immunitaire anti-tumorale reste à élucider. C'est l'objet de notre projet.

En utilisant plusieurs modèles précliniques (mélanome, fibrosarcome, cancer du sein, de la prostate, du colon et du col de l'utérus) nous étudierons l'effet de la modulation du débit de dose sur la réponse immunitaire et la progression tumorale.

Il n'y a pas de modèle alternatif pour ce type de preuve de concept. La souris immunocompétente de type C57BL/6 constitue un modèle expérimental de référence pour ces expériences de greffes de cellules tumorales.

La significativité des différences de croissance tumorale sera déterminée par un test statistique.

Le nombre d'animaux sera réduit au minimum tout en ayant un nombre suffisant pour obtenir un résultat statistiquement significatif (exigence de réduction). Les expériences seront réalisées avec 8 animaux par groupe et seront reproduite 1 fois, afin de tester la reproductibilité. Pour l'ensemble du projet nous avons prévu un nombre maximal de 840 souris sur une durée de 5 ans.

Si il n'y a aucune ambiguïté sur les résultats nous éviterons les répétitions inutiles. On anticipe donc que le nombre total de souris utilisées dans ce projet sera inférieur au nombre total annoncé.

Les souris seront surveillées quotidiennement ceci dans le but de :

- suivre le développement de la tumeur, celle-ci ne devant pas excéder 20% du poids normal de l'animal,
- détecter le moindre signe de souffrance et/ou de détresse de l'animal (exigence de raffinement).

5628. La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique du tube digestif caractérisée par un état d'hyperactivation du système immunitaire. Elle peut toucher tous les segments du tube digestif, de la bouche jusqu'à l'anus. Les sièges préférentiels de la MC sont l'iléon terminal et le côlon. Cette pathologie atteint avec prédilection l'adulte jeune et évolue par poussées entrecoupées de périodes de rémission. On dénombre environ 1 million de cas en Europe et 1 million de cas aux Etat-Unis, ce qui fait de la MC un problème majeur de santé publique. Son diagnostic n'est pas toujours facile à établir, car de nombreux symptômes sont partagés avec d'autres pathologies inflammatoires intestinales. Il n'existe pas à ce jour de traitement curatif de cette maladie. Entre autre, le

recours fréquent à la chirurgie, parfois plusieurs fois au cours de la vie du patient, en fait une maladie très invalidante. L'étiologie de la MC est encore mal comprise. Aujourd'hui, l'hypothèse la plus communément admise et qu'elle résulterait d'une réponse immunitaire anormale vis-à-vis d'agent(s) du microbiote intestinal chez des individus pouvant être génétiquement prédisposés. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la MC sont nécessaires pour permettre le développement de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques.

Plusieurs études ont rapporté des altérations de la composition en lipides plasmatiques chez les patients atteints de MC. Notre projet de recherche vise à comprendre ces altérations et leurs conséquences en étudiant la composition en lipides et l'expression des enzymes nécessaires à leur synthèse dans différents organes, en particulier ceux associés au tube digestif, en réponse à une inflammation intestinale. Pour cela, nous souhaitons nous positionner dans un modèle d'étude qui permette de reproduire l'environnement inflammatoire dans lequel se trouve la muqueuse intestinale des patients atteints de MC. Nous avons choisi le modèle de colite chimique induite au DSS (Dextran Sodium Sulfate) chez la souris, un modèle relevant et couramment utilisé dans le cadre d'étude de maladie inflammatoire intestinale. Deux protocoles seront utilisés : l'un induisant une colite aiguë (DSS à 2% dans l'eau de boisson pendant 7 jours), l'autre une colite chronique (3 cycles répétant 7 jours de DSS 2% dans l'eau de boisson suivi de 14 jours d'eau). Pour chacun des protocoles, deux lots d'animaux (n=8/lot) seront constitués : l'un recevant du DSS dans l'eau de boisson (lot colite) et l'autre non (lot contrôle). A l'issue de ces 2 protocoles, les prélèvements nécessaires à l'expérience (sang et organes) seront réalisés sur les animaux contrôles et ceux ayant reçu du DSS, dans le respect de la non douleur/souffrance et du bien-être des animaux.

L'utilisation d'animaux vivants est indispensable pour répondre à notre question expérimentale, les modèles *in vitro* disponibles ne permettant pas d'une part de reconstituer la complexité de l'environnement inflammatoire de la muqueuse intestinale qui met en jeu de nombreux types cellulaires et d'autre part d'étudier l'impact d'une inflammation intestinale sur la composition lipidique d'autres tissus ou compartiments tels que le sang/plasma. L'utilisation de deux protocoles expérimentaux (colite aiguë et colite chronique) permettront de confronter les modifications lipidiques observées en relation avec les modifications cliniques et histologiques associées à ces deux types de colites chimiques induites au DSS. Le nombre d'animaux nécessaire pour notre étude a été réduit à son minimum (nombre total d'animaux = 32) sur l'appui de résultats obtenus dans notre laboratoire concernant la variabilité inter-individuelle dans le cadre d'études sur la composition en lipides chez le rongeur. Enfin, nous nous efforcerons d'apporter une réponse adaptée aux contraintes d'inconfort, de stress et de douleur auxquelles les animaux pourraient être exposés (surveillance accrue, suppression de la douleur par des analgésiques ou des anesthésiques, changement de litière supplémentaire).

5629. Le cancer du sein est la 2ème cause de cancer en général et la première cause de cancer chez la femme. Les métastases sont traitées par chimiothérapie ou thérapie ciblée, en fonction des résultats histologiques obtenus au niveau de la tumeur primaire. Cependant les cellules constituant les métastases peuvent être différentes de celles de la tumeur primaire. C'est le cas de 25 à 40% des métastases du cancer du sein. Il serait donc primordial de pouvoir caractériser, à priori, les différentes métastases, c'est-à-dire de les phénotyper. Toutes les métastases n'étant pas accessibles à la biopsie, l'imagerie médicale serait donc d'un grand intérêt. Elle permettrait en effet de choisir le traitement approprié pour chaque patiente. La médecine nucléaire est à ce jour la seule technique d'imagerie moléculaire, c'est-à-dire pouvant identifier la présence d'une molécule d'intérêt, disponible en pratique clinique. Dans le cadre de ce projet, l'objectif est de développer le phénotypage par imagerie nucléaire des métastases du cancer du sein en ciblant deux molécules contre lesquelles des traitements pourraient être proposés : VCAM-1 et la mésothéline. En oncologie, il a été montré que VCAM-1 joue un rôle prépondérant dans la dissémination métastatique, et que l'expression de cette molécule d'adhésion par les cellules tumorales, confère des propriétés de survie accrues. La mésothéline, elle, a été suggérée comme cible potentielle des cancers du sein triple négatifs, cancers pour lesquels l'arsenal thérapeutique à la disposition du clinicien est limité.

Le laboratoire porteur du présent projet dispose de molécules radiomarquées (ou radiotraceurs) spécifiques de ces cibles. Ces molécules sont des agents d'imagerie permettant de visualiser l'expression de ces molécules de manière non invasive par imagerie TEMP (tomographie par émission de simples photons). La preuve du concept a été réalisée *in vitro*, puis *in vivo* sur des modèles de xénogreffes en sous-cutanée sur la souris BALB/c Nude. L'objectif de la présente étude est de se rapprocher un peu plus encore de la réalité clinique en évaluant le potentiel de ces deux radiotraceurs pour l'imagerie des métastases du cancer du sein dans le tissu pulmonaire. Dans cet objectif des lignées humaines du cancer du sein seront implantées par voie intraveineuse chez des souris CB17 SCID. Au total dans cette étude, 32 souris seront utilisées.

Tout au long des protocoles *in vivo*, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Les études *in vitro* préalables à cette étude *in vivo* ont été réalisées. A ce stade, seul le modèle animal peut permettre d'évaluer l'imagerie des métastases pulmonaires. Le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des données statistiquement analysables sera utilisé. Les animaux seront hébergés par groupe, avec enrichissement du milieu de vie. Un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé. La session d'imagerie sera réalisée sous anesthésie volatile (Isoflurane), complétée par un mélange Air – O<sub>2</sub>. Les animaux seront placés sur un lit thermostaté le temps de l'imagerie et la fréquence respiratoire sera enregistrée en continue afin de contrôler le degré d'anesthésie et de l'ajuster si nécessaire.

5630. Pour maintenir l'homéostasie glucidique en dehors des périodes de repas, trois organes (le foie, les reins et l'intestin) sont capables de produire du glucose dans la circulation sanguine. L'induction de la production intestinale de glucose (PIG) exerce, contrairement à la production hépatique de glucose, des effets bénéfiques sur l'organisme. En effet, la détection du glucose produit par l'intestin dans la veine porte entraîne l'induction d'un signal nerveux (« glucose portal »), qui, transmet au niveau central, se traduit par une induction de la satiété, une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une diminution de la production hépatique de glucose.

Le by-pass gastrique est une chirurgie réalisée chez l'homme dans le cadre du traitement du diabète et de l'obésité. Cette intervention entraîne chez les patients, une modification de la préférence alimentaire avec notamment une aversion pour la nourriture riche en graisses et en sucre. Chez le rongeur, la PIG est augmentée à la suite du by-pass gastrique et il a été montré que cette induction était impliquée dans les effets bénéfiques du by-pass gastrique tels que l'amélioration de la tolérance au glucose.

L'objectif de cette étude est de déterminer si l'induction de la PIG pourrait moduler la préférence alimentaire chez le rongeur et d'étudier les mécanismes impliqués.

La PIG contrôle la préférence alimentaire *via* un relais nerveux. Ce projet sera donc réalisé *in vivo* chez des animaux commandés chez un fournisseur agréé qui ne nous a fait part d'aucun signe de stress, ni de douleur au cours de leur développement.

Pour étudier l'effet de la PIG, nous réaliserons 1/ une dénervation par traitement à la capsaïcine au niveau de la zone portale afin d'annuler le signal « glucose portal » et 2/ une perfusion de glucose directement en veine porte grâce à l'implantation préalable d'un cathéter dans le but de mimer l'induction de la PIG.

À la suite de la chirurgie, les animaux seront placés en cage individuelle pour éviter que les animaux ne s'arrachent les points de suture mutuellement. Le stress et la souffrance seraient alors plus importants que l'isolement. Néanmoins, pour palier à leur isolement, les cages sont des cubes transparents ouverts sur le dessus, permettant la libre circulation des odeurs et des vocalises. Dans le respect du bien-être animal, les rats seront hébergés en milieu enrichi (coton de nidation, fond musical) avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Le suivi du bien-être des animaux sera réalisé régulièrement en étudiant leur poids, leur prise alimentaire et leur comportement afin d'identifier tout individu en souffrance. La pose de cathéter et le traitement à la capsaïcine pouvant entraîner de la douleur, un analgésique et antalgique sera administré pendant et à la suite des procédures (pendant 3 jours).

Les rats seront mis à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R:

La nécessité d'avoir recours à des animaux dans ce projet est d'obtenir une réponse de l'organisme tout entier en temps réel, ce qui n'est pas réalisable en modèle cellulaire.

Le nombre total d'animaux, 32 rats, a été calculé au plus juste afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisées. Ce nombre a été estimé après une étude de puissance statistique.

Par souci de raffinement, les procédures/opérations chirurgicales sont maîtrisées au sein du laboratoire, ce qui limitera les décès post-opératoires et la connaissance du modèle animal permet de définir des points limites (perte de poids supérieure à 10%, prostration, absence de toilette, ...).

5631. Le présent projet concerne le contrôle de l'inactivation d'un agent toxique dans le cadre du développement d'un produit immunologique à usage vétérinaire destiné à une espèce de mammifère domestique.

Après recherche bibliographique, aucun modèle *in vitro* ne peut permettre de garantir l'inactivation de l'agent toxique contenu dans notre produit. En effet, d'autres agents présents dans notre produit sont susceptibles de provoquer les effets décrits *in vitro* ce qui rend aspécifique un tel modèle. Le développement d'un modèle *in vivo* décrit dans la littérature s'impose donc et le choix s'est porté sur le modèle décrit dans la Pharmacopée Européenne humaine pour un produit équivalent au nôtre.

L'agent toxique en question provoque des signes cliniques identifiables et spécifiques dans un temps court après injection sur souris jeunes.

Ce test spécifique sur rongeurs sera effectué dans le cadre de la validation du procédé de fabrication du produit vétérinaire et permettra de garantir sa non toxicité. Ceci est un préalable avant tout essai d'innocuité et d'efficacité sur l'espèce de destination.

Les principes des 3R seront pris en compte au travers des points suivants :

- Une période d'acclimatation sera assurée avant le début de l'essai.
- Un enrichissement adapté sera utilisé dans les cages (matériel de nidification).
- Le nombre de 3 animaux par groupe sera retenu car les études préliminaires réalisées dans le cadre d'un précédent projet ont montré que ce nombre est suffisant pour l'interprétation des résultats.
- L'utilisation conjointe d'anesthésique et d'analgésique pendant la phase critique de l'essai.
- Une surveillance renforcée des animaux, l'utilisation d'échelles de score pour les signes cliniques ainsi que la définition de points limites, permettront de réduire la durée d'expérimentation chez les animaux répondeurs.

Le nombre total d'animaux utilisés pour ce projet sera au maximum de 217.

5632. L'obésité et le diabète de type 2 connaissent une croissance alarmante qui ne peut être attribuée uniquement aux modifications individuelles du régime et du mode de vie. Une altération du développement des régions du cerveau impliquées dans la régulation du poids (comme l'hypothalamus) en période périnatale pourrait participer à l'apparition de ces pathologies. La production intestinale de glucose est une fonction bénéfique pour l'équilibre glycémique, qui, *via* un relais nerveux, contrôle les fonctions de l'hypothalamus. Chez l'adulte, l'induction de cette fonction protège de l'obésité et du diabète induit par un régime riche en graisses et en sucres. En période périnatale, la production intestinale de glucose connaît une forte induction la deuxième semaine de vie dans une fenêtre temporelle cruciale pour les connections neuronales entre les différents noyaux de l'hypothalamus. L'objectif de ce projet est d'apporter la preuve de concept que la production intestinale de glucose en période périnatale est indispensable à un développement optimal de l'hypothalamus.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R:

Remplacement: La production intestinale de glucose contrôle l'hypothalamus *via* un relais nerveux. La détection, la transmission et l'intégration de ce signal périphérique sont réalisées par les connections intestin-cerveau. Ce projet sera donc réalisé *in vivo* dans

des modèles de souris transgéniques invalidées pour la production intestinale de glucose. L'impact de la production intestinale de glucose sur le développement cérébral sera étudié par marquage immuno-fluorescent des connections nerveuses dans l'hypothalamus à différentes étapes du développement (période périnatale-première semaine de vie ; adulte). La procédure de fixation des cerveaux sera réalisée sous anesthésie avec un prétraitement analgésique des animaux, sans réveil des animaux.

Réduction: Le nombre de souris a été calculé au plus juste pour valider cette preuve de concept. Le nombre d'animaux maximum utilisé a été estimé à 18 souris par génotype sur une période de 1 an, soit un nombre total de 36 souris.

Ces résultats permettront de démontrer l'importance de la production intestinale de glucose en tant que fonction essentielle à la transmission de l'état nutritionnel au cerveau, et permettront d'ouvrir les possibilités bénéfiques de cette fonction à l'amélioration de l'environnement maternel.

Raffinement: Les souris seront élevées et hébergées par groupe en milieu enrichi (coton de nidation, bois à ronger, hutte en carton, fond musical) avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les animaux seront manipulés régulièrement, observés quotidiennement et pesés toutes les semaines pour suivre leur prise de poids. La connaissance du modèle animal permet de définir des points limites. Dans un souci de raffinement des méthodes, ces souris seront utilisées avant le développement des troubles cliniques liés à leur génotype. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation.

5633. L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires qui représente un véritable problème de santé publique dans de nombreux pays du fait notamment de sa fréquence, des maladies associées, de la mortalité et surtout d'une perte d'années de vie en bonne santé, ainsi que du poids économique généré (1,5 millions d'euros en France en 2001). En France, la prévalence de l'asthme chez l'adulte est passée de 5,8% en 1998 à 6,7% en 2006 et les hospitalisations pour asthme restent fréquentes. De nombreux facteurs peuvent aggraver la pathologie asthmatique tels que les allergènes, les polluants chimiques comme les particules diesel ou encore le tabac, et les infections virales ou bactériennes. En outre, les facteurs métaboliques tels que l'obésité et des modifications du microbiote intestinal et pulmonaire sont capables d'aggraver cette pathologie.

La compréhension des processus physiologiques et des mécanismes immunologiques dans l'asthme reste donc indispensable afin d'en améliorer la prévention et le traitement. L'asthme est une maladie multifactorielle et les mécanismes identifiés jusqu'à présent sont multiples. Pourtant, même si des solutions thérapeutiques existent, elles sont insuffisantes notamment pour l'asthme sévère et sa caractéristique principale : le remodelage, ainsi que ses exacerbations. De nombreux types cellulaires interviennent dans un dialogue extrêmement complexe, nécessitant le recours à l'expérimentation animale.

Les objectifs de nos travaux sont d'identifier les mécanismes (cellulaires et moléculaires) contrôlant l'asthme et ses exacerbations. Différents protocoles seront mis au point et partagés pour diverses études permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. De même lorsque cela sera possible, les contrôles seront partagés entre les différentes études. La plupart des protocoles de sensibilisation asthmatique allergique (protocoles aigus de sensibilisation à l'OVA et au Df, protocole chronique de sensibilisation au chien) ont déjà été acceptés 2 fois par le comité d'éthique. Seuls les traitements et l'utilisation de souris transgéniques changent.

Nombre total d'animaux utilisés sur 5 ans = 21830

Ces protocoles d'asthme n'ont pas été identifiés comme protocoles douloureux. Néanmoins, pour en être toujours assurés, nous assurons une surveillance des animaux au minimum 2 à 3 fois par semaine, voir quotidienne en cas de nouveau protocole. Si des signes cliniques d'angoisse, de souffrance ou de douleur devaient apparaître, les souris seraient mises à mort par injection de produit euthanasiant à dose létale.

5634. Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie autoimmune caractérisée par la production d'autoanticorps (anticorps dirigés contre l'organisme), associée à une inflammation qui peut toucher différents organes. Les souris MRL/lpr développent une maladie très proche du lupus érythémateux disséminé humain. L'objet de nos études est d'identifier des molécules (peptides ou petites molécules chimiques) capables d'influencer le cours de la maladie d'une manière bénéfique. Ces molécules sont générées sur la base de cibles que nous caractérisons au travers d'études moléculaires et cellulaires chez l'homme et/ou la souris. C'est ainsi que le potentiel d'un peptide a été évalué et est aujourd'hui en essai clinique avancé chez les patients lupiques. Ce travail nous a permis de valider le modèle murin utilisé (souris femelles MRL/lpr de 6 à 8 semaines) et le protocole utilisé car c'est par les études que nous avons réalisées chez ces souris, dans le protocole indiqué, que ce peptide a pu être caractérisé pour son intérêt thérapeutique.

Nous poursuivons donc cette démarche soit en testant de nouvelles molécules pour des indications précises de la maladie ou en évaluant des analogues de la molécule déjà en essai.

Nous testons également des molécules anti-inflammatoires mises au point par nos partenaires.

Le syndrome de Gougerot-Sjögren est une maladie autoimmune chronique causée par l'insuffisance de production des sécrétions de certaines glandes, notamment les glandes salivaires et lacrymales. L'apparition de cette pathologie peut être secondaire à un lupus érythémateux disséminé. Nous décidons également de tester notre peptide dans cette pathologie et d'évaluer son intérêt thérapeutique.

Nous ne pouvons pas, ici, assurer la règle du remplacement. En effet, les études ne peuvent en aucun cas être réalisées *ex vivo* car il s'agit d'études précliniques qui nécessitent l'animal entier.

Afin de respecter la règle des 3R, nous avons décidé de réduire le nombre d'animaux utilisés. Afin de pouvoir réaliser des tests statistiques (tests de Mann et Whitney), mais aussi de compenser l'hétérogénéité de ces souris, nous avons décidé d'analyser des groupes de 10 souris pour chaque molécule testée, tous les 15 jours pendant 5 ans, soit un total de 3600 animaux. De plus, les souris utilisées pour la partie lupus seront les mêmes que pour la partie Gougerot-Sjögren. Pour répondre à la question du raffinement, les souris seront hébergées par groupes dans des cages de taille réglementaire, sans dépasser le nombre maximal autorisé de souris par

cage, et seront rassemblées en groupes sociaux. Les cages seront enrichies avec l'ajout de "nids". Enfin, les souris seront maintenues à une température de 22°C, dans une atmosphère dont le taux d'humidité est de 80% et un cycle éclaircissement/obscurité de 12h/12h, conformément aux conditions optimales demandées par la législation. Elles auront accès à la nourriture et à l'eau de boisson *ad libitum*. De plus, elles seront anesthésiées avant chaque prélèvement sanguin ou injection. Enfin, les souris seront observées quotidiennement, en respectant les points limites affichés dans notre animalerie, pour limiter la douleur.

5635. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant de lutter contre des maladies causées par un métabolisme défectueux incluant le diabète et l'obésité.

Les procédures utilisées dans ce projet ont été caractérisées de façon extensive dans la littérature scientifique et sont mises en œuvre à grande échelle au sein des laboratoires de pharmacologie. Ces tests nécessitent l'utilisation d'animaux et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substances pharmacologiques sur le comportement animal de façon à prédire leur efficacité clinique. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque test a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre de rongeurs et chiens, nécessaire pour les 5 prochaines années, sera de 2050. Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant d'euthanasier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

5636. Ce projet vise à évaluer les modifications pathologiques et les effets pharmacologiques au niveau cardiaque de différentes molécules chez le rongeur (rat ou souris) sain ou pathologique à l'aide d'une technologie non invasive : l'imagerie du petit animal. Cette technologie permet d'évaluer des paramètres cardiovasculaires morphologiques et fonctionnels de façon répétée chez le même animal réduisant ainsi drastiquement le nombre d'animaux mis en œuvre (animaux suivis de manière répétée).

Notre objectif est 1/ d'évaluer la pertinence de nouveaux traceurs d'imagerie comme indicateurs précoces de dommages cardiaques ; 2/ d'évaluer l'impact cardiaque de nouveaux traitements anticancéreux et de stratégies de protection.

Cet axe de recherche inclura différentes technologies d'imagerie utilisés en pratique clinique (SPECT – TEP – IRM) et sera développé sur rats et souris.

Nous débiterons par la mise en place et validation de la faisabilité des technologies d'imagerie (10 types d'imagerie évalués sur rats puis souris (plus délicat du fait de la fréquence cardiaque plus élevée)) et la mise au point du modèle pathologique (rat présentant une dysfonction cardiaque induite par un agent anticancéreux de référence). Grâce à ces travaux nous pourrons ensuite évaluer dans le modèle de rat mis en place, la pertinence de 10 différents marqueurs pour la détection précoce d'une atteinte cardiaque. L'imagerie cardiaque adaptée à la souris permettra de réaliser des études poursuivant 2 objectifs chez les mêmes animaux : l'évaluation de l'effet anti-tumoral et les effets cardiaques de molécules anticancéreuses grâce à l'utilisation de souris porteuses de tumeurs humaines (les modèles de souris sont les plus utilisés et les plus nombreux en oncologie).

Les animaux seront distribués selon le plan suivant :

- Faisabilité des imageries cardiaque : 20 rats et 20 souris
- Mise en place du modèle rat : 32 rats
- Evaluation de la précocité des marqueurs de dommage cardiaque : 120 rats
- Evaluation thérapies : 160 rats et 150 souris (10 études)

Un total de n= 332 rats et n= 170 souris est donc prévu.

L'étude du fonctionnement cardiaque rend la règle de remplacement difficilement applicable puisqu'il est nécessaire de l'étudier dans son environnement nerveux et hormonal. La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, en comparaison avec une étude classique qui nécessite l'euthanasie des animaux à chaque point de temps examiné, l'imagerie nous permet de répéter l'imagerie à différents temps et donc de réduire le nombre d'animaux d'autant. Le raffinement a été pris en compte : la totalité des procédures impliquant les animaux (injection intraveineuse et imagerie) est réalisée sous anesthésie suivie d'un réveil sous lampe chauffante réduit l'inconfort potentiel à son minimum.

5637. L'objectif de ce projet est de mettre en évidence l'effet anti-tumoral de l'association d'un médicament couramment utilisé en cardiologie, la Trinitrine (GTN) à de la radiothérapie dans les cancers du côlon métastatiques. Le but de cette étude est de montrer que l'on peut obtenir une forte activité anti-tumorale en associant cette Trinitrine à des doses de radiothérapies plus faibles.

Nous analyserons le rôle de la trinitrine associée à de la radiothérapie dans la progression des tumeurs sous-cutanées, en utilisant des cellules murines du colon CT26. Des résultats préliminaires obtenus montrent que les cellules immunitaires seraient impliquées dans l'effet anti-tumoral de l'association de la Trinitrine avec une chimiothérapie de référence pour le traitement des cancers coliques (FOLFOX). Le but de cette étude est de substituer cette chimiothérapie à de la radiothérapie, et d'optimiser la fréquence et les doses nécessaires pour l'obtention d'une régression tumorale.

Les cellules tumorales étant connues pour échapper à la surveillance immunitaire en exprimant à leur surface une molécule (PDL1) inhibitrice des cellules immunitaires, nous associerons également ce traitement à l'utilisation d'un anticorps anti-PDL1.

Ces expériences réalisées dans les cellules tumorales en culture ont permis d'observer des changements moléculaires similaires à ceux observés avec l'association trinitrine/FOLFOX et impliquant la présence de cellules immunitaires, d'où le besoin d'utiliser un modèle de souris pour étudier l'effet de ces associations et leur utilisation future chez l'Homme. Pour cette étude, 180 souris Balb/c

seront utilisées pour suivre la progression de tumeurs sous-cutanées. Ces souris seront réparties par groupes de 5 individus nous permettant d'obtenir des résultats robustes et statistiquement significatifs comme nous l'ont démontrées des études précédentes. Ces expériences seront réalisées 3 fois pour permettre l'obtention de résultats statistiquement fiables. Des études préalables nous ont permis de définir les points limites les plus précoces possible afin d'éviter toute souffrance des animaux. Le test statistique Mann-Whitney et l'expérience du laboratoire nous ont permis de réduire les groupes d'animaux à 5 individus par groupe et de ne devoir répéter que trois fois les expériences pour la progression tumorale. Nous utiliserons donc 6 groupes de 5 souris pour tester la radiothérapie en une dose ou fractionnée (90 souris) et 6 groupes de 5 souris pour tester l'association trinitrine/radiothérapie avec l'anticorps anti PDL1 (90 souris).

