



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

Résumés non techniques des projets autorisés (57)

5701. La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est la forme de fibrose la plus courante. Elle se caractérise par une atteinte des voies aériennes distales et notamment des alvéoles conduisant à un déclin progressif et irréversible de la fonction respiratoire. Les mécanismes à l'origine de cette maladie sont encore mal connus et il n'existe aucun traitement curatif. Les patients atteints de FPI présentent une hypoxie alvéolaire. Il a également été mis en évidence l'expression de marqueurs d'un stress du réticulum endoplasmique (RE).

Le but de notre projet est d'étudier l'implication de l'hypoxie et du stress du RE dans la fibrogenèse. L'accès aux poumons de patients est limité. Pour mener à bien notre étude, nous utiliserons un modèle de rats exposés à des conditions d'hypoxie aiguë (de 16h à 72h) à partir desquels les poumons seront prélevés.

Le projet se déroulera sur 9 mois avec 40 rats et sera mené en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement très fortement encouragées dans la nouvelle directive européenne. En effet, dans le cadre du principe de réduction, les poumons prélevés d'un même rat seront utilisés pour des analyses histochimiques, protéiques et également de transcrits. De plus, dans le cadre du principe de remplacement, nous disposons au laboratoire de lignée de cellule pulmonaire qui éviteront l'utilisation de rats supplémentaires pour réaliser des études de mécanistique.

Dans le cadre du principe de raffinement, le personnel travaillant avec les animaux possède le diplôme en expérimentation animale de niveau I ou II. Les conditions de traitement des rats et la méthodologie utilisée viseront à limiter au mieux les éventuelles souffrances que pourraient ressentir les animaux.

5702. Le but de ce projet est l'évaluation de l'effet sur l'homéostasie calcique de l'inhibition de la Sarcopline sur la progression de la cardiomyopathie et des arythmies cardiaque dans le cadre de la dystrophie musculaire liée à des mutations dans le gène LMNA codant des protéines de l'enveloppe nucléaire.

L'espèce animale utilisée pour ce projet est la souris *Mus musculus*. En effet, afin d'étudier la physiopathologie de cette pathologie nous avons créé un modèle murin par transgénèse ciblée porteur d'une mutation décrite chez l'homme. Ce modèle murin récapitule à l'état homozygote les caractéristiques phénotypiques de cette pathologie ; atteintes des muscles squelettique et cardiaque. Les premiers symptômes sont détectés dès 3 mois chez les mâles homozygotes (apparition des symptômes plus précoces que chez les femelles) et évoluent rapidement jusqu'au décès des animaux, provoqué principalement par l'aggravation du phénotype cardiaque. Par conséquent ce modèle constitue le modèle de référence (il n'y a pas de modèle *in vitro* pour étudier cette problématique) pour tester l'administration du shSLN (SLN encode la sarcopline) afin de déterminer ses effets thérapeutiques sur la progression du phénotype cardiaque et musculaire dans le contexte de cette pathologie (« Replace »).

Le nombre d'animaux inclus dans ce protocole est 12. Le plan expérimental est déterminé à l'aide du module IPSUR du logiciel R. Ce modèle permet de déterminer le nombre minimum d'animaux à inclure dans l'expérimentation tout en ayant suffisamment de données expérimentales pour appliquer les tests statistiques nécessaires à l'analyse des données (« Reduce »).

Afin de minimiser les interventions sur les animaux au cours du traitement, l'administration du shSLN (dans un AAV9) sera effectuée à l'aide d'une injection veineuse (retro-orbitale). La méthode d'évaluation de l'effet thérapeutique sur la fonction cardiaque est non invasive et nécessite uniquement une anesthésie légère. Tous les animaux sont mis à mort à la fin du protocole. La mise à mort est indispensable pour évaluer *ex-vivo* l'homéostasie calcique par histologie et biologie moléculaire. Le milieu est enrichi avec du woodwools ou du coton compacté en formats prédécoupés de dimensions 50 x 50 mm pour la nidification des souris. Des igloos (maisonnettes) en polypropylène sont disposés dans les cages permettant les jeux et le repos des souris (« Refine »).

5703. 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 (O₂) pour alimenter tout l'organisme. 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 aucuns 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. Depuis les années 2000, plusieurs gènes de prédisposition à l'hypertension artérielle pulmonaire ont été identifiés. Très récemment des mutations dans le gène KCN3 ont été identifiées chez des patients atteints d'HTAP, cependant le rôle de ce gène dans le développement de l'hypertension pulmonaire n'est que très peu connu. C'est pourquoi nous nous proposons d'étudier le rôle de ce gène dans cette maladie.