La croissance des tumeurs sous-cutanée sera évaluée 3 fois par semaine par mesure du volume tumoral à l'aide d'un pied à coulisse, les souris seront euthanasiées 25 jours après injection des cellules tumorales, ou lors de signes de souffrance ou lorsque le volume tumoral atteint 1500 mm<sup>3</sup>.

5638. L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), maladie rare, grave et mortelle, se manifeste par des signes respiratoires (essentiellement un essoufflement à l'effort) apparemment bénins, mais responsables d'un diagnostic tardif et d'un pronostic grave et dont aucun traitement curatif n'est actuellement disponible. En l'absence de traitement, l'espérance de vie n'atteint en moyenne que 2,8 ans après diagnostic. L'HTAP est définie par une élévation de la pression artérielle pulmonaire moyenne au-delà de 25 mm de mercure (Hg) au repos en raison de l'augmentation progressive et soutenue des résistances vasculaires pulmonaires, menant à l'insuffisance cardiaque droite et au décès du patient. La vasoconstriction, le remodelage vasculaire pulmonaire, la thrombose *in situ* et la dysfonction endothéliale sont autant de facteurs qui contribuent au développement et à la progression de la maladie. Les maladies regroupées sous le terme d'HTAP sont séparées en sous-groupes. Dans ces sous-groupes, figure l'HTAP héréditaire, définie par la transmission de la maladie à la descendance et/ou présence chez le patient d'une mutation d'un des gènes connus pour la prédisposition au développement de l'HTAP. Le rôle de ces mutations dans l'enclenchement de cette maladie est très mal compris, ce qui limite assurément le développement de médicaments efficaces. C'est pourquoi, nos objectifs sont de préciser le rôle de ces mutations dans le développement de cette maladie.

Parce que cette maladie est complexe et fait intervenir plusieurs types cellulaires (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, péricytes et cellules immunitaires), seules des expériences sur des rats porteurs de mutations pourront nous aider à comprendre l'importance de ces anomalies dans cette maladie. Nous envisageons d'utiliser environ 100 rats Sprague Dawley/an pour une durée de 5 ans.

Le nombre de rats choisi est réduit au minimum de manière à obtenir des données exploitables en tenant compte de la dispersion des résultats. Cette étude se fera dans le respect de la règle des 3R afin de réduire, autant que possible, le nombre d'animaux utilisés et de raffiner les techniques opératoires d'analgésie ainsi que d'euthanasie.

Tout au long du projet, ces rats porteurs de mutations seront régulièrement évalués et un score nous permettra de quantifier l'absence de souffrance.

En retour, ce travail nous permettra de mieux comprendre ces mutations de gènes dans l'HTAP et donc, à terme, de développer de nouveaux médicaments efficaces pour lutter contre cette maladie actuellement incurable.

5639. Nous cherchons à comprendre les mécanismes impliqués dans le développement du cervelet mais aussi au cours des tumeurs qui en sont issues: ce sont des tumeurs pédiatriques appelées médulloblastomes. Ces tumeurs sont les tumeurs cérébrales les plus répandues chez l'enfant et même s'il existe quelques traitements (radiothérapie, chimiothérapie, résection chirurgicale), la survie à 5 ans est de l'ordre de 70%. De plus les conséquences de ces traitements sur l'enfant sont majeures (déficits cognitifs, séquelles neuropsychologiques...). C'est pourquoi il est très important de développer de nouvelles thérapies ciblées. Bien en amont de nouvelles thérapies il est important de découvrir les voies de signalisation moléculaires impliquées dans le développement du cervelet et dans la progression des médulloblastomes. Pour ce faire, nous utiliserons des souris transgéniques nous permettant d'invalider nos gènes d'intérêts spécifiquement dans les cellules granulaires, cellules clefs de la structure du cervelet et étant à l'origine des médulloblastomes.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 246 souris et a été conçu de sorte à respecter la règle des 3R : raffiner, réduire, remplacer. Remplacement : Ce projet fait suite à des études préalablement menées *in vitro*, sur des cellules en culture, qui ont fournies des résultats très encourageants. Le modèle rongeur que l'on souhaite utiliser pour l'étude est extrêmement référencé dans la littérature scientifique. Réduction : Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, nous avons établi un nombre minimum d'animaux par groupe de traitement en nous appuyant sur la littérature scientifique et sur un test de puissance statistique. Raffinement : Tout acte qui sera effectué sur l'animal aura été pensé dans le souci du respect du bien-être de l'animal et de la gestion de la douleur. Un plan de surveillance adapté sera mis en place à l'aide d'une grille d'évaluation permettant de « scorer » l'état général de l'animal en définissant les points limites, de manière à éviter toute douleur, souffrance, angoisse qui ne sauraient être prises en charge et arrêtées. Le projet bénéficie du fait que le modèle animal et le protocole expérimental choisis pour l'étude sont bien décrits dans la littérature scientifique.

5640. Une des causes majeures de mortalité chez les patients souffrant d'insuffisance respiratoire est l'infection pulmonaire par un agent pathogène. Cette infection induit un stress oxydant qui peut conduire à une situation pathologique. De ce fait, les mécanismes de défense contre ce stress oxydant sont activés et sont sous le contrôle du facteur de transcription Nrf2. Nrf2 régule l'expression de plus d'une centaine de gènes impliqués dans les réponses anti-inflammatoires et antioxydantes.

Pour cela, nous avons choisi d'utiliser la souche de souris transgéniques Nrf2  $-/-$ . Cette lignée murine a un phénotype non dommageable, au phénotype indissociable des souris contrôles. L'utilisation de cette lignée transgénique Nrf2  $-/-$  et de son contrôle nous permettra de mieux comprendre les effets des enzymes de phase II contrôlés par Nrf2, tels que HO1, NQO1, GST, qui sont impliqués dans les mécanismes cytoprotecteurs et détoxifiants ainsi que les processus inflammatoires et anti-inflammatoires liés à l'infection.

La reproduction de ces souris transgéniques Nrf2  $-/-$  et contrôles nous permettra d'avoir à disposition du matériel biologique et par prélèvement sanguin, des cellules immunitaires telles que les macrophages et monocytes. Etant donné que la reproduction de cette lignée de souris transgénique est très aléatoire, avec un nombre plus faible de descendance que les lignées de souris traditionnelles, il sera nécessaire d'observer ces animaux pour déterminer si la mutation sur le gène Nrf2 affecte la reproduction et l'élevage.

Dans le respect de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement), le but de ce projet est d'optimiser les conditions d'élevage afin d'obtenir les 600 souris transgéniques KO Nrf2  $-/-$  et contrôles nécessaires à nos besoins, tout en réduisant au maximum le nombre de souris Nrf2  $+/+$  et Nrf2  $+/-$  par portée. Dans un souci de raffinement, des mesures pour diminuer la contrainte expérimentale seront prises et ces souris seront soit incluses dans la procédure d'élevage soit dans les procédures expérimentales. Dans le but d'optimiser la reproduction, il est donc essentiel de bien connaître cette souche transgénique ainsi que son évolution dans le temps afin de diminuer le nombre de souris Nrf2  $+/+$  et Nrf2  $+/-$  et de ne pas induire de souffrance inutile chez ces animaux.

5641. Le projet a pour but d'étudier la régénération du tissu osseux *in vivo*. En effet, la régénération osseuse est très complexe et nécessite parfois l'utilisation de matériaux de comblements (substituts osseux). Aujourd'hui, les thérapeutiques disponibles consistent à utiliser des substituts osseux, en combinaison avec des tissus autologues, ce qui oblige à de nombreuses ré-interventions chirurgicales lourdes pour le patient. Hormis le besoin en tissu autologues, d'autres limitations sont associées à ces thérapeutiques, dont la non intégration et la nécroses des greffons provenant d'un manque en vascularisation. Dans le pire des cas, il est parfois nécessaire de remplacer une articulation complète par une prothèse. Notre objectif est donc de développer des biomatériaux actifs permettant une revascularisation efficace du tissu osseux et du tissu ostéoarticulaire. Après des études *in vitro* poussées et validées, nous devons étudier *in vivo* les performances des biomatériaux actifs conçus en termes de toxicité pour le futur patient, de compatibilité avec les tissus vivants, et d'efficacité. Notre domaine d'étude nécessite donc d'implanter nos biomatériaux au sein de petits animaux tels que la souris et le rat afin de reproduire au maximum les futures conditions d'utilisation prévues pour leur application en clinique. Le choix des animaux s'est porté sur le modèle de référence classiquement utilisé de la souris, et sur le rat pour la taille des implants dans le cas d'une réparation osseuse en site ostéoarticulaire. Chez la souris, le modèle classiquement utilisé pour étudier la réparation osseuse à partir d'implant se fait en site calvaria (zone pariétale du crane). Chez le rat, le modèle utilisé sera une reconstruction ostéochondrale à partir de lésions intra-articulaire classiquement effectuées au niveau de leur condyle fémoral médial.

Le nombre maximal d'animaux pouvant être utilisé au cours de ce projet a été évalué suivant la règle des "3 R":

1/ "REPLACEMENT". Après des études *in vitro* poussées validant l'efficacité des implants, il est nécessaire de passer à des études *in vivo* étant donné la complexité de l'environnement physiologique osseux et ostéoarticulaire, formés de divers tissus en interaction constante et impossible à reproduire *in vitro* (moelle osseuse, vascularisation, tissus osseux, tissus cartilagineux, cellules du système immunitaire et molécules inflammatoires).

2/ "REDUCTION" des effectifs par une approche statistique adéquate et à l'utilisation de modèles standards. Etant donné le nombre d'analyses nécessaires (imageries, étude des protéines exprimées, étude de la minéralisation, étude des propriétés mécaniques) et afin de valider les résultats, le nombre maximum d'animaux a été évalué à 540 souris et 135 rats pour 5 ans. Le test statistique utilisé pour toutes les expérimentations prévues sera le test de Kruskal-Wallis. De plus, uniquement les implants validés chez la souris, pour une réparation osseuse (site osseux) seront testés pour une réparation ostéoarticulaire (site ostéoarticulaire) chez le rat, d'où la réduction du nombre maximum de rats évalué pour ces études.

3/ "RAFFINEMENT" prenant en compte le bien-être des animaux. Tous les actes chirurgicaux seront réalisés sous anesthésie générale par injection intra-péritonéale de Kétamine et Xylazine. Une anesthésie locale pour réduire la douleur post-opératoire sera effectuée par injection de Lidocaïne au site implanté. Le réveil complet des animaux sera activement surveillé le jour de l'intervention et le suivi journalier de leur bien-être sera ensuite mis en place. Compte tenu des potentiels douleurs pouvant être générées suite aux actes chirurgicaux en site ostéoarticulaire chez le rat, une prise en charge de celle-ci sera effectuée (administration d'antalgique de Meloxicam). Les rongeurs seront hébergés au sein de l'animalerie centrale en conditions standards de température (22°C), d'hygrométrie (+/-55%), de ventilation d'air, et d'éclairage (12H/jour). Les animaux Nudes (immunodéprimés) seront hébergés dans les mêmes conditions, au sein de portoirs ventilées, dans des cages stériles protégées de l'air extérieur par filtres. Si les animaux implantés au cours de l'étude présentent des signes précoces de douleur, d'inconfort ou de détresse (changements de comportement: animal prostré et isolé du reste du groupe, perte de poids et d'appétit, variations de leur apparence physique: anomalie cicatricielle observée au niveau des points de sutures, puis une boiterie prononcée et prolongée et/ou un gonflement de l'articulation en cas d'implantation intra-articulaire), l'expérimentation sera stoppée. Ces potentiels signes de douleurs seront évalués et scorés à partir d'un tableau de référence, permettant de juger si l'animal devra être euthanasié pour stopper l'expérience.

5642. Une des caractéristiques du langage humain est le fait qu'il repose sur un apprentissage social de vocalisation, c'est à dire sur la capacité de modifier les sons produits en fonction de l'environnement social et de la pratique sensorimotrice exercée. Jusqu'à présent, les techniques d'imagerie cérébrale ont permis de montrer que certaines régions cérébrales sont spécifiquement activées lors de la production ou de la perception de mots, soulevant la question d'un potentiel rôle d'un système de neurones miroirs au sein de

ces régions cérébrales dans l'apprentissage du langage. Au-delà de ces activations générales de structures cérébrales, la question du traitement neuronal réalisé au sein de ces régions est peu abordée, faute de techniques qui le permettraient.

Dans ce cadre, les oiseaux chanteurs sont actuellement considérés comme un modèle animal d'étude des bases neurales du langage. Comme les humains, ils apprennent à produire des séries de signaux acoustiques complexes constituant leur chant. Les oiseaux chanteurs possèdent un réseau de structures cérébrales impliquées dans l'apprentissage, la perception et la production du chant. Parmi certaines de ces régions ont été identifiés des neurones miroirs chez des oiseaux adultes. Afin de déterminer si l'apprentissage du chant des oiseaux nécessite la mise en jeu de neurones miroirs et afin de mieux comprendre les facteurs influençant l'évolution de leurs propriétés audio-motrices, nous nous proposons d'étudier chez le diamant mandarin comment s'opèrent le traitement moteur et sensoriel des vocalisations produites et perçues.

Le choix du modèle animal est lié au fait que, chez peu d'espèces animales, les individus sont capables d'imiter les vocalisations de leurs congénères. Parmi les espèces qui montrent de telles capacités figurent les oiseaux chanteurs. Des études comportementales ont, en effet, montré que des oisillons apprennent à imiter le chant d'un tuteur, généralement le père chez le diamant mandarin. Nous suivrons exactement la méthodologie utilisée dans ces études comportementales déjà publiées. Au cours de ces dernières années, des études neuro-anatomiques se sont intéressées au cerveau des diamants mandarins, un atlas stéréotaxique des différentes régions cérébrales impliquées dans le comportement de chant a été mis au point, ce qui nous permet de cibler nos études sur ces régions et ainsi de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les expérimentations seront conduites sur un petit nombre d'oiseaux à la fois ce qui permettra d'adapter le protocole expérimental au fur et à mesure et de ne collecter que le nombre de données nécessaires pour obtenir suffisamment de puissance statistique pour les résultats. Nos expérimentations impliqueront un maximum de 100 oiseaux répartis dans 6 groupes d'étude différents. De plus, l'utilisation de systèmes d'enregistrement multi-électrodes et multi-sites qui permettent d'enregistrer simultanément l'activité de plusieurs neurones et le développement de nouvelles méthodes d'analyse de l'activité neuronale nous permettent d'obtenir un très grand nombre de données à partir d'un nombre réduit d'oiseaux. L'étude de la communication vocale des oiseaux nécessite qu'ils soient dans les meilleures conditions. Les oiseaux seront contrôlés au quotidien afin d'évaluer les niveaux potentiels de douleur et de souffrance. Un antalgique sera administré lors des anesthésies chirurgicales et tant que des signes extérieurs de douleur seront observés.

5643. Le virus Ebola provoque une maladie aigüe et grave, souvent mortelle. En mars 2014, l'Afrique de l'ouest et en particulier, la Guinée, la Sierra Leone et le Libéria, a été touchée par une flambée épidémique à virus Ebola avec plus de 11 000 décès recensés. En l'absence de traitement, les soins de soutien précoces axés sur la réhydratation et le traitement des symptômes spécifiques ont montré un effet positif sur l'amélioration du taux de survie.

Parallèlement à l'évaluation de vaccins ou de traitements par l'utilisation de molécules antivirales, ou de cocktail d'anticorps, nous souhaitons améliorer le traitement de soutien dont l'effet positif a été observé au cours de la flambée de 2014.

L'hypothèse de travail est que le plasma administré précocement et de façon répétée contrecarre les deux mécanismes physiopathologiques à l'origine des manifestations hémorragiques de la maladie à virus Ebola. Le plasma a un rôle majeur dans le transport de substances d'un point à un autre du corps. Il est un milieu riche en protéine et apporte des molécules protectrices de l'organisme, de molécules messagères (hormones).

L'objectif est de remplacer le traitement de soutien actuel (sérum physiologique) par un traitement qui en plus du maintien de l'équilibre électrolytique, combattrait l'hémorragie et l'état de choc.

Le macaque est le seul modèle animal sensible à l'infection par la souche sauvage du virus Ebola (remplacement). Dans le cadre de ce projet, l'utilisation des macaques est indispensable à la bonne réalisation des procédures expérimentales.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats interprétables, 15 macaques cynomolgus seront impliqués dans cette expérimentation.

Afin de raffiner l'expérimentation, une attention particulière sera portée sur l'enrichissement alimentaire, l'enrichissement de confort et sur l'enrichissement de stimulation et des mesures appropriées seront prises pour limiter au maximum la contrainte expérimentale.

5644. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la forme la plus fréquente de cancer du foie, deuxième cause de décès lié au cancer dans le monde. L'incidence annuelle du CHC est d'environ 5 % chez un patient cirrhotique et survient majoritairement dans un contexte d'hépatopathie chronique qui est souvent la conséquence d'une réponse inflammatoire exacerbée, suggérant que l'inflammation joue un rôle central dans le développement du CHC. Les traitements curatifs actuels des CHC sont la résection chirurgicale, le traitement par radiofréquence et/ou la transplantation hépatique, cependant moins d'un tiers des patients en sont éligibles. Dans les stades les plus avancés, seul le sorafénib, un inhibiteur de tyrosine kinase est approuvé et ne prolonge la survie des patients que de quelques mois. De plus, de nombreux patients ne répondent pas au sorafénib et, lorsqu'ils répondent, l'émergence de résistance est rapidement observée.

Les CHC sont un groupe de tumeurs hétérogènes de par leur origine cellulaire. Selon le concept des cellules souches cancéreuses (CSC), seul un petit nombre de cellules seraient capables d'initier des tumeurs dans un tissu et leur résistance aux traitements anticancéreux serait responsable des récurrences. Une des origines possibles des CHC pourrait être une dérégulation de la fonction des cellules progénitrices intra-hépatiques (CPIH), présentes à l'état quiescent dans un foie normal, et leur transformation en CSC sous l'influence du microenvironnement inflammatoire lors des hépatopathies chroniques pourrait être l'évènement initiateur de la cancérisation. Notre équipe de recherche a déjà pu démontrer *in vitro*, le rôle de la cytokine interleukine-17 (IL-17) dans i) le processus de transformation de ces CPIH en CSC dans des expérimentations de cultures cellulaires et ii) l'acquisition d'une capacité d'auto-renouvellement dans un modèle de culture tridimensionnelle de sphéroïdes. Pour valider la preuve de concept de la transformation de ces CPIH et dans la continuité des résultats obtenus *in vitro*, il est donc important d'étudier *in vivo* l'effet de l'IL-

17 sur la croissance tumorale dans des expériences de greffes sous-cutanées chez la souris. Pour étudier le rôle du système immunitaire dans la croissance de la tumeur, nous allons réaliser ces expériences de greffe à la fois dans des souris immunocompétentes et immunodéficientes.

Pour cela nous allons utiliser dans cette procédure un nombre total de 140 souris.

Règle des 3Rs (Remplacer, Réduire, Raffiner) :

1/ Remplacer les animaux : Dans la recherche fondamentale des mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogénèse, l'utilisation de modèles de tumeurs *in vivo* est indispensable, surtout lorsque l'on s'intéresse à l'impact du microenvironnement inflammatoire sur le développement tumoral. La transformation des CPIH en CSC induite par l'IL-17 a été démontré *in vitro* dans plusieurs expérimentations, il est donc primordial pour nous de valider cet effet sur un modèle animal afin d'envisager un nouveau traitement ciblant cette cytokine.

2/ Pour réduire le nombre de souris utilisées : nous allons réaliser une procédure pilote utilisant un nombre restreint d'animaux, qui nous permettra i) de déterminer les meilleures conditions expérimentales et ii) de réduire fortement le nombre d'animaux nécessaire dans les expériences de greffe. Un nombre minimum d'animaux est nécessaire dans chaque lot afin de pouvoir valider les résultats de façon statistique. Nous récupérerons un maximum de données sur une même souris (vitesse d'apparition de la tumeur, taille de tumeur et sa caractérisation). Cette méthode nous permettra de réduire le plus possible le nombre de souris utilisées, tout en préservant la qualité de la recherche menée.

3/ Raffiner les méthodes : les souris seront hébergées en petits groupes pour réduire le stress, avec eau et nourriture *ad libitum*. Dans ces expériences de greffe, toutes les étapes du protocole (injection des cellules, mesure de la taille de la tumeur et le prélèvement des organes) seront réalisées après anesthésie des souris. Dès qu'un signe de douleur, angoisse, souffrance est détecté, les souris sont euthanasiées par anesthésie sans réveil.

Le but général de ce projet est de préciser les mécanismes inflammatoires impliqués dans la carcinogénèse hépatique, afin de développer de nouvelles thérapies spécifiques ciblées sur les CSC, pour inhiber la formation des tumeurs et empêcher les récidives.

5645. Afin de respecter le principe énoncé par Russell et Burch en 1959 des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) il a été décidé de limiter l'utilisation des animaux dans la formation de nos étudiants.

Nous avons, pour cela, opté pour des recherches sur simulateurs ou *in vitro*. Toutefois, la phase d'analyse sur l'animal est le seul moyen d'observer concrètement le fonctionnement intégré de l'organisme d'un mammifère.

Les travaux pratiques présentés dans cette saisine ont donc pour but d'initier les étudiants à cette problématique, de leur donner les règles de Bonnes Pratiques de Laboratoire, dans le respect de la réglementation, et de leur apprendre à exécuter un protocole expérimental *in vivo*.

Ce projet s'inscrit dans le cadre de travaux pratiques de physiologie, prévus dans les maquettes de Licence, conformément aux exigences de l'article R214-105 du décret n° 2013-118. Il ne s'adresse qu'à un petit nombre d'étudiants de deuxième année d'enseignement supérieur, inscrits dans un parcours qui débouche notamment sur des carrières de chercheurs.

Si ces travaux pratiques s'adressent à l'ensemble des étudiants inscrits dans l'UE concernée, nous avons décidé de limiter le nombre d'animaux par étudiants (1 animal pour 4 à 5 étudiants). Chaque étudiant sera donc acteur ou spectateur (sans obligation de participation active) des différentes manipulations et expériences réalisées. Le but de ces travaux pratiques étant de mesurer à partir de prélèvements urinaires et sanguins, sur animaux, la clairance rénale.

Pour mener à bien ce projet, un maximum de 30 rats anesthésiés par an soit 150 rats sur 5 ans seront utilisés. Les résultats de l'ensemble des groupes de TP sont regroupés pour être exploités statistiquement de façon pertinente tout en limitant le nombre d'animaux utilisés.

Les expérimentations se font sous anesthésie générale et l'enseignant s'assure du bon niveau d'anesthésie et d'analgésie ainsi que du déroulement correct des manipulations.

Afin d'assurer le bien-être des animaux des points limites ont été établis durant les procédures et un environnement enrichi est assuré lors de l'hébergement dans l'animalerie.

5646. Les traumatismes de la moelle épinière peuvent interrompre la commande nerveuse des muscles respiratoires. A ce jour, aucun traitement n'est disponible chez les patients victimes d'insuffisance respiratoire en dehors de la ventilation mécanique. L'étude de la physiologie respiratoire intégrée nécessite l'utilisation d'animaux vivants. Pour étudier les mécanismes impliqués dans la restauration de cette ventilation, notre équipe a développé un modèle préclinique d'insuffisance respiratoire chez la souris. Un acteur probable impliqué dans cette récupération est le facteur de transcription Nrf2.

Dans le respect de la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement), nous utiliserons un nombre adéquat (450 souris) pour satisfaire les exigences statistiques, de sujets génétiquement modifiés (KO Nrf2) et sauvages afin d'évaluer l'implication de cette protéine dans la récupération respiratoire. Afin de limiter la souffrance en post-opératoire, les animaux reçoivent des AINS et anti-douleurs, ainsi qu'un suivi et une évaluation quotidienne selon la grille de Morton et Griffiths adaptée à nos besoins. Une attention particulière sur la perte éventuelle de poids de l'animal en post-opératoire sera effectuée. Nous utiliserons des activateurs indolores pharmacologiques et non-pharmacologiques administrés de manière non invasive pour moduler l'effet de Nrf2. Ce projet permettra de mettre au point des protocoles thérapeutiques innovants et non-invasifs du traitement de l'insuffisance respiratoire consécutif à une lésion spinale.

5647. RANKL, molécule de la famille des TNF (facteur de nécrose tumorale), est connue pour son rôle dans la formation des ostéoclastes, macrophages spécialisés dans la résorption osseuse. RANKL est sous contrôle d'un inhibiteur OPG (ostéoprotégérine) qui, lui, est sensible à la régulation par l'estrogène, l'hormone sexuelle femelle. En présence de l'estrogène, RANKL est inhibé par la molécule OPG protégeant alors l'os de la résorption. Lors de la baisse en taux d'estrogène, RANKL active de manière incontrôlée la résorption osseuse, provoquant l'ostéoporose. La baisse d'estrogènes advient avec l'âge et plus abruptement lors de la ménopause. RANKL joue aussi un rôle non-négligeable dans la maintenance du système immunitaire, où il contrôle la formation de macrophages qui protègent des infections virales. Malgré la reconnaissance que la masse osseuse est régulée par l'estrogène *via* le couple RANKL-OPG, l'impact de l'hormone sur le système immunitaire par ce même couple n'est pas connu. Nous cherchons donc à étudier l'effet de l'estrogène sur la formation des macrophages du système immunitaire qui est dépendante de RANKL. La manière la plus courante et la plus efficace d'induire une perte d'estrogène chez la souris est l'ovariectomie. Ces tests nécessitent donc trois groupes de souris : un groupe contrôle (sham-operated), un groupe ovariectomisé et un groupe ovariectomisé avec réapprovisionnement par de l'estrogène synthétique (porteur d'un implant sous-cutané d'estrogène). Les groupes seront étudiés à l'âge adulte pour la présence des macrophages dans la rate et les ganglions lymphatiques. Le nombre total de souris est de 80 animaux sur 5 ans. Il n'est pas possible de remplacer les animaux par des expériences en culture cellulaire car l'estrogène n'agit pas directement sur les macrophages mais par des cellules avoisinantes qui ne sont pas clairement identifiées à l'heure actuelle. Nous pouvons utiliser les connaissances rapportées dans la littérature afin de réduire le nombre de souris. L'analyse de nos données sera effectuée par des tests statistiques de type ANOVA/Bonferroni. Les opérations et les prélèvements seront effectués par des personnels compétents. Les animaux seront hébergés en groupe sociaux dans un environnement enrichi (nid, bâtons à ronger) et observés quotidiennement. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement, et la souffrance et/ou le stress durant les procédures invasives sera réduit au maximum par des traitements anesthésiques appropriés (anesthésie générale + locale).