La majorité des patients atteints d'HTAP développent cette maladie consécutivement à une insuffisance cardiaque gauche. C'est pourquoi nous nous attacherons à étudier le rôle de ce gène dans l'hypertension artérielle pulmonaire consécutive à une insuffisance cardiaque gauche induite par ligature de l'aorte ascendante. Les méthodes alternatives *in vitro* ne nous permettant pas la bonne réalisation de ces expériences, elles seront effectuées chez le rat.

Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. De plus, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). Ainsi, les fonctions cardiovasculaires seront étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. De plus, nous effectuerons un suivi longitudinal de la maladie par échocardiographie et par dosages des différents marqueurs de la maladie, ce qui nous permettra de déterminer le moment où l'animal devra être sacrifié sans que celui-ci ne présente encore de symptômes de souffrance/douleur. Les animaux sont mis à mort 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. 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. Le nombre total de rats utilisés sera de 180 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même 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.

5704. Selon l'OMS, on estime à 14,1 millions le nombre de nouveaux cas de cancer et à 8,2 millions le nombre de décès liés au cancer survenus en 2012. Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués dans le monde sont ceux du poumon (avec 1,8 million de cas), du sein (1,7 million de cas) et le cancer colorectal (1,4 million de cas). Dans ce cadre, nous proposons d'évaluer un panel de nanoparticules à visée diagnostique et/ou thérapeutique. Les particules porteront un marqueur fluorescent qui permettra de suivre leur comportement dans l'organisme en temps réel et de façon non invasive par imagerie de fluorescence. Les particules cibleront différentes protéines d'intérêt, généralement surexprimées dans la plupart des cancers. Les lignées de cellules cancéreuses étudiées auront été au préalable transfectées avec le gène de la luciférase. Elles pourront ainsi être suivies dans l'organisme de façon non invasive par imagerie de bioluminescence. Les particules seront tout d'abord testées *in vitro* sur cellules tumorales en culture. Seules les particules validées *in vitro* seront évaluées *in vivo*. Le modèle murin semble le plus approprié, il permet de se rapprocher d'un grand nombre des caractéristiques de la pathologie humaine.

La caractérisation des particules *in vivo* s'effectuera en 3 étapes : leur biodistribution sera évaluée dans un premier temps chez des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées (différentes lignées de cellules cancéreuses seront implantées : peau, poumons, cerveau, sein, ovaire, colon) avec en parallèle, sur un autre groupe de souris, la détermination de leur cinétique sanguine. Les particules les plus pertinentes seront testées ensuite dans un modèle de tumeur orthotopique, ce qui signifie d'implanter les cellules cancéreuses dans leur site de développement naturel (peau, poumons, cerveau, sein, ovaire, colon), afin de mimer au mieux la réalité biologique. L'implantation des cellules tumorales sera réalisée sous anesthésie et la croissance des tumeurs sera surveillée (par imagerie de bioluminescence) de façon à ne pas atteindre un stade de développement douloureux. L'évaluation des particules sera réalisée sous anesthésie par imagerie de fluorescence non invasive.

En parallèle, nos études porteront sur le développement de thérapies innovantes contre le cancer. De nouvelles molécules anti-cancéreuses seront testées tout d'abord sur cellules cancéreuses en culture. Les molécules les plus efficaces *in vitro*, seront alors évaluées *in vivo*. Pour cela, les molécules anti-cancéreuses seront administrées chez des souris porteuses de différentes lignées de cellules tumorales implantées en sous-cutanée. L'efficacité des molécules anti-cancéreuses sera jugée sur leur action sur la tumeur sous-cutanée et/ou sur l'apparition de métastases (dont le développement sera suivi par imagerie de bioluminescence).

Notre expérience de ces modèles de cancers a permis d'établir que l'implantation sous cutanée de 16 animaux permet de retenir 12 animaux pour l'expérimentation en imagerie. Pour les modèles orthotopiques (cancer du poumon, peau, cerveau, sein, ovaire, colon) l'implantation de 15 animaux garantit l'obtention de 10 animaux porteurs de tumeur de taille homogène. Tous les animaux qui développeront des tumeurs de la taille visée seront conservés dans l'étude. Les animaux présentant des tumeurs de taille trop éloignée de l'objectif seront écartés et euthanasiés.