5648. Parmi les thérapies innovantes, l'AB-NCT (Accelerator Based-Neutron Capture Therapy) est une modalité qui émerge difficilement en France. Elle se base sur l'activation de l'élément naturel Bore-10 par des neutrons épidermiques ( $E < 10 \text{keV}$ ). Alors que les physiciens s'attachent à développer des accélérateurs compacts, les biologistes et les chimistes doivent concevoir et évaluer de nouveaux nano-vecteurs de Bore.

Dans le but de combler le retard de la France sur cette technique de thérapie des cancers, nous, biologistes, cherchons à développer de nouveaux nanocomposés à base de bore. Nous allons intégrer du bore naturel à 3 différents types de nanocomposés à base de polysaccharides réticulés connus et validés pour s'accumuler passivement ou spécifiquement au sein des tumeurs. Nous allons évaluer leurs propriétés de pharmacocinétique et leur biodistribution dans 3 modèles pertinents de cancer (mélanome, gliome et cancer des voies aérodigestives supérieures (VADS) grâce à l'imagerie optique proche de l'infrarouge. Ces expériences permettront de déterminer le potentiel des composés pour une expérimentation ultérieure d'efficacité.

Dans ce cadre, les souris nude immunodéficientes représentent le modèle le plus proche de la physiologie humaine, permettant de développer des modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les souris seront hébergées dans un environnement contrôlé dépourvu de germes pathogènes qui permet qu'elles ne souffrent pas de leur défaut d'immunité.

Les souris seront surveillées quotidiennement, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Nous travaillerons sur trois modèles de cancer implantés en sous cutané chez la souris : un mélanome (A375), un cancer VADS (Cal33) et un gliome (U87). Cette approche permettra un suivi simple et bien maîtrisable.

Dans ce projet nous utiliserons 21 souris NMRI pour les tests de pharmacocinétique et 84 NMRI Nude pour chacun des 3 modèles tumoraux, soit un total de 273 souris, correspondant au nombre minimum d'animaux nécessaires pour une étude fiable des différents résultats, conformément à la règle des 3R :

Remplacer : Les précédentes études *in vivo* ont permis de réduire le nombre de composés à évaluer : seuls les composés très bien tolérés et s'accumulant fortement dans les tumeurs sont évalués. Les paramètres de biodistribution des nouveaux composés sont obtenus uniquement par l'emploi d'animaux. Cette étude préclinique est nécessaire avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme.

Réduire : L'approche statistique et notre expérience nous permettent de réduire le nombre d'animaux au minimum afin d'obtenir des résultats exploitables. 12 animaux (biodistribution) par condition permettent une analyse fiable prenant en compte les variabilités inter-individu. 3 animaux sains par condition serviront pour l'étude de la pharmacocinétique sanguine.

Raffiner : Nous utiliserons des souris NMRI Nude, qui représentent le modèle le plus proche de la physiopathologie humaine, permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux, dans un environnement contrôlé dépourvu de pathogènes, enrichi avec des tunnels en carton et morceaux de papier pour y faire un nid. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies *ad libitum*. La croissance des tumeurs sous cutanées n'entraîne pas de gêne de mobilité et sera suivie par mesure au pied à coulisse. Le niveau de sévérité de ces expérimentations est léger. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux garantiront leur bien-être, et nous permettront d'intervenir immédiatement de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

5649. A l'aide d'approche *in vitro* (tests cellulaires sur 4 lignées tumorales, analyses moléculaires), nous avons identifié une molécule biologique, appelée miR-4510, qui agit comme un gène suppresseur de tumeur dans le cancer du foie chez l'adulte et chez l'enfant. Cette molécule inhibe l'activité de plusieurs oncogènes (GPC3, CDK1/2/6, Bcl-XL, TCF4...) et bloque la croissance des cellules tumorales tout en induisant leur mort par apoptose. Ces résultats soulignent l'intérêt potentiel de cette molécule en clinique. Les

résultats *in vitro* ont fait l'objet d'un brevet. Ce projet est également soutenu par un programme qui vise à accélérer le transfert de molécules thérapeutiques vers les industriels et les patients à travers des études précliniques puis des essais cliniques.

Le but de ce projet est de confirmer que miR-4510 est bien capable de bloquer la croissance tumorale et d'induire la mort des cellules cancéreuses du foie par apoptose dans un modèle *in vivo* chez la souris. L'évaluation du potentiel thérapeutique de miR-4510 sera comparée à celle d'un petit ARN contrôlé.

Pour répondre à cette question, nous utiliserons le modèle de xénogreffe sous-cutanée de cellules tumorales de carcinome hépatocellulaire chez la souris immunodéprimée. La lignée cellulaire utilisée sera la lignée cancéreuse hépatique « Hep3B » pour sa pertinence comme modèle cellulaire et la bonne reproductibilité des tumeurs sous-cutanées qui se développent chez la souris à partir de ces cellules.

Pour réaliser l'ensemble de nos expériences, nous demandons l'utilisation de 40 animaux.

Dans le respect de la règle des 3R, nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux.

Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance jusqu'à leur mort. Toute procédure légère ou modérée (aucune sévère prévue dans ce projet) sera réalisée sous anesthésie et sous surveillance attentive des animaux dans un environnement enrichi et adapté aux animaux. L'estimation de la souffrance est réalisée quotidiennement par le personnel de l'animalerie. Au-delà du score défini (14), l'animal sera euthanasié par dislocation cervicale sans attendre. De façon plus précise, si le score est inférieur à 5, les animaux sont surveillés sans autre intervention. Si le score est entre 5 et 10, les animaux seront surveillés de près et nous considérerons la prise d'analgésique comme une option pour limiter au maximum les souffrances éventuelles sans perturber les mesures. Si le score est entre 10-14, ce sera le signe d'une souffrance de l'animal évidente. Un deuxième avis sera demandé auprès d'un chercheur ayant utilisé ce même modèle et les moyens pour palier la souffrance seront mis en place par le biais d'analgésiques. Si le score s'améliore, les expérimentations seront maintenues. Dans le cas contraire, les animaux seront euthanasiés par dislocation cervicale sans attendre.

5650. Depuis une quarantaine d'années, les populations d'ongulés sauvages ont fortement augmenté en France métropolitaine, avec pour corollaire une expansion géographique et un élargissement de l'aire de présence de ces ongulés. Le cas du chevreuil est probant, espèce forestière à l'origine, il occupe actuellement tous les types d'habitats disponibles, on le trouve même en secteur périurbain. Une telle présence dans des milieux plus ou moins anthropisés s'est traduite par la recrudescence de nuisances telles des dégâts agricoles, sylvicoles ainsi que par l'augmentation des collisions qui génèrent un coût économique non négligeable. Cette présence a aussi exacerbé les conflits d'intérêts entre les gestionnaires forestiers, les agriculteurs et les gestionnaires de la faune sauvage. Par ailleurs, ces espèces sauvages sont aussi suspectées de véhiculer des pathogènes transmissibles au bétail, voire à l'Homme (maladie de Lyme). Compte tenu que ces populations ont évolué dans un environnement privé de grands prédateurs, régulateurs naturels, c'est aux gestionnaires de la faune sauvage qu'incombe ce rôle. La nécessité de cette gestion implique d'une part de sérieuses connaissances fondamentales sur l'écologie et la dynamique de ces espèces de l'individu jusqu'à la population, mais aussi la mise au point d'outils d'aide à la gestion. Si des connaissances sur la dynamique des populations de chevreuils et leur gestion existent pour les populations forestières, de sérieuses lacunes persistent en ce qui concerne les populations extra-forestières fréquentant l'agroécosystème. Afin d'étudier le comportement de l'animal en relation avec son environnement (occupation et utilisation de l'habitat, dispersion des jeunes au sein de métapopulations, inter-relations entre la faune sauvage et le cheptel domestique...) il est indispensable de capturer des individus sauvages, de les équiper de colliers émetteurs et de les relâcher dans leur milieu de vie habituel. Les objectifs appliqués de ce programme d'études concernent les outils de suivi et de gestion des populations, leurs impacts sur les productions agricoles et sylvicoles ainsi que sur la biodiversité. Il implique donc la capture de chevreuils sauvages de différentes catégories d'âges et de sexes vivant dans des environnements présentant un gradient d'anthropisation, de la forêt jusqu'aux espaces agricoles. Ainsi sur 5 années, au maximum 300 chevreuils adultes, juvéniles ou jeunes sont capturés en hiver et 150 faons sont capturés en été.

Six opérations de captures hivernales sont réalisées annuellement, il s'agit de battues qui poussent les chevreuils vers des filets verticaux. C'est une méthode de capture éprouvée qui présente l'avantage de ne pas être sélective. Nous capturons de 40 à 60 chevreuils chaque année. Un personnel formé et expérimenté intervient pour assurer la contention des animaux. L'injection intramusculaire d'un tranquillisant permet ensuite une manipulation en toute sécurité. Chaque animal est placé dans une caisse individuelle, obscure et aérée, spécialement adaptée à cette espèce. Ce séjour en caisse (de deux à quatre heures), sous la surveillance d'un observateur qui note le comportement post-capture et à l'écart de toute agitation, permet à l'animal de se reposer et de réduire son niveau de stress. Il est important de préciser que le personnel du laboratoire est largement expérimenté dans le domaine de la capture et de la manipulation des ongulés sauvages et qu'il est particulièrement sensible au bien-être animal. Après la pesée en caisse, chaque chevreuil est maintenu par trois intervenants sur une table aménagée, un monitoring continu de points critiques (température corporelle par exemple) permet de s'assurer de son bien-être. Dans le même temps, un technicien expérimenté procède à un examen visuel et réalise l'intégralité des prélèvements (crottes, poils, sang, tiques, peau au niveau de l'oreille). Peu invasifs, ces prélèvements individuels permettent un suivi sanitaire (présence d'agents pathogènes) et l'estimation du niveau de stress perçu par l'individu dans son milieu de vie (dosage du taux de cortisol dans le sang, les fèces et les poils). Avant d'être relâché dans son milieu de vie habituel, chaque individu est identifié par la pose de boucles auriculaires numérotées et d'un transpondeur sous-cutané (puce RFID), permettant ainsi une identification certaine lors d'une éventuelle capture ultérieure, et la plupart des individus sont équipés de colliers émetteurs (GPS ou VHF) qui permettent de suivre leur comportement spatial. La durée de manipulation d'un individu est de 10 à 12 mn.

Une autre facette du programme repose sur la capture et le suivi télémétrique de faons. Ces animaux sont capturés en mai-juin, avant l'âge de 15 jours, durant la phase "apathique" de leur ontogenèse, ce qui autorise une manipulation en toute sérénité (pas de tentative de fuite, ni d'agitation). Afin de ne pas compromettre leur devenir, les faons sont manipulés avec d'innombrables précautions, en respectant

des critères d'âge et de poids. La plupart du temps la capture est consécutive à une tétée. En quelques minutes, les faons sont pesés, mesurés, sexés, identifiés avec une bague auriculaire, équipés de mini-colliers VHF extensibles et reposés sur place. De 20 à 30 faons seront capturés chaque année.

Cette étude respecte la règle des trois R. S'agissant d'une espèce d'ongulé sauvage, le remplacement est inenvisageable. Le nombre de chevreuils capturés annuellement par classe d'âges de sexes et d'habitat étant aléatoire, une réduction est difficilement possible. De plus, pour appréhender la variabilité de comportement de cette espèce très plastique, il est nécessaire de suivre des individus dans différents milieux (6 sites de captures caractéristiques d'un gradient paysager d'ouverture du milieu). Enfin, concernant le raffinement, nous veillons à minimiser au maximum le stress lié à l'expérimentation : injection d'un calmant lors des captures hivernales, manipulation rapide réalisée par du personnel formé et habitué, et surveillance des animaux de la capture au relâcher dans leur environnement de vie habituel.

5651. La Besnoitiose est une maladie des bovins due à un parasite unicellulaire *Besnoitia besnoiti* en expansion en France et en Europe depuis le début des années 1990. Il n'existe pas de vaccin ou de traitement actuellement en Europe. Elle est responsable notamment de mortalité, d'avortement et, chez les taureaux, de stérilité transitoire ou définitive. Elle affecte gravement le bien-être animal ainsi que l'économie de l'élevage, menaçant ainsi les exportations de bovins à l'étranger. Bien que l'agent ait été identifié depuis 1912, l'épidémiologie et la transmission de ce parasite demeurent peu connues et étudiées. Il est désormais bien établi que l'introduction d'un bovin porteur de parasite entraîne dans les mois qui suivent une dissémination du parasite à la quasi-totalité du cheptel de l'élevage. Toutefois, les voies de contamination ne sont pas clairement élucidées. Des travaux effectués en Afrique du Sud en 1960-1970 montrent que les insectes piqueurs se nourrissant de sang sont capables d'infecter les bovins par leurs pièces buccales contaminées par le parasite comme pourrait le faire une seringue souillée. Les pièces buccales traversent la peau à la recherche des vaisseaux sanguins, perçant les kystes gros comme des têtes d'épingle, et se contaminant dès lors avec ce parasite microscopique présent par milliers dans les kystes. Le parasite peut être présent dans le sang également et ingéré par l'insecte pendant son repas de sang. Le Lapin est également très réceptif et sensible à l'infection par *Besnoitia besnoiti* comme il a été expérimentalement observé en Afrique du Sud par ces mêmes chercheurs.

Ces recherches n'ont jamais été depuis répétées. Il demeure ainsi des incertitudes sur les capacités vectorielles des mouches piqueuses à transmettre le parasite et cette voie de contamination ne trouve pas un consensus au sein des équipes travaillant sur la besnoitiose bovine. Les bovins sont piqués quotidiennement par diverses espèces d'insectes. Parmi celles-ci, *Stomoxys calcitrans* appelée également mouche d'étable ou stomoxe est une espèce cosmopolite, très commune et soupçonnée très fortement dans la transmission locale du parasite.

Ce projet vise à démontrer la capacité du stomoxe à transmettre ce parasite. Le parasite existe sous deux formes infectantes chez l'animal (forme 1 se disséminant dans le sang, forme 2 présente dans des kystes de la peau) et d'autre part la salive des stomoxes est susceptible d'entraîner des réactions locales et générales. Aussi, quatre groupes de 5 lapins seront utilisés après une habitude de 3 semaines à la manipulation et à la contention : 1 groupe infecté par la forme 1 *via* la piqûre des stomoxes (la dose infectante est déterminée d'après les données de la littérature), 1 groupe infecté par la forme 2 *via* la piqûre des stomoxes, 1 groupe exposé à la piqûre uniquement des mouches (étude des effets de la salive des stomoxes), 1 groupe témoin servant de référence. En cas de réussite de l'infection par les stomoxes, un épisode de fièvre d'environ 15 jours est attendu. Les animaux feront l'objet d'une surveillance sanitaire quotidienne par une équipe vétérinaire. Un suivi sanguin bihebdomadaire initialement puis hebdomadaire après 3 semaines permettra de détecter d'éventuelles conséquences biologiques de l'infection expérimentale, le suivi de la réponse immunitaire et la dissémination du parasite. Les points limites seront précisément définis pour que les animaux soient traités ou euthanasiés avant que la souffrance ait atteint un seuil non acceptable.

Cette expérimentation se place dans le respect des principes éthiques des 3 R.

Remplacement : il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant l'obtention du parasite sous sa forme de kystes (démontrant une installation pérenne et viable du parasite chez son hôte) dans la peau et différents organes. Expérimentalement, il est largement plus aisé de reproduire le cortège des symptômes chez le Lapin que chez les bovins. Aussi, ce projet requiert le recours à l'expérimentation animale.

Réduction : le nombre d'animaux utilisés est le plus faible possible tout en permettant l'obtention de résultats statistiquement robustes.

Raffinement : les lapins seront maintenus dans des cages individuelles respectant les normes réglementaires et disposant d'eau de nourriture à volonté. Les cages sont enrichies pour améliorer le bien-être des animaux (plateforme de repos, pain sec à ronger).

5652. Les cellules NK (Natural Killer) sont des lymphocytes de l'immunité innée connus pour leur rôle au cours des réponses anti-tumorales. Ces cellules sont en effet capables de reconnaître et d'éliminer les cellules tumorales grâce à des récepteurs membranaires. Cependant, la stimulation chronique de ces récepteurs par les cellules tumorales conduit à l'épuisement des cellules NK, c'est à dire à la perte de leur fonction. Cette situation explique que de nombreuses tumeurs échappent au contrôle exercé par les cellules NK. Restaurer la fonction des NK et ainsi leur contrôle sur la tumeur, est donc un objectif de portée thérapeutique. Cela nécessite au préalable de connaître les mécanismes présidant à l'induction de l'épuisement ainsi que les voies altérées dans les cellules épuisées afin de pouvoir les contrecarrer et identifier de potentielles cibles thérapeutiques. Ce projet se propose donc de reproduire *in vivo* chez la souris l'induction de l'épuisement des cellules NK en contexte tumoral *via* l'utilisation de différents modèles tumoraux que nous souhaitons développer et mettre au point. Cet objectif sera poursuivi à l'aide de modèles de souris transgéniques ou en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques des voies dérégulées. Ce type de projet nécessite l'utilisation de modèles animaux, le nombre

d'acteurs cellulaires et moléculaires mis en jeu étant trop nombreux et leurs interactions trop complexes pour pouvoir être modélisés *in vitro*. Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Ainsi, le nombre d'animaux nécessaires a été calculé de façon à apporter des réponses statistiquement fiables tout en évitant des mises à mort inutiles. Afin d'optimiser le nombre d'animaux utilisés (396), des techniques de pointe permettant la mesure précise de l'activation des voies de signalisation dans les cellules (cytométrie en flux multiparamétrique, cytométrie d'image) seront utilisés. Par ailleurs, la douleur et l'angoisse causées aux animaux seront évaluées et réduites à chaque fois que cela sera possible. Nous avons défini des points limite au-delà desquels les animaux seront mis à mort.

5653. Les maladies cérébrales liées à l'âge sont un problème majeur de santé publique en raison de l'allongement de l'espérance de vie. Parmi elles la maladie de Parkinson, la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer, a des conséquences considérables en termes de coût et de qualité de vie des patients et de leur entourage. Le diagnostic de la maladie de Parkinson est tardif, les premiers symptômes n'apparaissant que lorsque plus de 50% des neurones dopaminergiques ont dégénéré. Les traitements actuels sont exclusivement symptomatiques, améliorent les symptômes moteurs, mais sont incapables d'empêcher l'aggravation de la maladie. Des recherches intensives visent à obtenir des traitements curatifs, de type neuroprotecteurs ou neuro réparateurs, qui n'auront d'intérêt que mis en place dans les stades précoces de la maladie. Le diagnostic précoce de la maladie de Parkinson est ainsi une nécessité, non satisfaite à ce jour, pour laquelle la méthode d'imagerie est la plus adaptée. L'objectif du projet est de développer de nouveaux outils de détections en imagerie, qui pourront à terme être utilisés en clinique pour le diagnostic précoce et le suivi de traitements de la maladie de Parkinson. Ces nouveaux outils devront être capables de se lier aux agrégats de protéines anormales (alpha-synucléine), qui s'accumulent dans le cerveau des patients au cours de l'évolution de la maladie. Ce projet concerne l'évaluation de ces outils avant de pouvoir les proposer en clinique. Pour répondre à cette question, nous utilisons un modèle murin de la maladie de Parkinson basé sur la propagation de l'alpha-synucléine mal conformée.

Ce projet nécessite pendant 2 ans, l'utilisation de 48 animaux dont 24 souris mâles inoculées avec cette protéine mal conformée (appelée aussi corps de Lewy) et 24 souris mâles témoins inoculées avec de l'albumine sérique bovine.

Remplacement :

Cette étude de caractérisation *in vivo* sur des rongeurs ne peut être substituée par une méthode alternative *in vitro* ou sur cellules. En effet, le traceur doit être capable de franchir la barrière hémato encéphalique pour se fixer aux agrégats cérébraux, après une injection en intra-veineuse.

Réduction :

L'utilisation de l'imagerie permet de réaliser une cinétique d'accumulation du traceur dans différentes régions cérébrales et à différents temps (par exemple, suivi d'un animal durant 180 min). Sans cette technique il faudrait euthanasier plusieurs animaux à différents temps (par exemple à 30, 60, 120 et 180 min).

Les cerveaux des animaux passés en imagerie seront ensuite utilisés pour des analyses d'immunohistochimie et d'autoradiographie pour confirmer la présence des agrégats protéiques d' $\alpha$ -syn.

Raffinement :

Les souris seront hébergées en groupes sociaux (6 souris par cage) dans des cages de 800 cm<sup>2</sup>. Afin d'encourager l'exploration, les animaux auront un enrichissement varié (nids, tunnels en plastique, maisons). La surveillance des souris est assurée quotidiennement par des techniciens qui signaleront tout problème aux expérimentateurs. Des critères de bien-être seront évalués :

- Apparence : poils ébouriffé, dos vouté, présence de blessures dues à des bagarres entre congénères, lésions cutanées.
- Comportementale : agressivité ou prostré
- Physiologique : respiration accélérée et saccadée

5654. Le virus de la Peste aviaire (Grippe aviaire) est responsable de pertes animales importantes, d'un risque zoonotique et de graves pertes économiques non seulement au sein de l'Union Européenne, mais également à l'échelle mondiale. Le virus de la Peste aviaire ou Influenza est très contagieux. Il est, en temps normal, absent du territoire français et est étroitement contrôlé pour prévenir son apparition et une éventuelle contamination des troupeaux. En cas d'apparition du virus, et sous certaines conditions, la réglementation prévoit la possibilité de limiter sa dissémination par l'administration d'agents préventifs. L'administration de ces agents requiert de garantir son innocuité, l'absence d'interférence avec le diagnostic de la Grippe aviaire et son effet protecteur sur les animaux. Une stratégie de lutte consiste à développer un agent immunostimulant indépendant du virus de la grippe qui pourrait combiner tous ces avantages.

Notre laboratoire développe un immunostimulant capable d'activer rapidement le système immunitaire des animaux afin de prévenir le développement des maladies infectieuses. La capacité de ce candidat-produit à activer le système immunitaire a été initialement démontré *in vitro* et *in vivo* dans deux espèces : le mouton et la poule domestique. L'objectif de ce projet est d'établir la preuve de l'efficacité de ce produit comme agent préventif de la peste aviaire induite par le virus H7N1 (Grippe aviaire).

Afin d'établir la preuve d'efficacité de notre produit, nous devons donc conduire un test préclinique sur l'espèce cible, la poule domestique. Ces expérimentations seront réalisées sur une période de 12 mois, et nécessiteront un maximum de 104 animaux.

Dans le strict respect de la règle des trois R, toutes les mesures possibles de remplacement, de réduction et de raffinement ont été employées.

Remplacement

Toutes les mesures de « remplacement » ont été considérées au préalable à cette expérimentation. Néanmoins, ce projet ne peut être traité seulement *in vitro* pour plusieurs raisons : d'une part, la maturation du système immunitaire requiert la libre interaction entre les cellules du système immunitaire et l'agent immunostimulant, processus qui ne pourrait être modélisé facilement *in vitro*, d'autre

part, la résistance ou la sensibilité à une infection fait intervenir des signes cliniques et la fonction de différents organes de l'animal qui ne sauraient être résumés à un test d'infectivité *in vitro*.

#### Réduction

Le nombre d'animaux inclus dans le protocole a été réduit « Réduction » à son minimum grâce à un plan d'expérience optimisé pour obtenir le maximum de données scientifiques, tout en maintenant une validité statistique suffisante du modèle pour garantir l'interprétabilité des résultats.

#### Raffinement

La méthodologie expérimentale a, elle aussi, été raffinée à son maximum par l'utilisation de méthodes analytiques sensibles et reproductibles qui limitent, *in fine*, le nombre d'animaux inclus dans l'étude. De plus, pour limiter le stress et améliorer la qualité de l'expérience, les animaux seront élevés avec soin en présence d'un enrichissement à base de jouet et aucun prélèvement « vigile » n'est prévu, car ils auraient pu induire un stress ou une douleur pour l'animal.

La sévérité du modèle est dépendante de la souche de la grippe aviaire employée. Elle est considérée modérée à forte dans ce projet (virus H7N1). En fin d'expérimentation, le maximum de prélèvement sera effectué afin de limiter le risque d'avoir à reconduire une seconde expérience. Les études seront menées en tenant compte des besoins éthologiques des volailles, en limitant leur stress et la souffrance animale au maximum.

5655. Les maladies induisant des pertes de tissu osseux, comme les ostéosarcomes, les pseudarthroses ou encore l'ostéoporose, touchent un nombre croissant de personnes dans le monde et constituent un problème de santé publique majeur. A l'échelle mondiale, plus de deux millions de greffes osseuses sont réalisées annuellement afin de combler des défauts osseux en chirurgie orthopédique, neurochirurgie et chirurgie dentaire. De nombreuses solutions thérapeutiques existent actuellement pour favoriser la régénération osseuse, mais elles présentent toutes des limites et des risques (prélèvement site donneur, comorbidité, contamination, rejet de greffe...). Un des challenges majeurs de l'ingénierie tissulaire osseuse est de générer de nouveaux substituts osseux aux propriétés optimisées. L'une des améliorations à apporter à ces produits consiste à favoriser leur vascularisation rapide après implantation afin de promouvoir leur intégration et limiter le risque de nécrose. Des études menées au laboratoire ont suggéré que la culture de cellules vasculaires et osseuses pourrait favoriser la prévascularisation du substitut et son ostéointégration. D'autres travaux ont montré que le microenvironnement créé par l'assemblage de cellules et de matrice leur servant de support conditionnait fortement le devenir de ces cellules et l'efficacité thérapeutique des substituts. Afin de mieux contrôler l'assemblage en trois dimensions des différents éléments constitutifs des produits d'ingénierie tissulaire, des technologies de bio-impression se sont développées. Parmi elles, la Bioimpression Assistée par Laser (LAB) présente des atouts majeurs tels qu'une grande vitesse d'écriture, une viabilité des cellules élevée et une haute résolution.

La station de bioimpression développée par le laboratoire permet l'impression de cellules vivantes *in vitro*, de manière sécurisée, stérile et sous le contrôle d'un processus automatisé. Elle permet également d'imprimer des biomatériaux avec une résolution micrométrique. Des expérimentations menées au laboratoire ont démontré la faisabilité de l'impression *in vivo*, et son intérêt dans la régénération osseuse guidée *in situ* par l'impression de cellules associées à des biomatériaux. Les résultats présentaient cependant une grande hétérogénéité sûrement liée à un défaut de vascularisation précoce.

L'objectif général des nouvelles expérimentations envisagées est d'étudier l'influence du motif imprimé (cellules vasculaires) sur la vascularisation et la réparation osseuse, en s'appuyant sur des modèles *in vitro* obtenus par LAB mis au point dans notre laboratoire. Des cellules primaires humaines fluorescentes ou bioluminescentes seront imprimées par LAB *in situ* au niveau de lésions osseuses critiques du calvarium chez des souris immunodéficientes. Ce modèle permet de réaliser un suivi longitudinal des cellules du fait de sa position superficielle: quantification et localisation des cellules par la mesure de la fluorescence ou de la bioluminescence (Caméra CCD, Lumina LT, plate-forme VIVOPTIC ; loupe binoculaire à fluorescence ; imagerie microscopique *in vivo* par endomicroscopie confocale). Un microscanner (projet d'achat en cours) permettra également d'imager *in vivo* la réparation osseuse, sans sacrifier les souris. Les informations recueillies par ces méthodes non invasives seront complétées par des analyses sur tissus prélevés après euthanasie des animaux. La vascularisation, qui ne peut être évaluée actuellement par des méthodes non invasives, sera étudiée à 1 semaine et 2 mois sur biopsies par immuno-histochimie. Les caractéristiques fines (matrice extracellulaire, présence d'ostéoblastes et d'ostéoclastes) du tissu osseux formé seront évaluées à 2 mois (point final).

Remplacement : aucune méthode *in vitro* ne permet d'étudier simultanément la vascularisation et la formation osseuse induites par des produits d'ingénierie tissulaire en trois dimensions avec un régime de flux dynamique. Réduction : ces expériences sont conçues pour limiter le nombre d'animaux à 10 pour chacune des 4 conditions expérimentales, en utilisant des tailles de groupes basées sur des travaux antérieurs. De plus, 10 souris seront nécessaires pour une étude préliminaire visant à déterminer la taille de défaut critique, et 12 souris (3 par condition expérimentale) seront destinées à être sacrifiées à des temps plus précoces. Au total, 62 souris seront utilisées. Les méthodes d'imagerie utilisées permettent de réduire significativement le nombre d'animaux, pour le suivi des cellules et de la formation osseuse. Raffinement : Une analgésie adaptée (Buprénorphine, 0.1mg/kg injectés par voie intrapéritonéale) sera appliquée en pré- et post-opératoire ainsi que des conditions de stabulation appropriées (isolement des animaux jusqu'à cicatrisation de la suture cutanée de façon à éviter la réouverture de l'incision). Les souris seront ensuite replacées en fratrie avec des conditions d'hébergement et un milieu d'enrichissement adaptés, favorables au bien-être de l'animal (coton pour nidification, litière avec copeaux de peuplier, tuyaux pour jouer).

5656. Le terme immunothérapie regroupe des stratégies thérapeutiques très différentes selon qu'elles mobilisent ou renforcent les ressources du système immunitaire du malade (immunothérapie active) ou au contraire qu'elles utilisent des réactifs immunologiques apportés de l'extérieur (immunothérapie passive).

La réponse immunitaire humorale correspond à la production de cellules lymphocytaires B, spécifiques d'un antigène donné (agent microbien, virus, produits de cellules cancéreuses), qui patrouillent l'organisme afin de détecter l'intrusion de pathogènes ou cellules anormales dans le corps. La reconnaissance par ces cellules B de l'antigène se fait *via* un anticorps exprimé à la surface de ces cellules. La rencontre avec un antigène spécifique induit l'activation de ces cellules qui ont la possibilité de se différencier en cellules appelées plasmocytes : ces plasmocytes produisent alors la forme sécrétée de l'anticorps. Les fonctions des anticorps sont multiples et indispensables pour détruire les envahisseurs, seuls ou avec l'aide des autres cellules du système immunitaire. Certaines cellules appelées cellules B mémoires, ont la capacité de perdurer tout au long de la vie de l'individu et permettent une protection à long terme. La vaccination consiste à injecter des formes non dangereuses d'un pathogène à un organisme afin d'éduquer sa réponse immunitaire mémoire et de produire des cellules qui seront alors capables de réagir le moment voulu. Parallèlement, une autre stratégie d'immunothérapie consiste à injecter directement des anticorps monoclonaux très efficaces dirigés contre l'antigène d'intérêt, cette stratégie permet d'induire une protection plus rapide mais sans induire de mémoire immunitaire. L'objectif de ce projet est de caractériser une nouvelle forme d'immunothérapie par transfert de gène : les cellules seront programmées par thérapie génique pour exprimer un anticorps monoclonal d'intérêt. Les cellules B ainsi modifiées pourront tout d'abord produire la forme membranaire de l'anticorps. Lorsqu'elles seront en contact avec la cible (virus ou cellules cancéreuses), elles auront la possibilité de donner les cellules productrices de l'anticorps solubles, et de permettre aux patients de se défendre de manière active contre l'agent infectieux/cancéreux. Il s'agit d'une vaccination thérapeutique par thérapie génique, l'anticorps est choisi pour ses capacités à neutraliser très efficacement la cible. Cette stratégie combine donc l'effet à long terme d'une vaccination « classique » et le choix de l'anticorps en termes d'efficacité. Les vecteurs de transfert de gène ont été validés *in vitro* sur des cellules B, et ce projet a pour but de valider l'efficacité de cette stratégie dans un modèle murin, où l'ensemble des composants du système immunitaire est présent et avec lequel il est possible de mimer une infection pour suivre la réponse des cellules programmées.

Ce projet a été dessiné en 6 procédures, le nombre de souris utilisé dans chacune des procédures sera réduit à son minimum sans pour autant compromettre les objectifs du projet ni les interprétations statistiques des résultats. Le nombre maximal d'animaux est estimé à 1570 souris.

Les techniques utilisées minimiseront la souffrance animale (utilisations d'anesthésique et d'analgésique). Un suivi adapté des animaux et la définition de points limites précoces et prédictifs de l'apparition d'un mal être permettent de limiter au maximum toute souffrance animale.

5657. Le diagnostic précis et précoce des tumeurs, ainsi que le développement de thérapies ciblées sont deux axes majeurs de développement en cancérologie. Dans ce contexte, les nanoparticules ou nanoclusters sont apparus comme des candidats prometteurs au cours de deux dernières décennies. En effet, les nanoparticules présentent de nombreuses propriétés qui améliorent leur détection par les différentes techniques d'imagerie.

Notre objectif est de développer des nanoclusters d'or capables de s'accumuler dans les tumeurs pour donner une fluorescence en imagerie *in vivo* afin de guider la chirurgie d'exérèse tumorale. Ces nanoclusters d'or possèdent également des propriétés intrinsèques leur permettant d'avoir un effet thermique ce qui les rend intéressants pour l'utilisation en photothérapie ainsi que des propriétés d'augmentation de la dose en radiothérapie.

Nous avons déjà testé et validé ces molécules dans plusieurs modèles cellulaires *in vitro* et choisi les meilleurs candidats. Nous étudierons leur biodistribution et leur pharmacocinétique sanguine après administration par voie intraveineuse chez des souris nude sans et avec des xénogreffes sous-cutanées de cellules tumorales épidermoïdes humaines (Cal33). Puis nous étudierons le bénéfice de nanoclusters d'or sur la chirurgie d'exérèse tumorale guidée par l'imagerie *in vivo*, en comparaison à la chirurgie traditionnelle. Nous voulons également évaluer leurs propriétés radiosensibilisantes pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie.

Dans ce cadre, les souris nude immunodéficientes représentent le modèle le plus proche de la physiologie humaine, permettant de développer des modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les souris seront hébergées dans un environnement contrôlé dépourvu de germes pathogènes qui permet qu'elles ne souffrent pas de leur défaut d'immunité.

Les souris seront surveillées quotidiennement, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Nous travaillerons sur deux modèles de souris orthotopiques de cancer des VADS : Cal33 et SQ20B.

Nous réaliserons des implantations intra-jugales de copeaux tumoraux obtenus à partir de tumeurs des VADS sous-cutanées. Une tumeur implantée en sous-cutanée chez 1 souris nude permettra l'implantation de tumeurs orthotopiques chez 6 souris. Ce modèle d'implantation orthotopique permettra de ralentir la croissance tumorale et d'augmenter la survie des souris.

Dans ce projet nous utiliserons 237 souris Nude pour chaque modèle orthotopique, soit un total de 474 souris, correspondant au nombre minimum d'animaux nécessaires pour une étude fiable des différents résultats, conformément à la règle des 3R :

Remplacer : Les tests *in vitro* ont permis de réduire le nombre de composés à évaluer : seuls les composés très bien tolérés et bien internalisés *in vitro* sont évalués. Les paramètres de biodistribution sont obtenus uniquement par l'emploi d'animaux. Cette étude préclinique est nécessaire avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme.

Réduire : L'approche statistique et notre expérience nous permettent de réduire le nombre d'animaux au minimum afin d'obtenir des résultats exploitables. 6 animaux (biodistribution) par condition permettent une analyse fiable prenant en compte les variabilités inter-individu. 3 animaux sains par condition serviront pour l'étude de la pharmacocinétique sanguine.

10 souris par condition sont nécessaires pour une analyse statistique fiable de l'effet bénéfique de la chirurgie assistée.

Raffiner : Nous utiliserons des souris Nude, qui représentent le modèle le plus proche de la physiopathologie humaine, permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux, dans un environnement contrôlé dépourvu de pathogènes, enrichi avec des tunnels en carton et morceaux de papier pour y faire un nid. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies *ad libitum*. La croissance des tumeurs des voies aéro-digestives supérieures (masséter)

n'entraîne pas de gêne respiratoire ni alimentaire et sera suivie par imagerie de bioluminescence. Le niveau de sévérité de ces expérimentations est modéré. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux garantiront leur bien-être, et nous permettront d'intervenir immédiatement de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

5658. Le projet a pour objectif de sélectionner un ou des composés, à tester ultérieurement en phase clinique, pour le traitement chez l'Homme de la cystite interstitielle associée au syndrome de la vessie douloureuse (IC/PBS). Cette maladie, chronique et débilitante, est caractérisée par une douleur pelvienne, accompagnée par une augmentation de la fréquence urinaire et l'apparition d'urgences urinaires. Selon les données épidémiologiques, cette pathologie d'étiologie inconnue et probablement multifactorielle, est sûrement sous-diagnostiquée et toucherait environ 3 femmes sur 1000. Etant donné qu'il n'existe aucun traitement de référence, et qu'il en résulte une diminution de la qualité de vie des patients et un coût économique important, la recherche de nouvelles thérapies est nécessaire.

Ce projet est basé sur le test de composés d'intérêt dans un modèle d'inflammation de la vessie, provoquée par injection de cyclophosphamide (CYP) chez la ratte, qui va alors développer une hyperactivité de la vessie liée à des douleurs vésicales. La douleur pelvienne et la fonctionnalité de la vessie seront donc évaluées, puis comparées entre des rattes CYP, traités ou non avec un composé candidat.

Ce projet présente comme avantage l'utilisation d'un modèle animal bien décrit et déjà mis en place au sein du laboratoire, et ne nécessitant ainsi pas l'utilisation d'animaux additionnels pour une mise au point (réduction). La sélection d'un ou plusieurs composés intéressants amènera à l'utilisation d'environ 1200 rats femelles sur 5 ans, en considérant que 10% des composés se révéleront candidats pour des tests en clinique suite à ce projet préclinique de sélection.

L'utilisation d'un modèle animal est nécessaire dans ce contexte car aucun modèle *in vitro* (remplacement) ne peut permettre l'étude de cette pathologie, définie par des symptômes et donc difficile à appréhender hors du contexte physiologique. Ce modèle murin d'inflammation vésicale est le seul modèle disponible développé jusqu'à présent, présentant des caractéristiques similaires à celles observées dans la pathologie humaine : fonction vésicale anormale, douleur et modifications histologiques.

Le nombre d'animaux sera réduit au minimum nécessaire (réduction) pour réaliser des statistiques acceptables (15 rats par groupe de traitement), du fait des connaissances et de l'expérience du personnel participant au projet et des procédures liées.

Le modèle utilisé repose sur les effets secondaires délétères du traitement CYP, molécule utilisée en chimiothérapie anti-cancéreuse et connue pour ses effets urotoxiques. Les effets attendus sont principalement le développement d'une cystite hémorragique, associée à une douleur pelvienne. Ainsi, les méthodologies utilisées dans ce projet ont été adaptées afin de compiler des résultats fiables, tout en limitant la douleur des animaux. Un suivi quotidien de l'état général et du poids des animaux est réalisé, pour une action rapide en cas d'état de souffrance de l'animal. Enfin, les rats sont hébergés par 2 animaux par cage, afin de favoriser leur interaction sociale et réduire leur stress et un enrichissement de la litière est mis en place de façon systématique (raffinement).

5659. Pour maintenir l'homéostasie glucidique en dehors des périodes de repas, trois organes (le foie, les reins, et l'intestin) sont capables de produire du glucose dans la circulation sanguine. Contrairement à la production hépatique de glucose, l'induction de la production intestinale de glucose (PIG) exerce des effets bénéfiques sur l'organisme. La PIG est induite dans différents états nutritionnels tels que les régimes riches en protéines et en fibres fermentescibles. La détection du glucose produit par l'intestin dans la veine porte entraîne l'induction d'un signal nerveux (« glucose portal »), qui transmet au niveau central, se traduit par une induction de la satiété, une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une diminution de la production hépatique de glucose. A l'inverse, en régime standard, les souris invalidées spécifiquement dans l'intestin pour la glucose-6-phosphatase (souris I-G6PC<sup>-/-</sup>), l'enzyme clé de la production endogène de glucose, présentent toutes les caractéristiques d'un état pré-diabétique (légère augmentation de la glycémie à jeun et de l'insulinémie, associée à un défaut de sensibilité et de sécrétion d'insuline et d'une intolérance au glucose). De plus, ces souris développent plus rapidement un diabète que des souris contrôles sous un régime riche en gras et en sucres (High Fat/High Sucrose=HF/HS). De façon intéressante, la majorité de ces altérations du métabolisme glucidique est restaurée après une perfusion de glucose directement dans la veine porte.

D'autre part, les souris Ob/Ob (invalidées pour le gène codant pour la leptine) sont un modèle génique connu pour étudier l'obésité et le diabète.

Dans un contexte de développement croissant du diabète de type II et de l'obésité, les résultats du laboratoire suggèrent que la PIG pourrait être considérée comme une nouvelle cible thérapeutique permettant de contrôler à la fois le métabolisme glucidique et énergétique et notamment la thermogénèse, principale composante de la dépense énergétique.

L'induction de la PIG conduit à l'activation du signal « glucose portal », qui induit l'activation des aires cérébrales impliquées dans le contrôle du métabolisme glucidique et énergétique. Cette étude a pour objectif de caractériser les mécanismes par lesquels la PIG exerce ses effets métaboliques bénéfiques.

A l'âge précoce où nous les étudions (15 semaines), les souris I-G6PC<sup>-/-</sup> ne développent aucune modification physique ou de comportement par rapport aux souris contrôles. Aucun signe de stress, ni de douleur n'a été observé au cours de leur développement. De même, les souris Ob/Ob provenant d'un fournisseur agréé, sont génétiquement obèses et diabétiques mais ne présentent aucune autre modification physique ou de comportement par rapport aux souris contrôles à 15 semaines.

Nos études réalisées dans différentes conditions nutritionnelles nous permettront d'étudier les effets métaboliques bénéfiques du glucose portal dans un état physiologique (régime standard) et pathologique (régime HF/HS).

Le recours à des animaux dans ce projet se justifie par la nécessité d'obtenir une réponse de l'organisme tout entier en temps réel, ce qui n'est pas réalisable en modèle cellulaire.

Le nombre total d'animaux, soit 248 souris, a été calculé au plus juste afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées.

Pour étudier le métabolisme énergétique, et observer notamment des modulations de la thermogenèse, celle-ci doit être stimulée en exposant les souris à une faible température (6°C), pendant un minimum de 3h.

La perfusion de glucose dans la veine porte *via* un cathéter permet de mimer la PIG et d'induire le signal « glucose portal ». L'implantation du cathéter réalisée sous anesthésie gazeuse (isofluorane) nécessite une ouverture de la cavité abdominale mais tout sera mis en œuvre pour limiter la souffrance, la douleur et le stress de l'animal lors de cette chirurgie, par l'utilisation d'analgésiques et d'antalgiques au cours de la chirurgie et en post-opératoire pendant 3 jours.

Avant la chirurgie, les souris seront hébergées en groupe de 4 souris dans un milieu enrichi permettant la nidation, avec accès libre à la nourriture et à l'eau. Le suivi du bien-être des animaux sera réalisé régulièrement en étudiant leur poids, leur prise alimentaire et leur comportement afin d'identifier tout individu en souffrance.

Après la chirurgie, les souris ne peuvent plus être hébergées en groupe, et seront donc individualisées dans des cages à deux compartiments séparés par un grillage permettant le contact, et les échanges entre les animaux.

5660. A la différence de la plupart des cellules du corps, les cellules du système immunitaire sont fortement mobiles. Elles circulent à travers les différents organes en passant par le sang. Cette propriété est évidemment au centre de leur fonction de "sentinelles", toujours à l'affût de pathogènes émergents. Il est connu que cette circulation n'est pas passive mais dépendante d'un ensemble complexe de signaux moléculaires fournis aux cellules. Ce projet s'intéresse dans ce contexte aux signaux qui permettent la sortie des cellules des organes vers le sang. Nous avons remarqué que suivant le type de cellule du système immunitaire étudié, le même messenger chimique peut délivrer des signaux très différents, depuis un signal de sortie vers un signal de rétention dans l'organe. Nous pensons avoir identifié la molécule sur les cellules immunitaires responsable du signal de rétention. Les expériences prévues dans ce projet visent à tester cette hypothèse dans des souris humanisées, c'est à dire des souris immunodéficientes auxquelles on a greffé un système immunitaire humain. Le choix de la souris en tant que modèle a été motivé par l'hypothèse, qui ne peut être testée *in vitro*, où l'on ne peut recréer la complexité de la circulation des cellules du système immunitaire. D'autre part, ayant constaté de grandes différences dans la circulation des cellules immunitaires humaines et murines, nous avons fait le choix de souris humanisées pour tester au mieux notre hypothèse.

Ce projet a été dessiné en 3 procédures, le nombre de souris utilisé dans chacune des procédures sera réduit à son minimum sans pour autant compromettre les objectifs du projet ni les interprétations statistiques des résultats. Le nombre maximal d'animaux est estimé à 206 souris.

Les techniques utilisées minimiseront la souffrance animale (utilisations d'anesthésique et d'analgésique). Un suivi adapté des animaux et la définition de points limites précoces et prédictifs de l'apparition d'un mal être permettent de limiter au maximum toute souffrance animale.

5661. Dans le cadre de mes recherches sur les mécanismes de diversification des espèces nous nous intéressons tout particulièrement aux processus comportementaux d'isolement reproductif entre deux sous-espèces de la souris domestique (*Mus musculus*). Nous avons au préalable mis en évidence que le système de reconnaissance sexuel des deux sous-espèces divergeait et que les mâles et les femelles de ces deux taxa arrivaient à se discriminer sur la base de signaux olfactifs présents dans leur urine.

Nous avons analysé l'urine de ces souris et identifié plusieurs protéines de la famille des Protéines Urinaires Majeures (MUP) susceptibles de jouer le rôle de signal permettant la reconnaissance spécifique.

Pour valider le rôle de ces protéines candidates, il est nécessaire de synthétiser les protéines candidates *de novo*, et de les tester.

Des tests de choix entre différentes combinaisons de protéines seront réalisés pour valider leur rôle. Il s'agit de tests de préférences olfactives, i.e. temps passé à renifler un stimulus versus un autre indiquant une capacité à discriminer entre les deux stimuli.

Ces tests sont réalisés dans différents types de dispositifs comportementaux couramment utilisés (ex : labyrinthe en Y). Le nombre de souris utilisées a été réduit pour conformer à la règle des 3 R: 40 souris seront utilisées au total : 10 mâles et 10 femelles de chacune des deux sous-espèces, un nombre nécessaire pour garder une puissance de test statistique raisonnable. Pour leur bien-être, les souris de l'élevage sont maintenues dans des larges cages en groupe familial. Les cages contiennent de la sciure, du foin des rouleaux cartonnés, et une hutte en plastique rouge surmontée d'une roue d'activité. Régulièrement l'alimentation de laboratoire est agrémentée de graines de tournesol. La durée des expériences comportementales a été réduite au minimum (5 à 10 minutes suivant les tests) et les procédures ont été espacées de 1 semaine minimum.

5662. Le cholangiocarcinome (CK) est la forme la plus fréquente de cancer des voies biliaires et la deuxième tumeur primitive du foie. Cette incidence, variable dans le monde (plus fréquent chez les Asiatiques), est en perpétuelle augmentation, notamment pour les CK intra-hépatiques. Les taux de survie globale (SG) à 5 ans sont faibles, de 5 à 10%. La chimiothérapie (cisplatine) associée ou non à la gemcitabine est le traitement de référence dans les formes avancées. Il n'existe pas de traitement validé en deuxième ligne. Dans ce contexte, l'évaluation de nouvelles molécules reste donc un enjeu important.

Une nouvelle molécule, le GNS561 a été synthétisée et a démontré des effets très importants *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de carcinome hépatocellulaire (CHC). Ces résultats très intéressants nous ont encouragés à vouloir tester les effets anticancéreux dans un second type de tumeur primitive : le CK intrahépatique. Lors de ces expériences, il a été mis en évidence que le GNS561 et son dérivé (efficacité augmentée) le GNS740 s'accumulaient dans le foie, sans toxicité hépatique et avec une faible concentration plasmatique du médicament. Aussi, il a été décidé de développer un modèle de CK intrahépatique.

Ce projet présente donc deux étapes :

1) Etape 1 : Le développement d'un modèle de CK intrahépatique multinodulaire. En effet, dans cette pathologie, il existe très peu de modèles pertinents.

2) Etape 2 : Cette étape consiste à déterminer la capacité du GNS561 et du GNS740 à inhiber la croissance tumorale dans le contexte du CK intrahépatique, et n'aura lieu qu'à la condition que l'étape 1 ait été réalisée avec succès.

L'utilisation d'animaux est nécessaire pour mettre en évidence les effets anti-tumoraux d'une molécule destinée à être utilisée dans le traitement contre le cancer chez l'Homme. Pour ce projet, nous utiliserons 30 souris NOD SCID (immunodéprimées) pour l'étape 1 (mise au point du modèle de CK intrahépatique). Dans le cas où l'étape 1 aurait été réalisée avec succès, l'étape 2 consisterait en l'évaluation des effets antitumoraux des deux nouvelles molécules à tester sur 32 souris NOD SCID. Ce nombre a été déterminé de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux tout en conservant la validité statistique de l'étude, tant sur la croissance tumorale que les analyses immunohistochimiques pourront suivre.

Les médicaments seront administrés par la même voie d'administration que chez l'homme. Le cisplatine, molécule de référence dans le traitement du CK et qui servira de comparateur, par voie intraveineuse, trois fois par semaine, et les deux GNS par voie orale (gavage) 5 jours sur 7.

Les points limites seront les suivants : perte de poids > 20%, comportement anormal (yeux fermés, dos voûté, isolement), apparence physique anormale (automutilation, plaies), gêne pour se déplacer, augmentation du volume hépatique visible. Nous effectuerons une visite les deux jours suivants les procédures.

Les greffes n'induiront pas de douleur au cours du temps mais pour s'en assurer, ces points seront surveillés trois fois par semaine et consignés dans un cahier de suivi par l'expérimentateur. En cas d'atteinte d'un des points limites, les animaux seront euthanasiés dans les 24 heures. Aussi, les souris disposeront de dôme pour enrichir leur environnement.

5663. Le projet alliant recherche fondamentale et développement méthodologique que nous mènerons pendant 2 ans vise à évaluer la libération d'un neurotransmetteur essentiel à la vie, le glutamate, par des cellules cérébrales stimulées ou inhibées spécifiquement grâce à une manipulation génétique dirigée.

En effet, le glutamate est un neurotransmetteur libéré dans le cerveau par de nombreuses cellules, en réponses à l'activation de protéines appelées réceptrices et présentes sur leurs membranes cellulaires.

Depuis plus de 10 ans, des récepteurs découverts chez l'algue verte et activables par de la lumière peuvent être insérés dans le génome de rongeurs (optogénétique). Ces récepteurs, activés uniquement par l'expérimentateur *via* un laser, permettent de reproduire et contrôler l'activité électrique des cellules cérébrales ciblées. Ces méthodes connaissent actuellement un bond spectaculaire en neurosciences. Cependant, alors que les auteurs se sont essentiellement intéressés aux modifications de l'activité électrique des cellules cérébrales, très peu de données sur les conséquences de ces modifications électriques sur la libération des neurotransmetteurs comme le glutamate sont disponibles (< 1%).

Nous faisons l'hypothèse que les stimulations lumineuses modulant l'activité électrique des cellules cérébrales modifient aussi la libération de glutamate.

L'objectif de ce projet est de s'assurer de l'efficacité de la stimulation de la protéine photo-sensible insérée génétiquement dans les cellules cérébrales du rongeur et d'étudier les variations du glutamate induites par la lumière. Dans ce cadre, nous nous intéresserons plus particulièrement à des zones cérébrales riches en glutamate comme l'hippocampe ou le cortex.

Les résultats de notre étude permettront de connaître les conséquences neurochimiques des stimulations ciblées sur ce modèle d'animaux génétiquement modifiés (modèle sans dommages), à ce jour encore inconnues.