Pour l'étude d'une nanoparticule, nous prévoyons d'utiliser 88 souris, selon les étapes suivantes :

- 1- Etude de biodistribution : 16 souris implantées en sous-cutanée, 3 temps post-injection (sacrifice à 5h, 24h et 48h p.i.) soit 48 souris
- 2- Etude de cinétique sanguine : 10 souris injectées
- 3-Etude sur tumeur orthotopiques : 30 souris implantées en orthotopique (la lignée cancéreuse choisie dépendra de la particule étudiée).

L'analyse de chaque étape permettra de dire si l'étape suivante sera engagée ou non.

Les études de molécules anti-cancéreuses s'effectueront sur 3 groupes de 10 souris (1 groupe molécule d'intérêt, 1 groupe non traité, 1 groupe molécule contrôle), soit 30 souris.

Ce projet s'inscrit sur 5 ans. Nous prévoyons l'étude de 40 nanoparticules soit 3520 souris, et 40 molécules anti-cancéreuses soit 1200 souris, soit 4720 souris au total.

Conformément à la règle des 3R:

Remplacer : Les tests *in vitro* permettront de réduire le nombre de composés/particules à tester ainsi que le nombre de lignées de cellules. Les paramètres de biodistribution sont obtenus uniquement par l'emploi d'animaux. Ces études précliniques sont nécessaires 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. Toutes les souris seront utilisées, sachant qu'une tumeur qui ne se développe pas constitue quand même une information scientifique qui sera prise en compte. Les nombres de souris indiqués par condition sont nécessaires pour une analyse statistique fiable, évitant de refaire l'expérience.

Raffiner : Nous utiliserons des souris immuno-déprimées, qui représentent un modèle proche de la physiopathologie humaine, et permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les animaux seront 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 n'entraîne pas de gêne et sera suivie régulièrement au pied à coulisse et par imagerie de bioluminescence. La gravité des procédures est légère pour les biodistributions, cinétiques sanguines et traitements. Elle sera modérée pour les études sur tumeurs orthotopiques. 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.

5705. Nos lymphocytes B servent, une fois différenciés, à produire les anticorps protecteurs contre tout agent infectieux. Dans ce projet nous allons étudier le rôle d'une molécule dans la survie des cellules productrices d'anticorps, les plasmocytes, au niveau de l'intestin et du sang. Comme toute cellule, le lymphocyte B et le plasmocyte peuvent se transformer et donner une cellule cancéreuse. Ce projet aura aussi pour but de tester si notre molécule d'étude peut être considérée comme une cible avec une valeur thérapeutique pour le contrôle de ces cancers.

La règle des 3R a été appliquée. La réduction du nombre d'animaux est appliquée par le groupe minimal nécessaire pour obtenir une différence statistique, et par un groupe encore plus minimal pour des expériences n'impliquant pas de calcul statistique. Le raffinement est appliqué par l'arrêt de l'expérimentation si des effets non significatifs sont obtenus dans une expérience pilote impliquant un nombre très restreint d'animaux. Le remplacement est appliqué par la détermination de la dose d'anticorps à utiliser non pas expérimentalement mais d'après la littérature.

Nous prévoyons d'utiliser 592 souris.

5706. 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 réponse à l'activation de protéines appelées récepteurs 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'asepsie appropriées et nous utiliserons les stratégies expérimentales les plus adaptées pour minimiser leur souffrance. Nous mettrons en place un suivi clinique quotidien des animaux.

5707. L'obésité est un problème de santé publique prioritaire dans les sociétés occidentales. Sa prévention et son traitement passent bien évidemment par une meilleure compréhension des mécanismes qui contrôlent l'appétit et la prise alimentaire. Parmi eux, l'olfaction joue un rôle prépondérant. En effet, l'odeur de l'aliment est un des premiers indices utilisés par l'organisme pour initier la prise alimentaire, elle module les taux circulants de glucose et d'insuline, provoque la sécrétion de salive et les contractions gastriques. En retour, l'état nutritionnel module la perception olfactive. La valence hédonique d'un aliment est clairement dépendante du statut nutritionnel d'un animal et la diversité olfactive peut réinitialiser une décision de prise alimentaire. Perception olfactive et régulation métabolique sont donc étroitement liées.

Physiologiquement, le déroulement de la prise alimentaire s'accompagne d'une variation de la concentration plasmatique en micronutriments et d'une sécrétion de peptides spécifiques. Les peptides orexigènes, comme la ghréline, sont libérés durant la phase pré-prandiale ce qui déclenche les sensations faim. Les peptides anorexigènes, comme l'insuline et la leptine, sont libérés lors de l'arrivée des aliments dans le tractus digestif. Ils induisent alors une sensation progressive de rassasiement et stoppent l'ingestion d'aliments. La cible centrale privilégiée de ces micronutriments et peptides périphériques, est l'hypothalamus.

Nous avons démontré que le bulbe olfactif (BO) est la cible des messages périphériques circulants incluant des hormones, des peptides et des nutriments. Ces molécules périphériques agissent directement sur le réseau bulbaire via des récepteurs et des transporteurs. Comme le BO, le cortex piriforme, cortex olfactif primaire, renferme également des récepteurs à ces molécules. Toutefois l'implication de ces différentes molécules dans le fonctionnement de ce cortex n'a encore pas été démontrée. Seuls des travaux anciens ont montré que le cortex piriforme antérieur jouant un rôle primordial dans la discrimination olfactive serait impliqué dans la détection de la variation centrale d'acides aminés essentiels consécutive à un déséquilibre nutritionnel.

A la lumière de nos précédents résultats nous faisons l'hypothèse que le système olfactif serait susceptible d'évaluer, en temps réel, les besoins nutritionnels de l'animal et d'adapter la perception olfactive pour influencer la prise alimentaire. Nous proposons que la discrimination olfactive serait modulée par (i) l'état alimentaire, (ii) la palatabilité de l'aliment et (iii) l'état métabolique de l'animal (l'animal obèse devrait attribuer une valeur hédonique plus élevée aux aliments que les animaux contrôles et/ou résistants à l'obésité). Ce projet vise donc une meilleure connaissance des relations entre la fonction olfactive et la prise alimentaire chez des animaux dans différents états métaboliques ou de satiété. Dans ce but, nous analysons grâce à des tests comportementaux l'évolution de la discrimination olfactive; de rats de références sans particularité métabolique (Wistar); de rats résistants à l'obésité (LouC) dérivés de la souche Wistar et de rats obèses (Zuckerfa/fa) et leurs homologues non-obèses les rats Zucker+/. Dans une autre série d'expériences nous identifierons les neurones exprimant les récepteurs et les transporteurs aux peptides et nutriments régulant la prise alimentaire. Puis nous administrerons ces molécules dans la couche des cellules pyramidales du cortex piriforme de rats vigiles soumis à un test comportemental. Cette dernière étape nous permettra d'identifier les acteurs moléculaires impliqués dans la modulation de la discrimination olfactive par les états alimentaires et métaboliques. Ces tests comportementaux seront réalisés dans un premier temps avec odeurs sans signification alimentaire puis dans un deuxième temps après avoir exposés les animaux aux odeurs testées préalablement associées à des aliments de valeurs énergétiques et palatabilité différentes.

Nous utiliserons donc des rats pour nos expériences car l'olfaction est la sensorialité dominante chez le rongeur et le système olfactif du rat ressemble beaucoup à celui de l'Homme. Comme l'étude de la modulation de la discrimination olfactive par les états métaboliques et alimentaires ne peut être investiguée que sur des individus réactifs, c'est-à-dire, capables de reconnaître grâce à des critères comportementaux, une différence entre deux odeurs proches, il est nécessaire d'utiliser des animaux éveillés pour ce type d'étude. Pour l'ensemble des 3 catégories de rats (normaux, résistants à l'obésité et obèses), 280 animaux au maximum devraient être utilisés sur les cinq années que durera ce projet. Nous réduirons le plus possible le nombre d'animaux utilisés en nous basant sur notre propre expérience, mais aussi en consultant un biostatisticien qui déterminera 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. Comme les processus de régulation de la prise alimentaire ainsi que le système olfactif du rat ressemblent beaucoup à ceux de l'Homme, les résultats de notre étude permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et les pathologies qui leur sont associées. A plus long-terme, ces recherches devraient permettre d'utiliser l'odeur comme un outil non invasif pertinent pour influencer les choix et les apprentissages alimentaires, voire offrir des alternatives dans le traitement de certaines pathologies du comportement alimentaire.

Le projet comprend des expérimentations de comportement ainsi que des expérimentations d'injection cérébrale pour lesquelles une chirurgie est nécessaire. Pour l'ensemble du projet, toutes les mesures permettant la limitation de la souffrance ou de la douleur de l'animal seront mises en place. Tous les actes chirurgicaux seront effectués sous anesthésie et analgésie. Après chirurgie, des antalgiques seront administrés aux animaux.