Nous utiliserons des rongeurs (souris / rats) pour nos expériences car ses animaux constituent la très grande majorité des animaux utilisant l'optogénétique et que le suivi des variations neurochimiques est réalisable facilement grâce à des techniques bien maîtrisées et très raffinées en expérimentation animale. 45 animaux au maximum devraient être utilisés sur les deux années que durera ce projet. Nous réduirons le plus possible le nombre d'animaux utilisés en nous basant sur notre propre expérience, en utilisant l'animal comme son propre contrôle en ciblant deux structures cérébrales quand ce sera possible, mais aussi en consultant un biostatisticien qui a déterminé le nombre minimal d'animaux par groupe. Nous garderons nos animaux dans des conditions d'hébergement et d'asepsies appropriées et nous utiliserons les stratégies expérimentales les plus adaptées pour minimiser leur souffrance. Nous mettrons en place un suivi clinique quotidien des animaux.

5664. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques qui pourraient faire preuve d'efficacité dans le traitement des arythmies cardiaques. Ils permettent aussi, pour certains, de déceler des effets pro-arythmiques des substances.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et est mis en œuvre au sein du laboratoire. Ces tests nécessitent l'utilisation d'animaux. Même si des tests *in vitro* peuvent être réalisés afin de mettre en évidence certains effets pro-arythmiques des substances testées, ces effets devront être confirmés *in vivo* dans le modèle animal. L'utilisation d'animaux est donc indispensable. Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à pouvoir interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests.

Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre d'animaux qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 120 rats, de 120 cobayes et de 120 lapins. Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant d'euthanasier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

5665. 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). Au cours d'un AVC ischémique, une artère cérébrale occluse provoque un manque d'oxygène et une hypoglycémie brutale du territoire d'aval, entraînant un stress important des cellules constituant la barrière hémato-encéphalique. Les AVC constitués peuvent être imagés par IRM, technique de référence utilisée en particulier pour diagnostiquer les AVC ischémiques versus hémorragiques. La caractérisation d'un accident ischémique transitoire est beaucoup plus difficile car cette atteinte courte du compartiment cérébral ne laisse pas de trace en imagerie classique. Il est donc très important de diagnostiquer un accident ischémique transitoire car la prise en charge du patient en dépend. En effet, la probabilité de faire un AVC après un épisode transitoire est très fortement augmentée et nécessite des investigations cliniques plus poussées.

Nous proposons dans ce projet l'utilisation des lipoprotéines LDL (low density lipoprotein) (avec ou sans modification) radiomarquées pour visualiser les AIT et les séquelles possibles au niveau du parenchyme cérébral en imagerie TEP (Tomographie à Emission de Positrons). Les LDL sont des transporteurs du cholestérol. Des précédentes études ont montré que lors d'accident ischémique transitoire et d'AVC, les LDL étaient recrutées à partir du sang circulant sur le site ischémié. De plus, certains récepteurs pour les LDL modifiées comme CD36 sont surexprimés entre 24 et 72 heures au niveau de la zone ischémiée. Ainsi nous proposons d'étudier deux types de LDL radiomarquées : des natives (LDL non modifiées) et modifiées (LDL acétylées) afin d'augmenter l'affinité aux récepteurs CD36. Les LDL natives sont extraites de plasmas humains.

Chaque molécule a été testée *in vitro* au préalable pour évaluer la cytotoxicité. Nous sommes obligés d'utiliser un modèle *in vivo* pour répondre à notre problématique afin de reproduire toute la complexité d'un accident ischémique transitoire au niveau physiopathologique.

Notre étude se déroulera sur un modèle chirurgical murin d'accident ischémique transitoire : le modèle du monofilament ou MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion), développé dans notre laboratoire.

Nous utiliserons des souches murines standards C57/BL6. Le nombre de souris utilisées dans ce projet sera de 20 souris, réparties en 4 lots de 5 souris. Afin de réduire le nombre d'animaux, chaque souris sera son propre contrôle avant la chirurgie effectuée.

L'acte chirurgical est parfaitement maîtrisé par notre équipe, et les gestes techniques sont réalisés en moins de 15 minutes. Afin de mimer un accident ischémique transitoire, le temps d'occlusion aura une durée de 20 minutes, ce qui n'engendre pas de symptômes chez l'animal. L'infarctus qui a lieu dans le cerveau ne provoque aucun trouble chez la souris.

Une couverture analgésique sera assurée pendant toute la période chirurgicale et post chirurgicale. La procédure d'imagerie n'induit pas de souffrance, les souris sont anesthésiées à l'isofurane 2% tout au long des acquisitions.

5666. L'hypertension pulmonaire est une maladie progressive grave qui touche les petits vaisseaux sanguins des poumons et dont le symptôme principal est l'essoufflement à l'effort. Ces vaisseaux transportent le sang à partir du cœur vers les poumons, où il se charge en oxygène (O<sub>2</sub>) pour alimenter tout l'organisme. Il est estimé de 15 à 25 cas pour un million d'habitants et le pic de fréquence se situe entre 30 et 40 ans. L'évolution naturelle de cette maladie varie fortement d'un individu à l'autre, mais elle conduit à une insuffisance cardiaque droite responsable du décès du patient seulement quelques années après la déclaration de la maladie. De nombreux médicaments permettent de réduire les symptômes de l'hypertension pulmonaire, cependant aucun ne permettent à ce jour un traitement complet de la maladie. Lorsque l'hypertension pulmonaire menace la vie du patient, ces patients peuvent subir une greffe cœur-poumon. Ainsi, la découverte de nouveaux médicaments apparait primordiale afin de lutter ou diminuer le développement de cette maladie. Avant de tester ces molécules thérapeutiques chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire, il est crucial d'appréhender au préalable la posologie et l'efficacité de ces molécules sur un modèle animal. A l'heure actuelle les mécanismes responsables du développement de l'hypertension artérielle pulmonaire sont mal connus c'est pourquoi nous allons utiliser pour ce projet un modèle unique au monde de rat génétiquement modifié pour un gène retrouvé muté chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire afin d'étudier les mécanismes mis en jeu par ces mutations. Le nombre total de rats utilisés sera de 300 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont euthanasiés en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress.

5667. Le projet s'inscrit dans une thématique générale d'évaluation de multiples interventions susceptibles de moduler l'homéostasie générale des muqueuses et les réponses immunes locales et systémiques, en conditions basales et divers contextes physiopathologiques chez la souris. L'étude permettra de renseigner sur l'efficacité de traitements préventifs ou thérapeutiques ainsi que la compréhension des mécanismes associés aux protections mises en évidence, en particulier en modifiant transitoirement ou durablement la structure du microbiote intestinal et/ou l'immunité de l'individu. Il s'agit d'un projet intégré combinant de nombreuses procédures distinctes, rassemblées ici, ayant pour la plupart déjà fait l'objet d'autorisations antérieures, en vue d'un renouvellement.

Les interventions envisagées comprennent (i) des conditions nutritionnelles, consistant en l'apport de microorganismes de qualité alimentaire (vivants, inactivés ou sous forme de fractions), de matrices alimentaires, de fibres polysaccharidiques (prébiotiques),

vitamines ou minéraux, seuls ou en combinaisons, tous considérés comme sans dangers ; (ii) d'immunisations par microorganismes vivants, inactivés ou sous forme de fractions purifiées.

Les divers contextes physio-pathologiques modélisés sont (i) des colites expérimentales induites chimiquement (DSS et TNBS), mimant les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ; (ii) des infections à tropisme intestinal *via* plusieurs microorganismes (*Citrobacter rodentium*, *Salmonella enterica ser. typhimurium*, *Escherichia coli spp* et *Yersinia pseudotuberculosis*), mimant la durée de colonisation, l'invasion de la muqueuse, la dissémination dans les organes et la composante inflammatoire associée. Ces études documentent ainsi les potentialités anti-inflammatoires, et anti-infectieuses, de stratégies nutritionnelles ciblées (probiotiques, prébiotiques, métabolites alimentaires) et vaccinales, en considérant le rôle du microbiote intestinal. Enfin, l'utilisation de lactobacilles bioluminescents pour déterminer la persistance et la localisation des bactéries lactiques dans le tractus digestif par imagerie est également considérée.

Ces évaluations précliniques n'interviennent toutefois qu'après détermination préalable des effets *in vitro* (effets anti-inflammatoires, effets prébiotiques, chélation des métaux lourds), afin de limiter au mieux le nombre d'animaux. Il n'est en effet pas possible de reproduire la physiologie intégrée et complexe du dialogue entre le système immunitaire, la muqueuse intestinale et le microbiote digestif de mammifère (Remplacer). Le nombre total d'animaux sur les 5 ans à venir est estimé au maximum à 3 000 souris (Réduire). Les procédures sont définies au mieux pour offrir le maximum de confiance dans les résultats générés dans le respect du bien-être des animaux en limitant la souffrance animale (Raffiner).

5668. La trisomie 21 (T21), aussi appelée Syndrome de Down (DS), due à la présence d'un chromosome 21 surnuméraire, est la forme la plus fréquente de retard mental qui touche environ 1 nouveau-né pour 2000 naissances. Elle représente environ un tiers des déficiences intellectuelles chez les enfants d'âge scolaire et est également associée à un large panel de dysmorphologies. Arriver à déplacer de quelques dizaines de points le quotient intellectuel des patients T21 leur permettrait d'avoir une vie plus autonome et socialement intégrée et constituerait un progrès très important pour la qualité de vie des patients et de leur entourage. La finalité de la recherche sur la T21 est donc de parvenir à mettre au point un traitement améliorant, puis normalisant, les fonctions intellectuelles des malades.

Plusieurs traitements ont déjà montré des effets bénéfiques chez la souris et chez l'homme. Parmi eux, une approche visant à réduire l'activité d'une protéine kinase, qui est suractivée chez les porteurs de trisomie. Cette suractivité, due à sa présence en 3 copies au lieu de 2, serait responsable en grande partie des déficits cognitifs observés chez les patients. La réduction de son activité à l'âge adulte a montré des effets bénéfiques dans des modèles animaux mais aussi chez l'homme. Pour autant, peu d'études portant sur l'impact d'un traitement *in utero* ont été réalisées chez le modèle animal, alors que des modifications structurales de l'hippocampe et du cervelet se mettent en place très tôt au cours du développement embryonnaire et donc au cours de la période gestationnelle. Un traitement précoce, qui modifierait ces anomalies au plus tôt, devrait avoir un impact très positif sur les patients. Les résultats devraient également permettre d'approfondir les connaissances sur le rôle de cette protéine kinase au cours du développement et son impact sur les défauts cognitifs des patients. Nous avons réalisé une première étude avec l'administration d'un inhibiteur à large spectre, durant la gestation, qui nous a permis d'obtenir des résultats prometteurs. Toutefois, bien que le mode d'administration de cet inhibiteur soit facile, il comporte plusieurs inconvénients, comme une disponibilité très faible et un champ d'action très large, ce qui complique l'interprétation. C'est pourquoi nous nous proposons pour cette nouvelle étude, d'utiliser un inhibiteur plus spécifique, isolé à partir d'une éponge marine et qui a déjà montré des effets bénéfiques chez l'adulte, lors de l'administration chez 2 modèles murins de la T21.

Pour réaliser cette expérience, nous utiliserons 2 modèles murins pour la trisomie 21 et 2 doses de l'inhibiteur, une dose légère et une dose plus forte, soit 4 modèles expérimentaux. Des femelles sans modifications génétiques seront accouplées avec des mâles porteurs de trisomie. La présence d'un coït marquera le jour 0. Ensuite les souris femelles gestantes seront injectées en sous cutané au niveau du cou, tous les jours, avec l'inhibiteur de la protéine étudiée, qui diminuera son activité au cours de la période gestationnelle. A la naissance, le traitement sera interrompu et les animaux seront laissés sans action jusqu'à 3 mois. A cet âge, leurs capacités mnésiques seront évaluées au travers de différents tests, choisis en fonction des phénotypes décrits dans la pathologie humaine.

Règle des 3R :

Remplacement : La compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires ainsi que les origines développementales des pathologies génétiques associées à des retards mentaux requièrent l'étude d'un organisme vivant dans son intégrité et sa globalité et il n'existe donc pas de méthode autre que l'étude *in vivo*. La souris est une espèce physiologiquement et génétiquement proche de l'Homme dans laquelle nous pouvons réaliser les manipulations génétiques pour obtenir ces modèles de pathologies humaines.

Réduction : Nos expériences de base sont construites sur des groupes de 12 animaux pour avoir un résultat significatif, en condition traitée ou non traitée. La taille des groupes a été déterminée grâce aux résultats d'une première étude, menée avec un inhibiteur à large spectre. Cette étude nous a permis de déterminer le nombre minimum d'animaux utilisés, soit 12 par groupe pour pouvoir utiliser une statistique éprouvée.

Le taux de transmission de la trisomie des modèles souris est d'à peine 30%. 1 portée compte en moyenne 6 petits dont 2 trisomiques. Pour assurer la production de 4 groupes (12 contrôles non traités, 12 contrôles traités, 12 trisomiques non traités et 12 trisomiques traités=48 animaux par condition), il faut accoupler 12 femelles par modèle expérimental, cela fait 48 femelles utilisées pour assurer la naissance des 192 animaux des 4 conditions expérimentales (2 modèles murins de trisomie 21 et 2 doses d'inhibiteur). Ainsi un total de 240 animaux est prévu pour ce projet.

Raffinement :

L'administration chez l'adulte de cet inhibiteur en injection intra péritonéale, sur une période de 19 jours consécutif, n'a pas montré d'effets délétères chez les animaux traités, même chez les contrôles. L'effet attendu est un bénéfice chez les animaux porteurs de

trisomie. Toutefois, un suivi des animaux sera réalisé sur la totalité de l'expérience, notamment durant la période gestationnelle où aura lieu le traitement 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 conditions d'élevage seront améliorées pour les femelles gestantes par l'apport de matériel leur permettant de faire un nid. Les animaux seront ensuite sevrés et hébergés par groupe de 4 ou 5 pour leur assurer une vie sociale.

5669. La sumoylation est une modification de protéines qui permet de moduler leurs fonctions dans la cellule. Ainsi, la sumoylation touche de nombreux aspects de la vie d'une cellule, et des travaux récents ont montré son importance dans des pathologies humaines à forte prévalence, telle que la maladie d'Alzheimer, une maladie dont la complexité requiert le recours à des animaux de laboratoire-souris entre autres-.

Notre laboratoire s'intéresse à la sumoylation depuis sa découverte à la fin des années 1990. Le laboratoire a développé un modèle murin permettant d'abolir complètement la sumoylation. Ce modèle a permis de démontrer l'importance de la sumoylation dans le développement embryonnaire et dans le renouvellement de l'épithélium intestinal.

Nous souhaitons désormais tirer parti de ces souris de laboratoire génétiquement modifiées pour démontrer l'importance de la sumoylation dans l'immunité innée.

En effet, plusieurs protéines impliquées dans l'immunité innée ont d'ores et déjà été décrites sous leur forme sumoylée. Jusqu'à présent, il a été fait essentiellement recours à des modèles de surexpression de protéines substrats de la sumoylation, des modèles qui reflètent mal les conditions physiologiques d'hyper- ou hypo-sumoylation. De plus, des données préliminaires- générées au sein du laboratoire, indiquent un fort impact de la perte du processus de sumoylation sur la réponse antivirale.

Dans la mesure où l'analyse du rôle global de la sumoylation dans l'immunité innée n'a pas encore été initiée, le recours à des souris génétiquement modifiées constitue une approche pertinente pour ce faire.

La pertinence du modèle sera évaluée à partir de données issues d'expériences *in vitro*, afin de prendre en compte la valence de remplacement des 3R.

Par la suite, lors de la phase d'exploration *in vivo*, la réduction et le raffinement seront pris en compte par la collaboration avec une équipe bénéficiant d'une grande expertise dans la procédure expérimentale de l'infection par le virus du Chikungunya. Ceci permettra la réduction du nombre d'animaux et l'utilisation de la dose pertinente uniquement.

Nous avons estimé le nombre de souris nécessaires à ce projet à 1052 dont 932 dans deux procédures de gravité légère, 60 dans une procédure de gravité modérée et 60 dans une procédure de gravité sévère. Ces effectifs permettront une évaluation statistiquement robuste des données (test de Kaplan-Meier)

Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront appropriées pour réduire le plus possible toutes douleurs, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Ainsi, l'utilisation des moelles osseuses récoltées à partir des souris euthanasiées sera optimisée. Afin d'éviter toute euthanasie inutile, les moelles prélevées sur les animaux, et qui seraient en surplus par rapport aux expériences planifiées, seront congelées pour une utilisation ultérieure. L'inoculation d'une suspension de virus du Chikungunya à des souris nouveaux- nés sera faite conformément au modèle décrit dans la littérature. Les souris seront ensuite observées tous les jours pendant 21 jours afin de détecter tout signe de souffrance, comprenant l'apparence voûtée, des frissons, une faible activité, et l'horripilation. Les souris présentant ces caractéristiques seront euthanasiées immédiatement.

5670. Le virus Lassa (LASV) a un impact significatif sur la santé et l'économie des pays d'Afrique de l'Ouest, infectant environ 500000 personnes chaque année. LASV est responsable d'environ 6000 morts par an, avec des taux de mortalité atteignant près de 50% chez les jeunes enfants. De plus, 20% des survivants présentent des complications à long-terme, notamment un déficit auditif. Bien qu'étant un problème de santé publique majeur dans les pays endémiques, il n'existe à ce jour aucun vaccin pour prévenir les infections à LASV et aucun traitement complètement efficace. Le développement de vaccin LASV a notamment été ralenti par le manque de connaissance sur ce pathogène de classe 4. Le projet de recherche se concentre sur une meilleure compréhension des infections à arénavirus et sur le développement de contre-mesures. En ce sens, nous avons rationnellement développé 2 plateformes vaccinales différentes contre LASV et potentiellement contre d'autres arénavirus pathogènes : un vecteur Mopeia (MOPV) recombinant super-atténué exprimant un antigène de LASV et un vecteur recombinant basé sur une souche vaccinale du virus de la rougeole (MeV) exprimant des antigènes de LASV. Le but de ce projet est de tester leur innocuité, leur immunogénicité et leur capacité à protéger efficacement des primates contre la fièvre de Lassa (FL) dans un modèle d'infection létale du macaque cynomolgus par le virus LASV. La preuve de concept de l'efficacité de ces candidats vaccins chez le primate est une étape nécessaire à leur avancement en essai clinique de phase I. Dans ce but, un total de 15 singes cynomolgus sera utilisé, répartis en 4 groupes. Le nombre de 4 animaux par groupe (3 pour les contrôles, utilisation de contrôles historiques si nécessaire) a été choisi afin d'obtenir des résultats statistiques significatifs et robustes (Logrank test) tout en respectant la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement). Le nombre de groupe est justifié par le fait que nous allons tester 3 candidats vaccins. Enfin, il est nécessaire d'avoir un groupe contrôle dont l'issue de la maladie sera fatale afin de juger de l'efficacité des vaccinations. Ils seront équipés du système de puce permettant d'avoir leur suivi de température en temps réel. Le suivi clinique sera réalisé quotidiennement par le personnel formé et expérimenté. Un vétérinaire sera d'astreinte pendant la durée de l'expérimentation et interviendra si nécessaire. Une attention particulière sera portée sur l'enrichissement alimentaire, de confort et de stimulation. De plus notre laboratoire a déjà réalisé des expériences similaires avec ce modèle. Par conséquent, le point limite de souffrance des animaux est parfaitement caractérisé et notre expérience aidera à réduire au maximum la souffrance des animaux.

5671. Nombre de substances issues des plantes présentent des vertus médicinales. Bien que les études phytopharmacologiques actuelles aient déjà validé ou invalidé certaines propriétés traditionnellement attribuées à des extraits issus du règne végétal, de nombreux composés restent encore à être investigués (type d'action et mécanismes sous-jacents).

La vectorisation de composés (inclusion dans une matière facilement assimilable, ou vecteur), permettra une meilleure absorption de composés par l'organisme (biodisponibilité), avec en finalité une augmentation de leur efficacité. Dans ce projet, nous prévoyons de suivre chez la souris la biodisponibilité d'un extrait végétal sur une période de 6 semaines (administration quotidienne), qui devrait être améliorée grâce à la vectorisation. Conjointement, ses effets anxiolytiques potentiels, supposés de par les constituants, seront évalués à deux reprises (milieu et fin de l'étude) par deux tests comportementaux peu stressants pour l'animal : open-field (évaluation de l'activité motrice) et labyrinthe en croix surélevé (évaluation du niveau d'anxiété).

96 souris mâles Swiss, âgées de 3 mois (jeunes adultes) et réparties en 8 groupes de 12 animaux, seront utilisées dans ce protocole. Deux doses de l'extrait végétal seront ainsi testées, en présence ou en absence de vectorisation et après mise en solution dans une solution dite véhicule. Ces quatre groupes expérimentaux seront comparés, lors du volet comportemental, à trois groupes témoins : témoin négatif (sans véhicule et sans vecteur), témoin véhicule et témoin vecteur), ainsi qu'à un groupe de référence traité au diazépam (molécule anxiolytique). Ce type d'étude ne peut être réalisé que sur des animaux vivants (Remplacement). L'effectif de chaque groupe a été déterminé statistiquement pour observer des effets avec un nombre minimal d'animaux (Réduction). 18 souris supplémentaires seront nécessaires pour la validation d'un nouveau dispositif expérimental (labyrinthe en croix surélevé) ; ce qui amène à un total de 114 souris.

Les animaux seront placés à raison de quatre congénères par cage, leur permettant ainsi de préserver les interactions et donc le lien social. De plus, ces cages seront munies d'éléments d'enrichissement, permettant d'offrir à l'animal la possibilité d'évoluer en espaces clos, type de milieu préférentiel chez des rongeurs (Raffinement). Le bien-être des animaux sera contrôlé quotidiennement. La prise en compte de points limites appropriés permettra de stopper l'expérimentation en cas de survenue de signes de souffrance. Les points limites définis sont une perte de poids de plus de 20% du poids initial, un arrêt de la prise alimentaire, un état général persistant (4 jours) renseigné par les changements d'apparence ou de signes comportementaux.

Cette étude impliquera un traitement quotidien par gavage. Ce type d'administration a été retenu, car il permet de s'assurer de la bonne prise individuelle de la substance étudiée, critère primordial dans les études de biodisponibilité. Un suivi pondéral sera effectué deux fois par semaine, permettant d'ajuster l'administration du traitement en fonction du poids, mais également de s'assurer objectivement du bon état physiologique des animaux, en plus de leur suivi quotidien.

La biodisponibilité de l'extrait sera évaluée par le dosage de molécules caractéristiques dans le plasma, obtenu par prélèvement sanguin sous-mandibulaire, effectué sur tous les animaux à raison d'un prélèvement tous les quinze jours (4 prélèvements par animal). Le bien-être des animaux sera contrôlé quotidiennement et l'inconfort évité au maximum au cours de l'expérimentation, de manière à garantir la qualité des résultats (Raffinement). A la fin de l'étude, tous les animaux sont euthanasiés par surdose d'anesthésique selon la réglementation en vigueur.

5672. Les oxazaphosphorines, tels que l'Ifosfamide (IFO) ou le cyclophosphamide (CPM), sont des composés antitumoraux faisant partie de la classe des alkylants de l'ADN. Ces prodrogues nécessitent une activation enzymatique qui a lieu principalement dans le foie. L'IFO étant faiblement métabolisé, des « protocoles hautes doses » ont été mis en place mais peuvent entraîner des toxicités rénales et neurologiques.

Pour contrer ces effets toxiques limitant l'utilisation clinique de l'IFO et afin d'accroître l'activité du CPM, des composés préactivés issus de ces molécules ont été développés. Parmi eux, certains ont la propriété de s'auto-assembler afin de former des nanoparticules. Les autres peuvent quant à eux être encapsulés dans des nanocapsules lipidiques. La vectorisation de ces molécules permet de diminuer les doses administrées (de 5 à 10 fois) en augmentant par ciblage leur activité ou en modifiant leur biodistribution. Récemment, des études *in vitro* de cytotoxicité de ces composés préactivés ont été réalisées sur différentes lignées tumorales humaines. Les concentrations inhibitrices de 50% des cellules (IC50) ont été déterminées pour chacun des composés en l'absence de matériel enzymatique. Cette valeur obtenue est semblable à celle obtenue avec le métabolite actif de l'IFO et valide ainsi la preuve de concept de préactivation. Ces produits étant très prometteurs, notre objectif est maintenant de mener les études nécessaires avant de déterminer les données d'efficacité et de toxicité pour chacun de ces produits. De ce fait, nous souhaiterions déterminer la dose maximale tolérée de ce panel de composés, développé par notre équipe, et évaluer le gain d'efficacité obtenu pour les composés vectorisés.

Ce projet, comportant deux procédures, est le minimum indispensable pour étudier et conclure sur un bénéfice de ces composés en comparaison avec leurs produits de référence. Ce projet met en œuvre l'analyse de six composés préactivés (pentanyloxy-, geranyloxy-, farnesyloxy-IFO pentanyloxy-, geranyloxy-, farnesyloxy-CPM) par comparaison aux composés de référence l'IFO et le CPM qui nécessitent, pour leur part, une bio-activation hépatique. Cette étude requiert l'utilisation de modèles animaux, afin de mimer au maximum le métabolisme de l'homme. Il s'agit en outre de valider le concept d'amélioration de l'index thérapeutique et la diminution de toxicité de nos composés qui ne peut être étudié que sur un organisme entier. Le nombre de souris nécessaire pour cette étude a été déterminé afin de respecter la règle des 3R menant à réduire au maximum le nombre d'animaux au sein de chacune des procédures expérimentales tout en permettant l'obtention de résultats exploitables et statistiquement viables. Dans cette perspective, le nombre total de souris utilisées dans ce projet a été évalué à 1935 souris. Les souris seront observées quotidiennement afin de prévoir et de diagnostiquer au plus tôt les points limites et les critères d'interruptions.

5673. *Clostridium difficile* est la première cause de diarrhées bactériennes associées aux soins chez l'adulte dans les pays développés et en particulier en France (24000 cas par an, dont 14 % de formes compliquées). La mortalité associée aux infections à *C. difficile* (ICD) est de l'ordre de 3%. Les ICD peuvent évoluer sur un mode épidémique avec la survenue de cas groupés d'infection. Elles représentent un coût sanitaire important pour nos sociétés, en raison de l'augmentation des durées moyennes de séjours et des surcoûts associés à leur prise en charge spécifique.

Trois molécules antibiotiques sont utilisées dans le traitement des ICD ; elles sont généralement efficaces mais chacun de ces traitements présente des inconvénients (échecs de traitement ; risque de sélection de bactéries résistantes ; coût important d'une des molécules). De plus, l'infection à *C. difficile* est caractérisée par un taux de récurrences important (20%), avec parfois des épisodes de récurrences multiples, ce qui peut être très invalidant pour les patients avec une perte en qualité de vie significative.