Le bien-être des rats est un souci permanent. Nous les gardons dans des cages communes (5 rats par cage) dans lesquelles nous ajoutons des accessoires de jeu.

5708. Les odeurs jouent un rôle majeur dans le comportement social et alimentaire du jeune dès la naissance, voire avant la naissance. La connaissance de leur nature ainsi que de leur mode d'action est essentielle pour comprendre la perception que le nouveau-né et le jeune organisme en développement ont de leur environnement olfactif, et l'utilisation qu'ils en font pour survivre et grandir (interaction avec la mère pour téter et être protégés, apprentissage d'informations nouvelles, préparation à la vie autonome), par exemple chez les espèces d'élevages. Cette connaissance est également bénéfique à l'Homme (optimisation du bien-être de l'enfant, né à terme ou prématuré).

Le présent projet porte sur une espèce modèle particulièrement intéressante sur le plan olfactif, le lapin. Le lapereau répond en effet dès la naissance à des odeurs émises par la mère qui l'aident à s'orienter vers elle, à localiser efficacement les tétines et à téter. Il répond notamment à une phéromone émise par toute lapine dans son lait: la phéromone mammaire (PM). La PM est un outil exceptionnel pour la recherche (seule phéromone connue à ce jour pour contribuer à la relation mère-jeunes chez un mammifère) car elle déclenche de façon immédiate et spontanée (sans apprentissage préalable) le comportement de tétée clairement observable et quantifiable du lapereau. En nature, elle n'est jamais perçue seule, mais au milieu d'autres odorants présents avec elle dans le lait ou sur le corps de la lapine, donc dans des contextes chimiques de mélanges de plusieurs odorants. De façon spectaculaire, elle permet par ailleurs au nouveau-né d'apprendre très rapidement (après une seule et brève association) de nouvelles odeurs. Alors que nous étudions la PM et le modèle lapin sous différents angles depuis plusieurs années (interaction mère-jeunes, identification chimique, évolution du rôle de la PM au cours de la journée et avec l'âge du jeune animal, traitement cérébral, apprentissage

d'odorants et mélanges d'odorants, conséquences de ces apprentissages sur les préférences sociales et alimentaires...), l'objectif ici sera de réaliser de nouvelles approches, complémentaires, permettant de mieux connaître les mécanismes de perception et de mémoire qui sous-tendent les comportements guidés par les odeurs chez le nouveau-né. Pour cela, nous nous positionnerons à trois niveaux de traitement: la respiration et le flairage associé, qui permettent d'échantillonner les odeurs, la cavité nasale (muqueuse olfactive) site d'entrée et de début de leur traitement, et le comportement (attraction/évitement, tétée) éventuellement exprimé suite à la perception de ces odeurs. Nous comparerons ces processus entre des animaux naifs et des animaux ayant appris une odeur grâce à la PM, et étudierons si ces processus changent au cours des premiers jours/premières semaines de vie postnatale.

Toutes les mesures envisagées ici seront effectuées selon des procédures standardisées.

Le comportement sera évalué en termes d'orientation spatiale et d'expressions de comportements précis (mouvements de tête et de bouche impliqués dans la localisation des tétines/la tétée). La respiration sera mesurée de façon non invasive dans une cage spécialisée dans laquelle l'animal se déplace sans contrainte. Enfin, l'enregistrement de réponses électrophysiologiques au niveau de la muqueuse olfactive impliquera une procédure plus invasive (mais déjà bien établie, décrite et validée) nécessitant le prélèvement de cette muqueuse. Dans tous les cas, les effectifs requis d'animaux seront réduits au strict minimum par groupes, tout en restant compatible avec l'analyse statistique et les données de la littérature. Au total, le présent projet impliquera 520 animaux provenant de 130-150 portées maximum sur l'ensemble de la période concernée (36 mois).

Notons que, comme la lapine ne vient au contact de sa portée qu'une seule et brève fois par jour (5 min) pour allaiter, la manipulation des lapereaux en dehors de l'allaitement n'engendre pas de stress lié à la séparation du jeune et de la mère. Par ailleurs, les présents travaux ne conduiront jamais à retirer une portée entière à une lapine, donc n'engendreront chez elle pas de stress lié à l'absence soudaine des jeunes et à l'arrêt de la lactation.