Dans ce contexte, la recherche pour trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques ou de nouveaux antibiotiques à spectre étroit actif sur *C. difficile* est toujours très active. Un nouveau lipopeptide, le DNB101, non absorbable au niveau intestinal, présente une activité intéressante sur plusieurs souches de *C. difficile in vitro*, ce qui en fait un candidat potentiel pour le traitement des ICD chez l'homme. Il est toutefois nécessaire réglementairement de réaliser une évaluation préclinique de son efficacité *in vivo* dans un modèle d'infection chez le hamster qui reproduit les formes les plus graves d'ICD digestives qui sont observées chez l'homme.

L'objectif de ce projet est donc d'obtenir une preuve de concept de l'efficacité *in vivo* de cette molécule prometteuse, préalable indispensable à la poursuite des autres étapes du développement clinique de cette molécule.

Toutes les procédures de ce projet ont été conçues pour respecter le principe des 3 R (Remplacement, Réduction, Raffinement).

Remplacement : plusieurs tests *in vitro* ont permis de démontrer au préalable que la molécule DNB101 présentait une activité antibiotique intéressante sur *C. difficile*. L'étape de vérification de son activité *in vivo* est exigible réglementairement avant toute nouvelle phase de développement clinique. Le recours à l'animal est indispensable pour étudier tous les aspects d'un processus infectieux et valider de nouvelles cibles thérapeutiques car il n'existe à ce jour aucun modèle *in vivo* ou *in silico* capable de reproduire la complexité du processus infectieux dans son intégralité.

Réduction : les procédures seront réalisées en plusieurs phases visant à confirmer les propriétés pharmacocinétiques de cette molécule puis l'effet d'une dose importante sur l'évolution de l'infection. Les phases suivantes (effet dose et comparaison à un traitement de référence) ne seront réalisées que si les résultats préliminaires ont confirmé l'intérêt de cette molécule. Dans le cas contraire, cette étude sera prématurément arrêtée. Par ailleurs, une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude afin d'avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Les groupes contrôles des animaux non traités ont été mutualisés aussi souvent que possible. Au total, un nombre maximal de 164 hamsters sera nécessaire pour l'ensemble des procédures de cette étude.

Raffinement : les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux subissent le minimum de stress possible. En particulier, les litières seront changées quotidiennement et les animaux auront un accès direct et illimité à l'eau de boisson et à la nourriture. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques permettant de limiter la souffrance des animaux qui bénéficieront d'une procédure d'euthanasie anticipée et une sortie d'étude prématurée en cas d'atteinte des points limites éthiquement non acceptables.

5674. Données épidémiologiques :

*Clostridium difficile* est une bactérie anaérobie strict, sporulante, et première cause de diarrhée nosocomiale bactérienne chez l'adulte dans les pays développés et en particulier en France (> 24000 cas par an, dont 14 % de formes compliquées dont la plus connue est la colite pseudomembraneuse et marquée par 3% de mortalité). La contamination se fait à partir des spores, formes de résistance et hautement contagieuse de la bactérie, largement présentes dans l'environnement des services de soins hospitaliers. Les infections à *C. difficile* (ICD) peuvent évoluer sur un mode épidémique avec la survenue de cas groupés d'infection dans les services de soins puis dans l'ensemble de l'établissement voire sur tout un territoire de santé (exemple de l'épidémie qui a touché tout le Nord de la France en 2006), et représente un coût sanitaire important pour nos sociétés, en raison de l'augmentation des durées moyennes de séjours et du surcoût des soins associés, entre autres. Malgré des traitements antibiotiques généralement efficaces, les récurrences des infections à *C. difficile* sont fréquentes (environ 20%) et des résistances aux antibiotiques apparaissent.

Physiopathologie :

La bactérie produit des toxines qui sont majoritairement responsables des signes cliniques et des lésions observées dans l'intestin. Cependant, d'autres facteurs interviennent dans l'établissement de l'infection, au cours de la première étape qui correspond à la colonisation du tube digestif de l'hôte par *C. difficile*. Notre laboratoire s'est spécialisé dans l'étude de cette étape de colonisation, et travaille notamment sur le rôle de différentes protéines de surface dans cette étape importante d'implantation de la bactérie, les processus d'adaptation de la bactérie à l'hôte, et le rôle de la formation de biofilm.

Rationnel du projet proposé et perspectives :

Différentes protéines de surface impliquées dans cette colonisation ont été caractérisées. Du fait de la localisation intestinale de cette infection, le développement d'une réponse immunitaire dirigée contre des protéines de surface par une vaccination par voie muqueuse peut être une stratégie efficace dans la prévention des infections à *C. difficile* (ICD).

L'objectif de cette étude est de réaliser des essais de vaccination par voie muqueuse à l'aide de différentes protéines de surface de *C. difficile*. Ces essais seront réalisés dans un modèle hamster, animal très sensible aux infections à *C. difficile* permettant de mettre en évidence l'effet protecteur des anticorps produits lors des immunisations.

L'identification des facteurs de virulence nécessaires à la colonisation de l'hôte est un préalable indispensable à l'identification de nouvelles stratégies de lutte contre les infections à *C. difficile* incluant à la fois des schémas de prévention mais aussi le développement de nouvelles cibles thérapeutiques (antibiotiques, immunisation, etc.) visant à empêcher cette étape précoce de colonisation.

Toutes les procédures de ce projet ont été conçues pour respecter le principe des 3 R (Remplacement, Réduction, Raffinement). Remplacement : plusieurs tests *in vitro* ont permis de démontrer au préalable l'intérêt des facteurs de colonisation étudiés comme antigènes vaccinaux. L'étape de vérification de leur efficacité *in vivo* est exigible réglementairement avant toute nouvelle phase de développement clinique. Le recours à l'animal est indispensable pour étudier tous les aspects d'un processus infectieux et valider de nouveau vaccins car il n'existe à ce jour aucun modèle *in vivo* ou *in silico* capable de reproduire la complexité du processus infectieux dans son intégralité. Réduction : les procédures seront réalisées en plusieurs phases visant à confirmer les propriétés immunogènes et leur intérêt comme antigène vaccinal. Les phases suivantes (effet dose et comparaison à un vaccin de référence) ne seront réalisées que si les résultats préliminaires ont confirmé l'intérêt de ces antigènes. Dans le cas contraire, cette étude sera prématurément arrêtée. Par ailleurs, une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude afin d'avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Les groupes contrôles des animaux non traités ont été mutualisés aussi souvent que possible. Au total, un nombre maximal de 240 hamsters sera nécessaire pour l'ensemble des procédures de cette étude. Raffinement : les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux subissent le minimum de stress possible. En particulier, les litières seront changées quotidiennement et les animaux auront un accès direct et illimité à l'eau de boisson et à la nourriture. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques permettant de limiter la souffrance des animaux qui bénéficieront d'une procédure d'euthanasie anticipée et une sortie d'étude prématurée en cas d'atteinte des points limites éthiquement non acceptables.

5675. La thématique globale du présent projet porte sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliquant le récepteur nucléaire FXR dans l'homéostasie énergétique. Le récepteur nucléaire FXR est un facteur de transcription agissant tel un senseur métabolique permettant à l'organisme de s'adapter aux changements environnementaux en contrôlant l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie énergétique et le métabolisme glucidique, lipidique ou des acides biliaires. Il est d'ailleurs exprimé dans les tissus importants d'un point de vue métabolique (foie, tissu adipeux, muscle, pancréas, cerveau, intestin) et des anomalies dans la fonction de ce récepteur sont à l'origine de perturbations métaboliques. L'homéostasie énergétique, résultant d'une balance entre la prise alimentaire et la dépense énergétique, est régulée par le système nerveux central et par les organes périphériques (foie, tissu adipeux, pancréas, intestin, muscle), nécessitant par ailleurs une étroite communication entre ces différents organes. Aussi, l'objectif global du projet est d'étudier plus avant le rôle du récepteur nucléaire FXR dans la régulation de l'homéostasie énergétique en périphérie et au sein du cerveau ainsi que son implication dans la communication inter-organes, par des approches cellulaires (cultures primaires, cultures cellulaires) et intégratives (phénotypage métabolique, histologie, comportement, biochimie, méthodes moléculaires). Ce projet nécessite donc des approches intégrées utilisant des modèles murins d'invalidation tissulaire spécifique et des approches cellulaires utilisant des cultures primaires (de cellules de foie, d'adipocytes ou de cellules neurales). Ces expériences corrélant des approches moléculaires et métaboliques doivent se faire dans des modèles appropriés *in vivo*. Le nombre total d'animaux concernant les procédures de notre projet sur les 5 ans à venir est estimé à 9780. Notre projet répond aux exigences des 3R à savoir remplacement (utilisation de lignées cellulaires), réduction et raffinement. En effet, nous serons attentifs à observer si les animaux souffrent ou présentent un comportement anormal en lien avec le responsable du bien-être animal (un examen clinique sera mis en place afin d'évaluer le plus précisément possible les premiers signes de stress ou de douleur afin d'en limiter les conséquences (en excluant l'animal de l'étude en s'assurant d'avoir le nombre suffisant pour l'analyse statistique)). Dans le cas de traitements pharmacologiques, seuls les composés ayant démontré leur innocuité seront utilisés. Particulièrement, nous serons attentifs aux paramètres cliniques suivants, définissant les points limites:

- perte de poids de 15% ou plus (et, le cas échéant variations de l'ingestion de nourriture et d'eau) :
- apparence physique externe (piloérection, dos rond, signes d'infection, respiration anormale...)
- changement du comportement (hypoactivité, démarche anormale, isolement)
- réponses comportementales au stimulus externe

Les animaux présentant un de ces critères seront euthanasiés par dislocation cervicale après anesthésie à l'isoflurane 2%. Euthanasies réalisés dans une salle dédiée. Ce monitoring sera réalisé en lien avec le responsable du bien-être animal.

5676. *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie opportuniste multi-résistante aux antibiotiques qui représente, en France, la 3ème cause d'infections acquises à l'hôpital posant un problème majeur de Santé publique. Le présent projet consiste à établir l'efficacité de nouvelles molécules anti-*Pseudomonas* pour un transfert vers une filière de développement pharmaceutique.

L'efficacité de ces nouvelles molécules est établie à partir 3 modèles d'infections à *P. aeruginosa* : un modèle d'agression respiratoire aiguë, un modèle d'agression respiratoire chronique et un modèle de translocation bactérienne d'origine digestive à *P. aeruginosa*. Ces modèles ont la particularité de se rapprocher au maximum des infections à *P. aeruginosa* observées chez l'homme. C'est une étape obligatoire avant transfert en filière de développement pharmaceutique humain.

Afin de réduire au maximum, le nombre de souris nécessaire au projet, nous avons mis en place un processus de sélection des meilleurs composés par une approche *in vitro*, le nombre d'animaux a été réduit au minimum permettant l'obtention de résultats tangibles et des mesures seront prises pour prendre en compte au maximum la contrainte imposée aux animaux, nous permettant ainsi de respecter les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement des animaux. Ce projet nécessite l'utilisation de 3423 souris de fond génétique C57BL/6.

5677. Les compétences de l'expérimentateur sont un des facteurs clés du bien-être animal et du raffinement des procédures en expérimentation animale. En effet, plus le geste est sûr, moins il sera stressant et traumatisant pour l'animal et moins il y aura d'échecs expérimentaux. Une formation initiale et continue soutenue est donc au cœur d'une expérimentation éthique et respectueuse des bonnes pratiques de laboratoire.

Le but de ce projet est donc de former nos collaborateurs à l'excellence opérationnelle en expérimentation animale afin de :

- Réduire les durées de contention.
- Améliorer les pratiques d'injection, de ponction et de chirurgie de façon à les rendre reproductibles (ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation) et le moins traumatisantes possible.
- Renforcer les connaissances de l'anatomie des rongeurs par la pratique de l'autopsie et valoriser les animaux euthanasiés.

Le projet est construit sur l'acquisition de compétences autour de la souris, du rat et du hamster. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés à des fins de formation, environ 90% des animaux utilisés seront issus de protocoles de recherche existants et destinés à être euthanasiés pour des motifs d'exclusion expérimentale. Pour renforcer le bien-être animal, une gradation dans la formation est prévue et prévoit de commencer les gestes techniques sur animal mort puis, après validation du geste, de continuer la formation sur animal vigile ou anesthésié selon la procédure à valider.

Basé sur notre expérience et notre personnel actuel, nous estimons que ce projet nécessite l'utilisation de 270 rongeurs maximum par an (dont 10 rats et 10 hamsters), soit 1350 (dont 50 rats et 50 hamsters) pour les 5 ans du projet. La majorité de ces animaux sont issus de la réutilisation d'animaux faisant partie de protocoles expérimentaux déjà validés précédemment.

Tout au long de la mise en œuvre de ce projet, une supervision par un personnel qualifié et sensibilisé à l'éthique animale permet de garantir le respect du bien-être animal dans chacune des études.

5678. Localisation du foyer des crises audiogènes chez la souris (durée : 5 ans).

Les crises audiogènes sont étudiées comme modèle de l'épilepsie chez l'homme. Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons comprendre l'origine de ces crises audiogènes chez les modèles murins. Nous étudions des modèles murins caractérisés par une perte auditive modérée d'origine cochléaire (la souris a un système auditif similaire à celui de l'homme et c'est le seul mammifère modèle pour lequel il existe des outils génétiques conséquents). En plus de l'atteinte sensorielle, certaines de ces lignées de souris ont une prédisposition aux crises audiogènes, qui sont des crises réflexes déclenchées par le son. Ces crises peuvent être induites en exposant les souris à un son de haute intensité et de basse fréquence pour la souris. Alors que les souris témoins ne présentent aucun comportement anormal lors d'une telle exposition sonore, les souris étudiées courent selon une trajectoire désordonnée et présentent ensuite des convulsions.

L'origine de ces crises réflexes est mal connue chez la souris. Deux précédents projets, portant sur l'étude de ces crises, ont permis d'identifier une région cérébrale qui pourrait constituer leur foyer générateur. Ils ont également permis d'identifier des gènes candidats, dont des mutations pourraient, elles aussi, entraîner des crises audiogènes.

Le présent projet vise à confirmer l'hypothèse d'origine mise en avant au sein du laboratoire porteur du projet :

- la région anatomique à l'origine des crises audiogènes
- l'implication de nos nouveaux gènes candidats.

Afin de déterminer l'origine anatomique des crises audiogènes, nous souhaitons inactiver les gènes d'intérêt dans certaines régions spécifiques du cerveau. Cette inactivation sera faite à l'aide de vecteurs lentiviraux classiquement utilisés pour cette application. Si nos hypothèses se confirment, ce projet permettra d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans ces crises et de préciser leur rôle au cours du développement cérébral.

Ce projet - de degré de sévérité modéré - impliquera un total de 100 souris de laboratoire élevées et hébergées dans les conditions optimales. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les animaux seront systématiquement génotypés, les mâles et les femelles seront utilisés sans distinction. Les souris intégrées dans les groupes expérimentaux seront anesthésiées quelle que soit l'une ou l'autre gestuelle maîtrisée mise en œuvre.

5679. Hormis les carences alimentaires en acides aminés, les tissus doivent faire face à d'autres situations conduisant à des réductions de la biodisponibilité en certains acides aminés qui peuvent être fortement préjudiciables, notamment pour les individus âgés, en favorisant la fonte musculaire. Des résultats récents montrent qu'un traitement chronique au paracétamol, médicament largement utilisé par les personnes âgées, induit une fonte musculaire chez le rat. Cet effet peut, en partie, être expliqué par la réduction de la biodisponibilité de la cystéine pour le muscle, consécutive au processus de détoxification du médicament. La détoxification du paracétamol a en effet lieu dans le foie, où elle est consommatrice de cystéine *via* le sulfate et le glutathion (tripeptide dont l'acide aminé limitant sa synthèse est la cystéine). Ainsi, la détoxification du paracétamol s'accompagne d'une réduction de la concentration en glutathion, non seulement dans le foie, mais également dans d'autres tissus comme le muscle.

Par ailleurs, dans le cadre de l'étude des mécanismes d'adaptation à un stress nutritionnel chez les mammifères, les chercheurs ont démontré, dans des cellules en culture, le rôle clé joué par la voie de signalisation GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 dans le processus d'adaptation à une carence en acides aminés. Par la suite, ils ont validé la fonctionnalité de cette voie (et de la kinase GCN2) chez la souris en réponse à la consommation d'un repas carencé en un acide aminé indispensable. Afin de pouvoir étudier le rôle joué par cette voie de signalisation au niveau de l'animal entier, une lignée de souris transgénique AARE-LUC qui exprime le gène rapporteur luciférase (LUC) sous le contrôle de séquences de fixation du facteur de transcription ATF4 a récemment été généré et breveté. En mesurant le niveau d'expression du gène rapporteur, cette lignée de souris AARE-LUC permet d'étudier au niveau de chaque tissu (par imagerie bioluminescente) et au niveau de chaque cellule (par histologie) l'activation de la voie eIF2 $\alpha$ /ATF4, en fonction de situations nutritionnelles ou physiopathologiques. L'utilisation d'un appareil capable de réaliser des images bioluminescentes a

récemment permis de visualiser le profil d'activation de la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 dans certains tissus, comme le foie, le pancréas et le cerveau, lors de la consommation d'un régime carencé en un acide aminé indispensable.

De plus, le traitement au paracétamol peut générer un stress oxydant au niveau cellulaire, qui est connu pour activer la voie eIF2 $\alpha$ /ATF4. Le facteur de transcription ATF4 a été décrit comme exerçant un rôle dans la fonte musculaire consécutive à un état hyper-catabolique (jeûne prolongé, plâtreage d'un membre...).

L'objectif du projet est de déterminer l'apport optimal en acides aminés soufrés lors de traitement chronique au paracétamol induisant une perte de masse musculaire en utilisant la lignée de souris transgénique AARE-LUC.

Ce projet va nécessiter 80 souris (2 expériences de 40 souris) et sera réalisé selon la réglementation 2010/63/UE et selon la règle des 3R (Remplacement, réduction, raffinement). Le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience est calculé au minimum en fonction du test statistique retenu, et des mesures pour prendre en charge la contrainte seront *de facto* prises.

5680. Titre du projet : Effet neuro-protecteur de biomolécules dans un modèle expérimental de Glaucome chez la souris

Durée du projet : 3 ans

Mots clés : Bio-peptide neuro-protecteur, neuro-dégénérescence, Glaucome, rétinopathies,

Objet du projet : recherche translationnelle

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

Le modèle de Glaucome que nous utiliserons sera obtenu par pincement calibré du nerf optique de souris sous anesthésie générale. Cette technique est non invasive, la peau n'est pas incisée, le nerf n'est pas coupé mais les fibres nerveuses qui le composent vont dégénérer et provoquer la mort des neurones rétiniens. Le pincement du nerf sera unilatéral afin de préserver les fonctions visuelles. Les souris dont le nerf optique aura été pincé recevront deux injections d'analgésiques à huit heures d'intervalle et leur état général sera contrôlé quotidiennement. Les bio-peptides à tester seront délivrés au niveau de la rétine par une injection intraoculaire sous anesthésie générale. L'intégrité de l'œil et notamment de la lentille, qui ne doit surtout pas être lésée pour éviter tout risque d'inflammation, seront préservés ainsi que les vaisseaux sanguins et les faisceaux musculaires. Le niveau de sévérité attendu est modéré. Les animaux seront euthanasiés deux semaines après le pincement du nerf.

Nous avons choisi le modèle souris pour sa taille et son anatomie, particulièrement adaptées à la chirurgie ophtalmique. De plus, une lignée de souris transgénique existante sera utilisée dans certains essais. Pour mener à bien nos objectifs, un maximum de 2760 souris âgées de trois à cinq semaines sera nécessaire. Cette estimation tient compte des exigences statistiques et des contrôles nécessaires à la validation de nos substances actives. La bonne maîtrise des gestes chirurgicaux et une hygiène rigoureuse lors des chirurgies sont indispensables au maintien du bon état général des souris. De plus, mâles et femelles seront hébergés (séparément) par groupe de 6 individus et leur environnement sera enrichi de matériaux de nidification. Si malgré ces précautions l'état d'un animal opéré venait à se dégrader, il sera euthanasié.

Le but ultime du projet objet de la demande d'autorisation est de proposer un traitement pour prévenir les processus neuro-dégénératifs responsables de rétinopathies, et d'élargir cette application thérapeutique à d'autres formes de neuro-dégénérescence.

5681. Ce projet s'inscrit dans un programme gouvernemental de recherche et de développement de lutte contre le terrorisme nucléaire, radiologique, biologique et chimique.

La ricine est une toxine de plante extrêmement toxique considérée comme une arme terroriste potentielle. Elle est classée dans la catégorie B des agents bioterroristes dans la liste CDC (Center for Diseases Control and Prevention). Il n'existe actuellement aucune contre-mesure médicale en cas d'intoxication par cette toxine. Des molécules inhibitrices de la ricine (molécules chimiques ou biologiques) ont été développées et caractérisées. Pour la validation des molécules inhibitrices un modèle *in vivo* d'intoxication à la ricine a été développé. Ce modèle a également été utilisé pour la recherche d'une signature de l'intoxication.

Sur la base de ce modèle, le projet a pour but d'évaluer des tests rapides (ELISA et bandelettes) pour la détection de la ricine dans les fluides biologiques (lavages broncho-alvéolaires, sérum, urine) après administration de la ricine à des souris. L'ensemble de ce projet nécessitera 115 souris de souche CD1. Le nombre de doses et le nombre d'animaux par groupe ont été réduits au minimum afin d'obtenir des résultats permettant d'évaluer la présence de ricine après intoxication dans un ou plusieurs des liquides biologiques testés.

Les prélèvements des liquides biologiques seront réalisés rapidement après l'administration afin de diminuer la souffrance des animaux.

5682. Tous les organes en transplantation sont exposés à des lésions causées par le syndrome d'ischémie/reperfusion (I/R). Ces lésions sont liées au manque d'oxygène dû à la conservation de l'organe (ischémie) mais également au réchauffement associé à sa réoxygénation lors de sa transplantation (reperfusion). L'I/R est un des facteurs majeurs à l'origine d'une réduction de la survie du greffon et de la reprise retardée de fonction de ce greffon qui entraîne un surcoût de la transplantation par l'hospitalisation prolongée.

Des facteurs favorisent les lésions d'I/R comme, entre autres, l'âge du donneur supérieur à 60 ans ou une conservation du greffon supérieure à 24 h, ce qui est dû au contexte actuel de pénurie d'organes.

Le foie peut être exposé à 2 types d'ischémie au cours du processus de transplantation:

- l'ischémie dite « froide » est intentionnellement appliquée pour réduire l'activité métabolique du greffon
- l'ischémie dite « chaude » est rencontrée lors de son implantation et sa reperfusion chez le receveur

Quel que soit le type d'agression ischémique, les lésions hépatiques sont initiées au cours de la phase ischémique mais ne s'expriment qu'après la reperfusion, avec l'apport en oxygène et la restauration du flux sanguin. Ce processus lésionnel s'exprime en deux phases distinctes, une phase précoce (< 6 heures après la reperfusion) et une phase tardive (de 6h à 48h), chaque phase se caractérisant par des perturbations biologiques et des lésions histologiques spécifiques. Certaines cellules hépatiques sont très sensibles à ce phénomène au cours duquel un stress oxydant et une altération de la production d'énergie prédominent. Une des causes majeures de la mort des cellules hépatiques lors de la reperfusion du foie est un dysfonctionnement de composants des cellules, appelés mitochondries. Ces dernières sont des centrales énergétiques qui utilisent l'oxygène que nous respirons pour produire 90% de l'énergie dont nous avons besoin quotidiennement. Protéger les mitochondries lors de la reperfusion hépatique s'avère donc être une cible thérapeutique majeure.

Lors de la reperfusion hépatique, la formation et l'ouverture d'un pore au niveau de la membrane des mitochondries, appelé pore de transition de perméabilité (ou mPTP), entraîne la libération de substances directement à l'origine la mort des cellules hépatiques. Empêcher l'ouverture de ce pore apparaît donc comme une stratégie prometteuse pour lutter contre ces lésions et protéger le foie. Il existe une molécule de référence, la cyclosporine A, qui permet d'inhiber l'ouverture du mPTP en se liant à l'une de ses protéines constitutives, la cyclophiline D. Cependant, l'utilisation de la cyclosporine A est limitée par sa toxicité et ses propriétés immunosuppressives. Il est donc important d'identifier de nouveaux inhibiteurs de ce pore de transition de perméabilité.

Nous avons montré récemment que de nouveaux ligands de la cyclophiline D développés au sein de notre institut, dont la structure chimique est différente de la cyclosporine A et ne présente ni sa toxicité ni d'effets immunosuppresseurs, inhibent également l'ouverture du pore de transition de perméabilité dans des mitochondries isolées à partir de foie de souris. D'autres molécules sont en cours de synthèse pour améliorer l'affinité de ces ligands.

L'objectif de la présente étude est de démontrer que ces nouvelles molécules possèdent un effet hépatoprotecteur chez l'animal soumis à un modèle expérimental d'I/R hépatique (1) en inhibant le mPTP lors de la phase précoce de la reperfusion et (2) en induisant une protection durable en limitant les lésions de la phase tardive.

L'ensemble des modèles et des techniques employés dans ce projet sont couramment utilisés par les laboratoires de recherche internationaux étudiant l'I/R hépatique et sont maîtrisés au laboratoire depuis plusieurs années.

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, seules les molécules qui se seront révélées les plus efficaces au cours des expériences *in vitro* seront testées chez l'animal. Au total, nous comptons tester au maximum 2 molécules par an, soit un maximum de 240 souris par an (120 souris par molécule ; 1200 souris sur 5 ans) dans l'hypothèse où chaque étape serait réalisée.

Les animaux seront hébergés dans une animalerie conventionnelle. Pendant leur séjour, les souris auront à leur disposition des balles de coton pour nidifier et des tubes de carton pour jouer/se cacher. L'ensemble des procédures sera réalisé chez l'animal profondément anesthésié. Afin de lutter contre la douleur post-opératoire, les animaux recevront une dose d'antalgique dès leur réveil.

5683. Le paludisme, causé par un protozoaire du genre *Plasmodium* est une des plus importantes maladies parasitaires touchant 40% de la population humaine mondiale en zone à risque. Bien que le parasite agent causal de cette maladie soit transmis lors du repas sanguin d'un moustique hématophage du genre *Anopheles* qui l'héberge au sein de ses glandes salivaires, des études menées sur le terrain, en Afrique, ont montré qu'une proportion d'anophèles sauvages est naturellement résistante au parasite, et ne sont donc pas des insectes hôtes et vecteurs de ce parasite.

L'analyse de populations d'anophèles qui se perpétuent en Afrique sub-saharienne- Afrique de l'Ouest- qui ne sont ni hôtes ni donc vectrices de *Plasmodium* a permis d'identifier, chez l'insecte hématophage de ce genre *Anopheles*, un locus génétique portant un certain nombre de gènes du système immunitaire dits « candidats » qui pourraient rendre compte de leur résistance ou caractère réfractaire au développement de l'agent causal du paludisme humain ou d'un parasite du genre *Plasmodium/P.* et d'espèces *-P. berghei* et *P. yoelii-*, adaptées aux rongeurs de laboratoire.

Ce projet consiste à tester ces gènes candidats, en utilisant une technique d'atténuation/extinction de l'expression de gènes que nous pouvons identifier depuis qu'a été séquencé le génome d'*Anopheles gambiae*.

Dans le cas présent du couple moustique/parasite, la réalisation du cycle infectieux complet du parasite impose que soient respectées les conditions naturelles c'est-à-dire que le moustique s'infecte en prélevant des globules rouges d'un animal préalablement infecté par le parasite. Le recours à l'animal est donc indispensable. Nous réduirons le nombre d'animaux utilisés au strict minimum, c'est-à-dire à 270 souris sur 5 ans. L'infection n'engendrera qu'un impact modéré sur le bien-être des animaux, qui seront toutefois observés régulièrement pour détecter toute souffrance ou douleur (inattendue) qui conduirait à une euthanasie prématurée.

Ce projet nous permettra d'identifier les gènes du moustique impliqué dans sa résistance au parasite de rongeur.

5684. *Escherichia coli* est une bactérie retrouvée dans le tractus digestif des mammifères. Certaines souches d'*E. coli* ont acquis des propriétés qui leur confèrent un pouvoir virulent et sont donc à l'origine d'infections intestinale ou extra-intestinale chez l'homme. A ce jour, la prise en charge des patients s'effectue par des traitements symptomatiques ainsi qu'une antibiothérapie quand cela est possible. Pour certains pathotypes tels que les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), l'utilisation des antibiotiques est déconseillée car elle peut engendrer une production accrue de toxine par le pathogène et ainsi aggraver les symptômes de l'infection.

Dans le cadre d'un projet visant à caractériser de nouveaux facteurs de virulence des EHEC, des travaux ont identifié des gènes potentiellement impliqués dans le processus infectieux du pathogène. L'objectif est désormais de valider leur implication *in vivo* en utilisant un modèle animal. Ces expérimentations seront réalisées en utilisant des modèles murins décrits dans la littérature et en condition de confinement dans une animalerie de type A2. Pour l'ensemble de ces expériences, la règle des 3R sera respectée. Nous utiliserons un maximum de 340 animaux pour une période de 24 mois, nous permettant de caractériser précisément l'importance des gènes d'intérêt identifiés sur la virulence ou le fitness des EHEC. Pour chacune de ces expériences, le nombre d'animaux sera réduit à son minimum tout en permettant néanmoins les analyses statistiques. Les animaux seront surveillés quotidiennement et euthanasiés selon les règles en vigueur s'ils présentent des modifications physiologiques et comportementales traduisant un mal-être.

5685. La dégénérescence rétinienne est impliquée dans des situations Cliniques courantes comme par exemple la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), les rétinopathies pigmentaires (RP), la rétinopathie diabétique (RD). Elle est caractérisée par une disparition lente et progressive des cellules photoréceptrices de la rétine. Ces cellules sont responsables de l'absorption de la lumière et de la transformation du signal lumineux en un signal électrophysiologique qui sera transmis au cerveau. Les cellules photoréceptrices sont les cellules à l'origine du signal visuel et par conséquent leur perte conduit à une perte de vision qui à terme peut aboutir à la cécité. Les radicaux libres et le stress oxydatif sont largement reconnus comme étant impliqués dans le développement et/ou la progression des lésions conduisant à la dégénérescence des cellules rétinienne. C'est pourquoi, dans le cadre de ce projet nous évaluerons l'effet protecteur d'un inhibiteur de la production des radicaux libres par les mitochondries, sur la fonction et la structure rétinienne dans des conditions normales et pathologiques chez le rat. En conformité à la règle des 3R, les animaux sont entraînés à coopérer, des techniques non invasives et non douloureuses sont réalisées sous anesthésie afin de réduire l'inconfort, avant le prélèvement des échantillons, leur nombre est réduit en recueillant le maximum de données sur un même animal, leur remplacement ne peut être envisagé dans le cadre de ce projet puisqu'aucune alternative ne permet d'évaluer dans des conditions physiologiques une molécule. à visée oculaire Afin de mener à bien ce projet, nous utiliserons au maximum 600 rats.

5686. L'objectif de ce projet est d'étudier sur le plan hémodynamique, énergétique et fonctionnel, les contraintes myocardiques induites par une ExtraCorporeal Life Support (ECLS) périphérique au cours d'un choc cardiogénique post-infarctus et d'identifier les stratégies thérapeutiques pharmacologiques et/ou mécaniques les plus efficaces à y associer pour limiter les conséquences potentiellement délétères de telles contraintes. Pour se faire, un modèle ovin de choc cardiogénique post infarctus du myocarde par injection intra-coronaire d'éthanol pur sera mis au point. Notre projet se propose : 1) de caractériser le modèle de choc cardiogénique post infarctus sur le plan hémodynamique, structurel par IRM et énergétique, 2) de caractériser l'hémodynamique intracardiaque d'un myocarde défaillant sous ECLS périphérique pour des débits d'assistance oscillant entre 25% et 100% du débit cardiaque théorique et 3) d'évaluer l'efficacité des principales mesures additives qu'elles soient pharmacologiques (perfusion de dobutamine, d'adrénaline, de milrinone ou de lévosimendan) et mécaniques (contre-pulsion intra-aortique, assistance monoaxiale gauche et recours à l'ECLS pulsée). Les résultats d'un tel projet constitueront des données objectives pour appréhender au mieux les conséquences potentiellement délétères des contraintes induites par une ECLS périphérique sur un myocarde défaillant ainsi assisté. L'hypothèse de ce travail est que l'ECLS permet de restaurer de façon efficace la perfusion des organes périphériques mais induit des contraintes myocardiques importantes pouvant aggraver le remodelage ventriculaire.

La procédure permettra de développer chez la brebis anesthésiée et ventilée mécaniquement un modèle de choc cardiogénique d'origine ischémique en induisant un infarctus aigu du myocarde antérieur étendu. Un monitoring hémodynamique sophistiqué est mis en place. Une fois ce choc induit, une assistance de courte durée de type ECLS sera mise en place pour restaurer une perfusion d'organes. Une analyse fine de l'interaction entre l'assistance périphérique et l'hémodynamique intracardiaque sera réalisée. L'effet de mesures pharmacologiques et/ou mécaniques additives sera aussi évalué.

Les retombées scientifiques principales de ce protocole seront (i) la caractérisation hémodynamique, énergétique et métabolique d'un modèle choc cardiogénique post-infarctus ovin, (ii) la caractérisation hémodynamique et énergétique du cœur défaillant assisté par un ECLS périphérique sans et (iii) avec la mise en place de stratégies thérapeutiques correctrices pharmacologiques et/ou mécaniques.

L'utilisation de l'animal reste, à ce stade, indispensable. Le modèle utilisé (ovin) est à ce jour le modèle le plus pertinent pour l'homme (pour des raisons anatomiques et métaboliques).

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans cette étude et dans le but d'obtenir un plus grand bénéfice de l'utilisation de ces animaux, nous avons fixé une limite maximale de 80 moutons au total pour une période de 5 ans. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable.

Le raffinement du projet et le respect du bien-être animal reposent sur plusieurs mesures :

- les animaux sont hébergés dans des locaux agréés et bénéficient de soins quotidiens dispensés par du personnel compétent et soucieux du bien-être animal
- les animaux sont habitués au personnel animalier afin de limiter tout stress
- une surveillance vétérinaire quotidienne est assurée
- les animaux sont hébergés en groupes sociaux ce qui leur permet d'exprimer des comportements naturels
- ils disposent d'enrichissements adaptés (foin et pierre à sel pour les brebis)
- toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale (mise en œuvre et surveillée par du personnel dédié) et une analgésie adaptée est systématiquement mise en place

- des critères d'alerte précis sont surveillés ; si l'animal présente un signe d'appel, des mesures adaptées sont mises en place immédiatement (ajout d'analgésique par exemple).

5687. L'alimentation a un impact direct sur la santé du consommateur. Si le bol alimentaire renferme des ingrédients qui peuvent avoir des effets bénéfiques pour la santé, il peut aussi malheureusement contenir des contaminants chimiques qui peuvent avoir des conséquences négatives avec notamment des effets sur les fonctions cérébrales.

Le cerveau est protégé des substances indésirables qui peuvent se trouver dans la circulation sanguine par le biais de la barrière hématoencéphalique (BHE). Le lit anatomique de cette barrière est l'endothélium du réseau microvasculaire cérébral. Ce dernier régule les échanges entre le sang et le tissu cérébral en limitant notamment les mouvements passifs paracellulaires (entre les cellules) de substances à travers la BHE grâce à la présence de jonctions serrées.

Certains contaminants chimiques de l'alimentation sont neurotoxiques ; ils peuvent après ingestion s'accumuler dans le tissu cérébral. Cependant, les effets de ces contaminants sur l'endothélium cérébral et le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) ces substances gagnent le cerveau ne sont pas bien caractérisé(s).

Des études expérimentales et cliniques ont montré que l'altération de l'intégrité de la BHE est associée à diverses pathologies du système nerveux central. Il apparaît ainsi essentiel d'étudier l'influence des contaminants chimiques alimentaires sur l'intégrité de la BHE et de caractériser les mécanismes par lesquels ces substances exercent leur neurotoxicité *via* des altérations possibles de la structure des jonctions serrées.

Ce projet, incluant 160 rats sur 5 ans, sera centré sur l'étude des contaminants chimiques qui résultent d'une pollution des milieux comme les résidus de pesticides et les substances organiques persistantes ou non persistantes.

Pour étudier l'impact de ces contaminants sur l'intégrité de la BHE, ce projet sera organisé en 2 temps : le premier consistera en la mise en place d'une approche expérimentale, validée avec un polluant alimentaire de référence, visant à évaluer la perméabilité de la BHE et les altérations possibles de la structure des jonctions serrées de la BHE ; et dans un deuxième temps, cet outil méthodologique sera utilisé pour appréhender les mécanismes par lesquels les substances chimiques de l'alimentation exercent leur neurotoxicité.

Les animaux seront exposés aux contaminants chimiques par voie orale (procédure 1). Pour évaluer la perméabilité de la BHE (procédure 2), certains animaux recevront un traceur fluorescent par voie veineuse puis seront euthanasiés, selon les recommandations éthiques, afin de quantifier la présence du traceur au niveau cérébral. Par ailleurs, d'autres animaux seront euthanasiés en vue de collecter les microvaisseaux cérébraux (procédure 3) dans le but de révéler la présence ou l'absence d'altérations de la structure des jonctions serrées de la BHE.

Ce travail nécessite le recours à l'animal entier mimant la complexité de l'organisme pour la phase d'exposition aux contaminants mais également pour le prélèvement de tissus, il n'existe donc pas de méthodes alternatives (remplacement). Le nombre d'animaux sera cependant limité au minimum afin de garantir la validité et l'interprétation scientifique des résultats (réduction). Les animaux seront surveillés suite à l'exposition aux contaminants sur les points limites suivants: diminution de la consommation alimentaire et hydrique, baisse du poids corporel et modification de l'apparence externe de l'animal. Si l'un de ces points limites vient à apparaître, les animaux seront isolés de leur congénère et mis sous surveillance accentuée. En cas d'aggravation de l'état de l'animal, ce dernier sera euthanasié selon les recommandations éthiques en vigueur. Les expérimentations seront effectuées selon la réglementation et les recommandations en vigueur (raffinement).

5688. L'objectif de ce projet est de contribuer à la définition d'une stratégie nutritionnelle et/ou pharmacologique destinée à prévenir ou retarder le déclin cognitif et la dépendance des personnes âgées dans notre société.

La maladie d'Alzheimer touche aujourd'hui 40 millions de personnes dans le monde et il n'existe pas de traitement à ce jour. C'est pourquoi il est urgent de mieux comprendre les mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent le développement de cette maladie. Ce projet s'inscrit dans cette perspective d'amélioration des conditions de vieillissement neurobiologique en privilégiant l'action de la vitamine A.

Un ensemble cohérent de données de la littérature plaide en faveur d'une forte perturbation du métabolisme de la vitamine A au cours du vieillissement. Notre équipe a mis en évidence que l'hypoactivité de sa voie de signalisation contribue à l'étiologie du déclin cognitif au cours du vieillissement. Par ailleurs, l'administration de vitamine A *via* l'alimentation a permis de restaurer certains déficits de mémoire chez des rongeurs au cours du vieillissement. De plus, des données récentes suggèrent également une participation de l'affaiblissement du statut en vitamine A à la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Par ailleurs, des résultats obtenus post-mortem sur des cerveaux de patients atteints de la maladie tendent à confirmer que la voie d'action des rétinoïdes est particulièrement altérée chez ces sujets. Enfin une carence prolongée en vitamine A conduit chez l'animal à l'apparition de dépôts de type amyloïde et d'enchevêtrements neurofibrillaires caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, alors qu'à l'inverse, l'administration d'acide rétinoïque (qui est le métabolite actif de la vitamine A), empêchent leur formation et stimule la dégradation des agrégats  $\beta$ -amyloïdes déjà formés.

Dans ce contexte, l'objectif général de notre projet est de mieux comprendre l'action bénéfique et préventive de la vitamine A sur les processus physiologiques qui sont impliqués dans le déclin cognitif dans un premier temps, et par extension dans la maladie d'Alzheimer dans un second temps. Pour cela nous analyserons sur des modèles animaux de vieillissement et de la maladie d'Alzheimer (rat "*Rattus norvegicus*" et souris "*Mus Musculus*"), les effets d'un traitement préventif pharmacologique d'acide rétinoïque et/ou d'une supplémentation préventive nutritionnelle en vitamine A dans la prévention des troubles neurobiologiques et cognitifs spécifiques du vieillissement et de la maladie d'Alzheimer.

Par ailleurs, le modèle rongeur soumis à des apports variés en vitamine A permet l'étude intégrée de l'impact de la nutrition sur le fonctionnement du système nerveux central au cours du vieillissement physiologique et pathologique; ceci fait appel à des mécanismes trop complexes pour pouvoir les remplacer par des approches cellulaires *in vitro*. Nous évaluerons ces effets d'une part à l'aide de paradigmes comportementaux permettant d'évaluer l'efficacité des traitements sur la mémoire des animaux ; et d'autre part à l'aide d'investigations neurobiologiques et moléculaires. Cependant, ce projet réunit un grand nombre de facteurs de variabilité interindividuelle. En effet, les évaluations comportementales sont influencées par l'état d'anxiété des animaux, leur sociabilité dans la cage, leur degré de dominance, leur régime alimentaire, etc. Les analyses métaboliques et neurobiologiques sont très dépendantes de la précision de la chirurgie permettant d'induire Alzheimer chez les rongeurs, de leur capacité d'absorption, de stockage, de mobilisation des nutriments (vitamine A, beta-carotène). Mais également, la petite taille de ces animaux constitue une difficulté supplémentaire lors des prélèvements qui doivent être réalisés en lumière rouge (car l'acide rétinolique est sensible à la lumière). Ces contraintes nous imposent d'avoir un nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour répondre à notre problématique, tout en nous restreignant à des effectifs les plus faibles possible. Compte-tenu des différents groupes d'étude (animaux jeunes, âgés, soumis ou non au beta-carotène, injectés ou non avec des amyloïdes, soumis ou non à une supplémentation en vitamine A) et de ces contraintes expérimentales, nous nécessitons 1002 (rats + souris) afin de garantir la robustesse de nos résultats tout en minimisant autant que possible la taille de nos effectifs.

Afin de réduire au maximum la souffrance causée aux animaux, nous avons déterminé avec attention les points limite du projet, nous permettant le cas échéant, d'administrer un antidouleur aux animaux. De plus, les animaux seront élevés en cages collectives de 4 individus, afin de ne pas être surpeuplées, avec un accès à l'eau et à la nourriture en continu. Des carrés de coton ainsi que des igloos en carton seront placés dans chaque cage, afin d'enrichir leur environnement, réduire leur stress et optimiser leurs conditions d'élevage. Ainsi, nous respectons l'obligation réglementaire des 3 R : Remplacer, Réduire et Raffiner.

L'objectif à long terme de ce projet est de transférer les connaissances acquises chez le rongeur à l'Homme pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques et nutritionnelles en particulier pour prévenir la perte d'autonomie et la dépendance des personnes âgées.

5689. La forte prévalence de l'obésité est clairement liée à l'alimentation. Les régimes gras et/ou sucrés sont considérés comme étant les principaux responsables, mais si l'on y regarde de plus près, de nombreuses combinaisons de macronutriments peuvent être à l'origine de désordres métaboliques et conduire progressivement à un état de surpoids puis d'obésité et de diabète, engendré par l'inadéquation entre les besoins énergétiques et le type d'apport. En particulier, au cours d'un cycle journalier les besoins relatifs en différents macronutriments sont différents du fait de variations chronobiologiques des besoins. L'inadéquation entre les apports et les besoins à un moment donné pourrait induire des phases de stockage transitoire d'une partie de l'énergie ingérée menant à terme à une rétention progressive de graisse dans l'organisme. Le but de ce projet de recherche est d'analyser les conséquences du comportement alimentaire aux différents moments de la journée, sur le poids, la masse grasse et les paramètres du métabolisme énergétique. Il s'agit plus particulièrement d'analyser le comportement alimentaire, le poids et l'adiposité de rats de laboratoire qui ont la possibilité de choisir librement la composition en macronutriments de leur apport énergétique. Les rats ont en effet des stratégies nutritionnelles subtiles et reproductibles, fondées sur une sélection nutritionnelle précise qui évolue entre le jour et la nuit et qui leur permet généralement d'optimiser leur gain de masse maigre par rapport à la masse grasse.

Les mesures seront effectuées sur des rats ne disposant que d'un seul type d'aliment et de rats pouvant choisir entre plusieurs aliments. Elles doivent permettre de préciser les mécanismes qui sous-tendent la variation des choix alimentaires au cours de la journée et les mécanismes à l'origine des effets bénéfiques observés sur l'adiposité sur le long-terme. Deux études déjà menées au laboratoire et publiées nous ont permis de maîtriser ce type d'approche expérimentale.

Cette étude étant une étude comportementale, elle ne peut être réalisée que sur des animaux vigiles. Le rat est une espèce pertinente pour ce type d'étude, dans la mesure où ses régime et comportement alimentaires présentent des similitudes avec ceux de l'homme. Le protocole a été optimisé pour réduire le nombre d'animaux à un total de 32, en particulier en réalisant un suivi longitudinal des mesures au cours du temps sur le même animal. L'utilisation de 8 rats par groupe est le strict minimum requis pour permettre de révéler des différences statistiquement significatives étant donné le nombre de groupes (4), le type d'analyse statistique imposé par le projet (analyse de la variance) et le risque technique lié au bon fonctionnement des cathéters implantés (risque d'obstruction). La procédure expérimentale n'implique pas de manipulations susceptibles d'induire une souffrance physique significative sur les rats de l'étude. Par contre, le protocole impose que les rats soient hébergés individuellement afin de pouvoir mesurer leur prise alimentaire individuelle. Pour limiter le stress induit par cette procédure, les rats sont hébergés dans des cages de plexiglass qui leur permettent de se voir et de se sentir et qui sont enrichies de « jouets » et de niches. De plus, au moment des pesées et des mesures de la prise alimentaire, 3 fois par semaine, nous donnons 1-2 heures de « liberté » aux rats d'un même lot (4 rats en général) c'est-à-dire que, après les avoir pesés, nous les regroupons dans une même grande cage afin qu'ils puissent interagir pendant les mesures de prise alimentaire et les changements de litière. C'est un moment de récréation qu'ils apprécient et qui participe tout à la fois à leur bien-être et à la qualité des résultats de l'étude.

Au cours de cette étude, tous les rats devront subir une opération chirurgicale légère (pose d'un cathéter dans la veine jugulaire) qui dure environ 20 minutes. Cette technique est parfaitement maîtrisée par le responsable de l'étude et fait l'objet d'une procédure strictement définie au laboratoire quant aux conditions d'anesthésie (anesthésie gazeuse comparable à ce qui est fait chez l'homme) et aux méthodes à appliquer pour réduire la douleur en période post-opératoire (utilisation d'antalgiques). Les critères pour décider de la sortie du protocole d'un animal sont très stricts, d'autant plus que la mesure de la prise alimentaire est très sensible à la perturbation de l'état de santé de l'animal. En plus de ce critère très sensible, les critères classiques tels qu'une perte de poids anormale dans le contexte expérimental (supérieure à 10% en 3 jours), diarrhée, déshydratation, sans récupération seront utilisés.

5690. Titre : Etude des facteurs de l'hôte contrôlant ou favorisant l'infection par la bactérie *Chlamydia trachomatis*, et de la pathogénèse associée à l'infection.

L'infection par *Chlamydia trachomatis* est la première cause de maladie sexuellement transmissible d'origine bactérienne. Dans la majorité des cas l'infection est asymptomatique. Chez certaines patientes, elle prend une forme chronique conduisant à des maladies inflammatoires pelviennes, qui peuvent causer une stérilité ou des grossesses extra-utérines. Les mécanismes sous-jacents à l'infection sont encore mal connus, en particulier les réponses immunes natives et adaptatives à l'infection, ainsi que la façon dont les bactéries parviennent à persister dans l'individu en dépit de ces réponses. Nous avons montré récemment *in vitro* qu'une enzyme de l'hôte, la transglutaminase 2 (TG2) est activée lors de l'infection et que cette activité semble bénéfique aux bactéries. TG2 pourrait exacerber l'inflammation observée chez certains patients. D'autre part, la littérature suggère que les récepteurs TLR2 et NOD1 puissent percevoir l'infection, mais jusqu'à présent seules des souches adaptées à la souris ont pu être testées dans un modèle murin, car les souches adaptées à l'homme étaient rapidement éliminées. La mise au point récente d'une infection trans-cervicale (au-delà du col) permet désormais d'étudier l'inflammation résultant de souches adaptées à l'homme dans un modèle murin. En utilisant des souris déficientes pour TG2 d'une part, et pour NOD1 et TLR2 d'autre part, nous déterminerons si ces facteurs de l'hôte jouent un rôle dans la capacité de la souche adaptée à l'homme *C. trachomatis* à proliférer dans le tractus génital, et mesurer la réponse immune de l'hôte qui en résulte.

Enfin, nous établirons le modèle cobaye de l'infection par *C. trachomatis* en adaptant la procédure d'inoculation décrite chez la souris. L'avantage du modèle cobaye est que l'appareil génital est plus proche de celui de l'homme, tant sur l'aspect physiologique (cycle de 17 j) qu'histologique. Le modèle cobaye est déjà utilisé pour l'infection par une souche adaptée à cette espèce (*C. caviae*), il s'agit ici de voir si l'inoculation trans-cervicale permet le développement d'une infection avec une souche adaptée à l'homme, *C. trachomatis*.

Nous prévoyons d'utiliser 1080 souris et 96 cobayes, femelles uniquement, puisqu'il s'agit d'étudier l'infection par *C. trachomatis* dans le tractus génital femelle. Des souris de 6-7 semaines et cobayes de 250 grammes (environ 4-6 semaines) seront utilisés. A ce stade les animaux ont atteint leur maturité sexuelle. Pour chaque point expérimental nous utiliserons le nombre minimal d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats significatifs d'un point de vue statistique. Les animaux seront élevés en groupe, avec un équipement et des conditions sanitaires adéquates.

Le bénéfice attendu est une identification de facteurs de l'hôte qui restreignent ou au contraire facilitent la progression de l'infection, et la mise en place d'une réponse immune. Si *C. trachomatis* inoculé en trans-cervical chez le cobaye permet l'établissement d'une infection productive, nous disposerons d'un modèle plus proche de l'homme que le système souris. A l'issue de ce projet, et selon les résultats, d'autres études pourront être mises en place pour comprendre comment l'infection par *C. trachomatis* peut résulter en une infection chronique, et les processus menant à des lésions tissulaires. Le but ultime est de développer des stratégies thérapeutiques pour empêcher ces processus chez les humains, qui seront testés d'abord en modèle *in vitro*, puis en modèle animal. Les protocoles d'infections ont déjà été utilisés chez les souris et ne donnent pas lieu à des manifestations de gêne chez les animaux. L'infection induit cependant une inflammation mais l'utilisation d'antibiotique ou d'anti-inflammatoire n'est pas possible car cela modifierait justement le processus infectieux à l'étude.

Les animaux seront euthanasiés entre quelques heures à 3-4 semaines après infection, suivant le but de l'expérience.

5691. Depuis quelques années a émergé comme domaine de recherche majeur, l'étude du microbiote intestinal et de son incidence sur la physiologie et la santé des êtres humains. Cette vaste communauté microbienne, hébergée dans l'intestin, exerce de nombreuses fonctions biologiques et métaboliques et confère de nombreux avantages aux individus hôtes. Celles des études qui ont été réalisées en ayant recours à des souris de laboratoire ont permis de mettre en évidence les fonctions mutualistiques : effet barrière contre des microbes invasifs, fermentation des sucres complexes, développement et maturation du système immunitaire.

Cependant sont encore très partielles les données sur les genres bactériens impliqués dans l'homéostasie intestinale et dans le développement du système immunitaire.

Quelques jours après la naissance, le microbiote intestinal du nouveau-né est dominé par les lactobacilles, puis il devient de plus en plus complexe et diversifié.

L'objectif de ce projet de recherche fondamentale intitulé « Impact de *Lactobacillus casei* sur l'établissement du microbiome intestinal et du système immunitaire de la souris » est de comprendre quels agonistes de lactobacilles concourent à l'établissement progressif du « microbiote adulte », au développement et la maturation du système immunitaire, ce, en ayant recours à des souris de laboratoire et à des lactobacilles natifs ou à des lactobacilles déficients pour des agonistes d'intérêt (acide lactique, par exemple). Cette étude qui consiste à suivre l'impact d'une bactérie sur le développement du microbiote intestinal et du système immunitaire implique *de facto* l'utilisation d'animaux.

Le développement du système immunitaire sera suivi par la détection de cytokines sériques. A la fin de l'expérience, au bout de 2 mois, les animaux seront euthanasiés, les tissus prélevés : outre le recours à des analyses histologiques pour identifier les cellules du système immunitaire *in situ* au sein des tissus prélevés et traités pour ce faire, seront également préparées des suspensions cellulaires pour déterminer les lignages d'origine hématopoïétique du système immunitaire.

Seront intégrés dans des groupes expérimentaux au maximum 495 souris mâles ou femelles pendant les 5 années de l'étude. Les expérimentations se déclinant *via* trois procédures qui seront mises en œuvre en nous conformant aux deux valences- réduction et raffinement – classe légère pour les trois procédures- de la démarche 3R.

Les souriceaux nouveau-nés seront gavés ou non à trois jours avec une souche de la bactérie commensale *Lactobacillus casei*. Nous suivrons ensuite l'évolution du microbiote dans les fèces des animaux « ainsi gavés » en ciblant l'ADN des grands genres bactériens jusqu'à l'âge adulte, c'est à dire 8 semaines. Les animaux n'ayant pas été gavés avec *Lactobacillus casei* seront analysés de la même

façon et serviront de témoins. Le gavage à l'aide de canules adaptées est un acte qui n'entraîne aucun dommage au tractus digestif, en effet par un mécanisme réflexe l'animal avale la canule. De plus le nombre de gavage est réduit au maximum.

5692. L'infection à salmonelles et autres bactéries à Gram négatif représente un problème important de santé publique aussi bien dans les pays industrialisés que dans les pays en développement. Chez l'homme et les animaux de la ferme, *Salmonella enterica serovar Typhimurium* peut causer trois manifestations cliniques différentes : la gastro-entérite, la bactériémie, et l'état de porteur asymptomatique. Ces manifestations sont plus courantes chez les enfants de moins de 5 ans, chez les adultes de 20 à 30 ans et chez les patients de 70 ans et plus. Chez la souris de laboratoire, *Salmonella enterica serovar Typhimurium* peut causer une bactériémie résultant en choc septique. Il n'y a pas de gastro-entérite. L'objectif de ce projet est de tester un nouveau panel de lignées de souris, présentant une plus grande diversité génétique que les souris de laboratoire classiques et plus proche de celle observée dans la population humaine, pour leur sensibilité à l'infection à salmonelles dans le but d'identifier de nouveaux déterminants génétiques associés avec la résistance à l'infection. La découverte de facteurs de résistance d'origine génétique est d'une grande importance dans les maladies infectieuses et pourra permettre d'identifier de nouveaux moyens de prévention et de traitement chez l'homme. Bien que des tests d'infection de cellules en culture fournissent certaines informations, ils ne reflètent pas la totalité des mécanismes physiologiques mis en place chez un animal pour répondre à une infection et le recours à l'animal pour ce projet est nécessaire. Ce projet nécessite d'infecter expérimentalement des souris par voie intraveineuse. Les 2 sexes, mâles et femelles, seront utilisés afin de tester une éventuelle différence de sensibilité à l'infection en fonction du sexe. Nous réaliserons le moins d'infections expérimentales possibles en utilisant à chaque fois un large groupe d'animaux de façon à réduire la variation inter-expérimentale et réduire globalement le nombre d'animaux contrôles utilisés. Le nombre d'animaux estimés nécessaires au projet est comparable à ceux de la littérature pour des études similaires et correspond au nombre nécessaire pour valider statistiquement l'objectif fixé. Ce nombre pourrait être en réalité légèrement inférieur, si le facteur sexe ne s'avère pas avoir d'influence sur la survie des différentes lignées testées.

Ce projet se traduira pour une durée de 5 ans par l'utilisation de 4720 souris.

Les souris seront hébergées en groupe, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification et elles seront maintenues dans un environnement protégé tout au long de l'infection. Les animaux seront évalués cliniquement tous les jours, 2 fois par jour, et durant toute la durée de l'infection. Le degré de sévérité attendu varie de modéré à sévère en fonction des procédures du projet et de la sensibilité des différentes lignées testées. Les souris sensibles pourront devenir malades et si elles présentent des signes avérés de détresse (grille de suivi de la douleur, du stress et de l'inconfort recommandée par le comité d'éthique) avant la fin de l'expérimentation, elles seront euthanasiées. Les souris résistantes survivront, elles, à l'infection et seront humainement euthanasiées à la fin de l'étude.

5693. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques qui pourraient faire preuve d'efficacité dans le traitement de l'incontinence urinaire ou des troubles de l'érection. Ils permettent aussi, pour certains, de déceler les risques de troubles urinaires.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et est mis en œuvre au sein du laboratoire. Ces tests nécessitent l'utilisation d'animaux. Même si des tests *in vitro* peuvent être réalisés afin de mettre en évidence certains effets des substances testées, ces effets devront être confirmés *in vivo* dans le modèle animal. L'utilisation d'animaux est donc indispensable. Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à pouvoir interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests.

Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre d'animaux qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 400 rats et de 30 chiens. Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant d'euthanasier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

5694. De nombreuses études épidémiologiques ont montré un lien entre l'exposition maternelle à une infection bactérienne ou virale pendant la grossesse et le développement de troubles neurologiques chez la descendance à l'âge adulte. Plus particulièrement, une infection maternelle représente un facteur de risque pour l'apparition de pathologies neurodéveloppementales telles que l'autisme ou la schizophrénie. Ces altérations ont pour origine une neuroinflammation chronique généralisée dans le cerveau du fœtus suite à l'activation du système immunitaire de la mère. Ainsi, cibler la réponse inflammatoire maternelle pourrait être une stratégie originale et prometteuse dans l'amélioration des symptômes cognitifs apparaissant chez la descendance. Nous proposons de développer une stratégie nutritionnelle, anti-inflammatoire, basée sur un enrichissement du régime en acides gras polyinsaturés de la famille n-3, communément appelés "oméga-3". Ces derniers ont une activité immunomodulatrice et favorisant les processus anti-inflammatoire au détriment des processus pro-inflammatoires. Nous faisons donc l'hypothèse qu'un régime enrichi en oméga-3 dès le premier jour de gestation ou après la naissance pourrait prévenir le développement de déficits cognitifs chez la descendance *via* la limitation de la réponse inflammatoire maternelle.

Nous ne pouvons remplacer les animaux par d'autres techniques telles que la culture cellulaire puisque nous nous intéressons aux réseaux neuronaux et à leur modulation par la nutrition.

Nous utiliserons 374 animaux au total. Pour toutes les procédures expérimentales, nous avons calculé le nombre minimal de souris requis afin d'aboutir à des données analysables par méthodes statistiques classiques. Nous prenons enfin en compte le bien-être des

animaux *via* l'enrichissement des cages, la stabulation en cages collectives, la prise en charge de la douleur si nécessaire et l'euthanasie des animaux si les points limites sont dépassés.

5695. L'autophagie (AP) est un processus physiologique qui régule l'homéostasie cellulaire. L'AP est conservée au cours de l'évolution et caractérisée par une importante accumulation de vacuoles autophagiques à double membrane (autophagosomes) dans le cytoplasme des cellules. L'AP est aussi un mécanisme d'adaptation cellulaire en condition de stress et son absence est souvent observée dans des maladies neuro-dégénératives et cancers. Il a été récemment démontré que l'induction de l'AP induit une libération rapide de ACBP (Acyl-CoA binding protein). ACBP est une petite protéine qui fonctionne à la fois au niveau intracellulaire, dans le cadre du métabolisme des acides gras, et de manière extracellulaire comme inhibiteur du récepteur de type A de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Les récepteurs GABA de type A (GABAA) sont des canaux ioniques qui sont activés par fixation du GABA. Ces récepteurs ionotropes ont une grande importance en physiologie des mammifères, étant le GABA le principal neurotransmetteur inhibiteur. Les canaux GABAA sont la cible de plusieurs molécules pharmacologiques, inclus les benzodiazépines, les barbituriques, les alcools, les anesthésiques généraux volatils. Jusqu'à présent, la relation fonctionnelle entre l'AP et la modulation du récepteur GABAA n'a pas été étudiée. Le but de ce projet consiste à évaluer cette régulation. Cette étude peut être conduite seulement *in vivo* car la modulation du récepteur du GABA implique et/ou affecte des voies métaboliques et/ou des régulations physiopathologiques qui ne peuvent pas être évalués *in vitro*. Ce projet se dessine sur 5 ans et implique l'utilisation de souris immunocompétentes (n. 330) et immunocompétentes transgéniques (n. 900). Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

5696. Les infections nosocomiales (IN) font partie des infections associées aux soins (IAS). Elles surviennent au cours ou après une prise en charge (diagnostique, thérapeutique, palliative, préventive ou éducative) d'un patient. Elles n'étaient pas présentes, ni en incubation au début de la prise en charge (définition établi par le comité technique des Infections Nosocomiales et des Infections liées aux Soins (CTINILS)).

En France, les IN représentent un problème de santé publique important, en raison notamment de la fréquence croissante des déficits immunitaires (âges, maladies primaires, traitements entraînant des immunodéficiences), de l'apparition de nouveaux micro-organismes et de l'augmentation de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Les micro-organismes responsables d'infections graves les plus fréquemment rapportés en France sont *Escherichia coli* (26%), *Staphylococcus aureus* (15.9% dont 38% résistant à la pénicilline), *Pseudomonas aeruginosa* (8.4%) et *Klebsiella pneumoniae* (4.8%).

L'objectif de cette étude est de mettre au point des modèles pré-cliniques murins. Ils permettront d'intégrer un grand nombre de caractéristiques de la pathologie humaine. Nous allons étudier ainsi l'infection (virulence, dissémination) de ces souches (souches de référence et isolats cliniques), et tester l'activité de nouveaux agents thérapeutiques dont l'innocuité a été préalablement éprouvée (modèles *in vitro*). Cette étude contribuera à apporter une première approche dans la stratégie à déployer chez les patients.

Les infections expérimentales à réaliser vont être préalablement planifiées en fonction de l'agent infectieux pour mettre au point un modèle qui permettra de mimer les conditions de contamination et de dissémination chez l'homme. Le nombre minimal d'animaux à utiliser sera établi en collaboration avec un biostatisticien.

Pour réduire le nombre de souris et améliorer la sensibilité et la spécificité du suivi de la cinétique d'infection/thérapie, les agents infectieux vont être transformés pour devenir bioluminescents (ou fluorescents). Nous utiliserons des souris ayant un déficit immunitaire ou non (en fonction de la pathologie étudiée).

Jusqu'à 675 souris seront utilisées sur 5 ans.

Ces agents pathogènes vont engendrer des infections sévères chez les souris. Un suivi clinique journalier sera mis en place (poids, fièvre, comportement). Une euthanasie éthique sera effectuée dès l'atteinte d'un score clinique élevé, sinon, les souris seront euthanasiées à la fin de l'étude.

5697. La commande centrale respiratoire (CCR), qui génère notre rythme respiratoire, est élaborée par un réseau de neurones localisés principalement au niveau pont et du bulbe rachidien. L'activité de ce réseau est régulée en permanence par des afférences provenant de chémorécepteurs centraux (système nerveux central) et/ou périphériques (corps carotidiens) permettant de maintenir l'homéostasie. Lorsque l'organisme se trouve en hypercapnie (augmentation du taux de CO<sub>2</sub> dans le sang), en acidose (diminution du pH sanguin) ou en hypoxie (diminution du taux d'O<sub>2</sub> dans le sang), des informations issues de ces chémorécepteurs influencent le réseau respiratoire. Le dysfonctionnement de ces mécanismes peut conduire chez l'Homme à des pathologies respiratoires telles que les syndromes d'hypoventilation alvéolaire centrale (CHS). Ces pathologies résultent de désordres neurologiques affectant les récepteurs sensoriels, les centres à l'origine de l'élaboration de la CCR ou l'intégration des messages issus des récepteurs sensoriels

et se traduisent notamment par une altération de la réponse respiratoire à l'hypercapnie. Ces CHS englobent différentes pathologies dont la mieux caractérisée est le syndrome d'Ondine (ou Congenital Central Hypoventilation Syndrome – CCHS). Ce dernier est dû à l'absence de neurones positifs pour Phox2B et chémosenseurs au CO<sub>2</sub>/pH localisés au niveau du noyau retrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial. Cette absence induit une altération de la réponse au CO<sub>2</sub>/pH résultant en une hypoventilation profonde durant le sommeil qui aboutit à une hypoxémie délétère pour l'organisme.

De récentes données indiquent que l'érythropoïétine (Epo) participe au contrôle de la ventilation. En effet, l'Epo peut influencer le métabolisme des catécholamines dans le tronc cérébral et dans les corps carotidiens et régule de manière sexe-dépendante la réponse ventilatoire à l'hypoxie chez l'Homme et la souris. L'Epo sécrétée dans le plasma et dans le système nerveux central, interagit avec des structures périphériques et centrales impliquées dans la CCR et sa régulation au cours d'épisodes hypoxiques. Cet effet a été attribué à la présence de récepteurs à l'Epo (Epo-R) au niveau de structures centrales et périphériques impliquées dans la régulation de la CCR. Tenant compte de ces récentes données et du fait que les régions impliquées participent également à l'adaptation de la CCR à l'hypercapnie, nous suggérons que l'Epo module la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Afin de valider cette hypothèse, nous utiliserons un modèle de souris transgéniques anémiques SV-40T sous exprimant l'Epo (Epo-TAgh) mâles et femelles.

Les premiers résultats obtenus dans notre laboratoire ont permis de mettre en évidence un rôle de l'Epo sur le patron ventilatoire mis en place lors de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie ainsi qu'une action de l'Epo sur les chémorécepteurs centraux et périphériques, associé à un effet dépendant du sexe.

Les objectifs de cette nouvelle étude seront premièrement de déterminer l'implication des chémorécepteurs périphériques (corps carotidiens) sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie puis d'étudier l'implication des hormones sexuelles femelles dans la mise en place des réponses ventilatoires à l'hypoxie et à l'hypercapnie. Enfin, nous tenterons de déterminer les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à l'effet de l'Epo sur la ventilation. Nous caractériserons les modalités de participation des mécanismes périphériques et/ou centraux, en particulier la mise en jeu de systèmes de neurotransmission spécifiques.

Durant toutes les séries expérimentales, des précautions seront prises pour suivre la réglementation des 3R. La complexité des techniques et le besoin d'obtenir des tissus associés à l'utilisation d'une lignée de souris transgénique nous obligent à travailler sur un modèle animal. Afin de limiter le nombre d'animaux, le même animal sera utilisé dans plusieurs conditions 140 animaux seront utilisés dans ce projet et seront hébergés selon un cycle jour/nuit classique (12h/12h) et à une température de 22°C. De plus, l'hébergement des animaux sera fait selon la nouvelle réglementation en vigueur sur la taille des cages (106cm<sup>2</sup> par animal) et l'enrichissement (coton).

## 5698. 1. But du projet

Ce projet de recherche a pour objectif d'étudier, sur modèle animal, les phénomènes d'entrée et de sortie de cellules immunitaires responsables de l'inflammation du muscle observée au début du développement de la maladie chez des patients souffrant de calpainopathie.

## 2. Description du projet

### 2.1 Généralités

La calpainopathie est une maladie génétique rare qui se déclare dès la petite enfance et se développe durant toute la vie du patient, dont les principaux symptômes sont une faiblesse des muscles au niveau des épaules (ceinture scapulaire) et du bassin (ceinture pelvienne) pouvant aboutir à une perte de mobilité ; ainsi qu'une difficulté pour les muscles à "se réparer". Chez plusieurs patients, une maladie appelée « myosite à éosinophiles » a été diagnostiquée lors de la petite enfance ou de l'adolescence, coïncidant avec le début du développement de la calpainopathie. La myosite à éosinophiles est causée par l'entrée et la présence importante de ces cellules dans le muscle. Elles causent la mort des cellules voisines en libérant des produits toxiques, ce qui entraîne une inflammation locale du muscle. Des médicaments sont actuellement disponibles et couramment utilisés pour limiter ce type d'inflammation. Toutefois, afin de sélectionner le traitement le plus adapté au phénomène d'inflammation, il est nécessaire de l'étudier plus précisément de manière à déterminer quelles sont exactement les cellules immunitaires qui entrent et sortent du muscle, dans quel ordre et à quel moment. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que la possibilité d'inhiber l'entrée et la présence de ces cellules dans les muscles des ceintures pelvienne et scapulaire améliore la reconstruction du muscle et retarde le développement de la myopathie, voire permet d'éviter la perte de mobilité. C'est pourquoi nous voulons réaliser une étude préclinique pour affiner sur modèle animal une approche thérapeutique potentiellement transférable à l'homme.

### 2.2 Design de l'étude

L'étude (dite étude préclinique) sera réalisée sur des souris souffrant de calpainopathie et aura pour objectifs d'étudier le phénomène d'inflammation au cours du développement de la maladie. Nos travaux se déroulent dans le respect de la règle des 3R (remplacer, réduire et raffiner) grâce à l'utilisation de procédure permettant de réduire le nombre de souris en utilisant les mêmes animaux pour plusieurs expériences, de réduire le stress et la douleur et de n'utiliser que le nombre de souris nécessaire pour l'exploitation de nos données par analyses statistiques. Les critères que nous allons étudier sont de types morphologiques et physiologiques, et ne sont donc pas reproductibles avec des cultures de cellules musculaires ; c'est pourquoi nous ne pouvons pas remplacer le modèle animal. Ces modifications seront observées grâce à différents critères :

- Intensité de l'inflammation dans le muscle ;
- Identification et nombre de cellules immunitaires dans plusieurs prélèvements biologiques responsables de l'inflammation ;
- Evolution structurale et fonctionnelle au niveau musculaire.

Pour étudier ces critères, nous allons utiliser deux modèles de souris : un modèle atteint de calpainopathie (représentant le "malade") et un modèle « sauvage » (représentant le "sujet sain"). Dans la phase 1 de cette étude, nous comparerons 2 groupes de 12 animaux et nous suivrons le développement de la maladie grâce à des procédures expérimentales réalisées à différents âges des animaux : 40 jours, 60 jours, 120 jours et 180 jours ; soit un total de 24 animaux, ce qui représente un nombre modéré mais suffisant pour notre

projet. L'étude de la progression de l'inflammation sera effectuée par une technique d'imagerie médicale, l'imagerie par résonance magnétique (IRM), appliquée au petit animal ; l'étude structurale du muscle et de l'intensité de l'inflammation et les cellules immunitaires engagées sera, quant à elle, réalisée en parallèle sur certains animaux à chaque temps de mesure par des techniques classiques de laboratoire (2 animaux/groupe à 40 jours, 60 jours et 120 jours ; 6 animaux/groupe à 180 jours). Grâce à l'étude par IRM, nous espérons ainsi déterminer les âges des animaux auxquels l'inflammation provoquée par l'infiltration des cellules immunitaires sera la plus importante. Cela nous permettra de procéder à la phase 2 de l'étude. Dans cette phase 2, nous devrons augmenter notre nombre total de souris à  $n = 10$  individus/groupe pour 2 ou 3 temps de mesure en ce qui concerne uniquement l'étude de l'intensité de l'inflammation et les cellules engagées pour être statistiquement relevant. Un total de 72 animaux est envisagé pour cette étude.

### 2.3 Gestion du bien-être animal

Toujours dans le respect de la règle des 3R, le choix et le déroulement de nos expériences ont été déterminés afin de réduire au maximum le nombre d'animaux à utiliser, tout en obtenant des résultats significatifs, mais aussi en limitant le stress et la douleur qui pourraient être causés : un suivi dit longitudinal sur les mêmes souris, de l'âge de 40 jours à 180 jours grâce à l'IRM, une technique totalement indolore et non invasive; les expériences réalisées dans une pièce à l'écart de la salle d'hébergement et opérées par un manipulateur formé au bien-être animal. De plus, nous avons déterminé des points limites à ne pas franchir pour respecter le bien-être de l'animal : un contrôle régulier de l'état clinique de nos animaux sera réalisé et selon un système d'évaluation avec indices de 0 (normal ou léger) à 3 (changements importants par rapport à la normale) sera utilisé. Le protocole sera arrêté pour tout animal obtenant un score supérieur ou égal à 2 dans deux de ces catégories. Les souris seront hébergées collectivement (mâles et femelles séparées) et le milieu sera enrichi par la présence de petite maisonnette en papier que les souris peuvent utiliser pour se protéger ou bien ronger et dépiapter. Deux à trois fois par semaine, un contrôle de l'eau de boisson, de nourriture et de l'état clinique des souris sera réalisé. Le changement des litières aura lieu une fois par semaine.

5699. Un nouveau traitement par radiothérapie fractionnée spatialement (MRT) permet d'augmenter la dose déposée au niveau de la tumeur en limitant les effets secondaires dans le tissu sain. Les travaux en cours suggèrent qu'outre les effets secondaires limités, cette technique est plus efficace que la radiothérapie conventionnelle. Par ailleurs, des travaux ont démontré que l'efficacité de cette nouvelle méthode repose sur l'endommagement préférentiel des vaisseaux de la tumeur. Ceci induit la destruction des cellules endothéliales et la diminution du nombre de vaisseaux, et par conséquent la diminution de la perfusion et l'hypoxie de la tumeur. D'un autre côté, la radiothérapie conventionnelle s'est améliorée au fil des années, et elle est actuellement associée à des nanoparticules d'or (NPO). Cette approche s'est révélée efficace pour mieux contrôler la tumeur dans différents modèles expérimentaux. Par exemple, la survie de souris porteuses d'un carcinome mammaire traité par NPO et par irradiation a pu être prolongée de 68 % par rapport à des souris traitées uniquement par irradiation. Des données provenant de différents établissements montrent des résultats comparables et s'accordent sur le fait que la présence de NPO amplifie sélectivement la dose d'irradiation déposée dans la tumeur, sans augmenter la dose sur les tissus sains. Cet effet d'amplification de la dose est produit par une cascade d'électrons provenant d'éléments à numéro atomique élevé, tels que l'or, ayant été impactés par des photons dans la plage des kilo-V. L'amplification de la dose est sélective de la tumeur. En effet, les NPO sortent du système vasculaire nouvellement formé dans la tumeur qui présente des fuites, contrairement au système vasculaire normal. Ce phénomène est désigné effet de perméabilité et de rétention amplifiée (Enhanced Permeability and Retention, EPR).

Nous proposons dans ce projet de traiter le mélanome en associant la nouvelle méthode de radiothérapie fractionnée spatialement et les NPO présentant des propriétés d'amplification de la dose. Ce projet se justifie pour les cas de mélanome non détectés qui métastasent rapidement dans les ganglions lymphatiques, le cerveau et les poumons. Dans ce cas, la radiothérapie joue un rôle essentiel pour traiter les patients. Ce projet vise à proposer un traitement palliatif plus efficace et étudie comment et quand administrer les NPO à l'animal ou au patient pour améliorer sa survie.

Le modèle expérimental proposé permet de suivre *in vivo* les variations de morphologie des vaisseaux sanguins et de la circulation sanguine avant et à différents moments après le traitement. L'observation *in vivo* d'une tumeur représente une occasion essentielle de comprendre et caractériser la réaction vasculaire et les réponses inflammatoires suite à ce traitement combiné.

Les animaux utilisés pour ce projet seront des souris C57BL/6J élevées en Europe. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire (224 animaux sur 2 ans). Nous avons évalué la possibilité de remplacer, réduire et améliorer nos expérimentations selon la règle suivante :

- Remplacement : comme ce projet mesure la survie des animaux après un traitement anti-tumoral, nous ne pouvons pas remplacer les animaux vivants par un modèle cellulaire ou une simulation informatique.
- Réduction : le nombre d'animaux utilisés a été déterminé par des méthodes statistiques, ce qui nous a permis de réduire autant que possible le nombre de souris utilisées, tout en conservant un nombre suffisant pour ne pas compromettre les objectifs des expérimentations et ainsi la validité des résultats.
- Amélioration : la santé des animaux sera surveillée pendant toute l'expérimentation. Ceci nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée au moindre signe de souffrance.

Si le projet réussit, l'efficacité de ce traitement pourrait dépasser les cas de mélanome. Par conséquent, il représente une opportunité unique de développer un traitement innovant présentant de fortes chances d'améliorer la survie du patient.

5700. L'autophagie (AP) est un processus physiologique qui régule l'homéostasie cellulaire. L'AP est conservée au cours de l'évolution et caractérisée par une importante accumulation de vacuoles autophagiques à double membrane (autophagosomes) dans le cytoplasme des cellules. Les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes conduisant à la digestion de leur contenu par les

hydrolases lysosomales. L'exécution et la régulation de l'AP mettent en jeu des gènes spécifiques et différentes voies de signalisation. L'AP est aussi un mécanisme d'adaptation cellulaire en condition de stress et son absence est souvent observée dans des maladies métaboliques, neurodégénératives et cancers. L'objectif de ce projet est d'évaluer les mécanismes moléculaires liés à l'induction de l'autophagie *in vivo*. Cette étude ne peut être conduite qu'*in vivo* car il n'y a pas de modèles alternatifs pour l'étude de l'activation de l'autophagie systémique. Nous avons sélectionné *in vitro* des composés capables d'induire l'autophagie. Nous avons besoin de réaliser des expériences *in vivo* chez les souris afin de pouvoir confirmer nos données obtenues *in vitro*. Pour la réalisation de cette étude, nous effectuerons des expériences d'induction de l'autophagie chez la souris et l'objectif est d'évaluer l'efficacité de ces traitements. Ce projet, d'une durée maximale de 3 ans, impliquera l'utilisation de souris immunocompétentes transgéniques déficientes pour l'autophagie comparées aux animaux normales (nombre totale d'animaux = 1008). Ce nombre d'animaux est le nombre maximal que nous envisageons d'utiliser. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales seront négatives par rapport à l'hypothèse de travail. Ce projet prévoit 2 procédures qui sont conséquentes. La procédure 1 nous permettra d'optimiser les conditions des traitements qui seront utilisés dans la procédure suivante. Nous limiterons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. Nous chercherons à regrouper les expérimentations afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Néanmoins, nous pourrions avoir à utiliser moins de souris si la significativité apparaît avec moins de souris. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification, de tunnels en cartons et bâtonnets à ronger).