5709. La fragmentation des habitats naturels est une des causes principales de perte de biodiversité. Elle est notamment provoquée par l'expansion croissante de l'urbanisation : augmentation des surfaces urbanisées, des infrastructures de voirie, etc. En isolant les individus les uns des autres, les aménagements urbains affectent la reproduction et le maintien du flux génétiques, indispensables à la survie des populations animales.

Un déclin des populations du hamster commun (*Cricetus cricetus*) appelé aussi hamster d'Europe, est observé en Europe de l'Ouest depuis les années 1970 et s'étend aujourd'hui à toute son aire de répartition, jusqu'en Ukraine. Les mesures de protection mises en place en Europe de l'Ouest n'ont pas suffi à enrayer ce déclin. Parmi les motifs impliqués, l'urbanisation grandissante est l'une des causes majeures, diminuant l'habitat favorable disponible à l'espèce et déconnectant les populations et les individus les uns des autres.

Le phénomène d'urbanisation étant impossible à limiter, puisqu'il répond à des besoins humains, il est primordial de penser de nouveaux aménagements en faveur de la biodiversité et de réfléchir à la possibilité d'utiliser les zones urbanisées pour la conservation de certaines espèces. Ainsi, ces zones pourront faire partie intégrante des corridors écologiques et permettre la reconnexion entre des populations animales isolées.

Dans certains pays, des populations de Hamster d'Europe occupent des milieux urbains (Autriche, Ukraine, Russie, Allemagne, etc.). Afin d'envisager une utilisation similaire de ces zones pour la conservation du hamster en France, il est nécessaire d'évaluer l'adaptation de cette espèce au milieu péri-urbain, in situ, et d'observer toutes les composantes (biologique, sociétale, etc.) qui en résulte.

Cette étude étant spécifique au Hamster d'Europe, aucune action de Remplacement (comme préconisé par la règle des 3R) ne peut être envisagée. Toutefois, l'effectif des individus relâchés a été réduit autant que possible (Réduction) mais suffisant pour espérer avoir des survivants en dépit du risque de prédation. Au vu de l'effectif réduit, nous réaliserons des statistiques descriptives.

Notre étude se déroulera sur une période de 13 mois, entre avril 2017 et mai 2018, en deux phases. Elle impliquera 40 femelles hamsters adultes, réparties entre 2 sites (en milieu péri-urbain) où elles seront relâchées. Les individus étudiés durant la seconde phase seront les individus ayant survécu pendant la première partie de l'étude. Ces femelles seront ovariectomisées préalablement à leur lâcher afin d'éviter toute reproduction et assurer qu'aucune prolifération n'aura lieu (barrière sociétale). Cet acte chirurgical sera réalisé par un personnel qualifié (vétérinaire) et des mesures de Raffinement seront mises en place : utilisation adaptée d'anesthésique et d'analgésique, suivi et soins des individus opérés. De plus, afin d'améliorer le bien-être des animaux utilisés, d'autres mesures seront prises tout au long de l'expérimentation sur le terrain : boîtes opaques en bois pour le transport et le lâcher des individus pour limiter le stress visuel et auditif ; enrichissement des parcelles de lâchers en plantes herbacées de fourrage ; suivi non invasif sur le terrain. Les animaux seront recapturés durant et à la fin de l'expérimentation à l'aide de pièges non létaux et surveillés en permanence.

A l'issue du projet, les femelles survivantes seront placées en environnement enrichi à l'animalerie du laboratoire ou seront réhabilitées dans un établissement à but pédagogique dans un but de sensibilisation à la conservation.

5710. L'hème oxygénase (HO-1) est une protéine inductible par le stress et qui génère la libération du monoxyde de carbone (CO). Ce dernier a un rôle important d'antioxydant endogène. Le CO est bien connu comme médiateur intracellulaire ayant plusieurs activités pharmacologiques. A savoir, des activités vasodilatatrice, anti-ischémique et anti-inflammatoire. Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de la voie de l'HO-1 dans l'induction et l'augmentation de la production du CO. Ainsi cette surproduction de CO est responsable de la restauration de l'homéostasie cellulaire dans des conditions pathologiques. De ce fait, il paraît fort intéressant d'exploiter cette voie dans des applications thérapeutiques.

Dans ce contexte, une nouvelle génération de molécules chimiques de synthèse de monoxyde de carbone (« Carbon Monoxide-Releasing Molecules » ou CO-RMs) a été développée dans notre laboratoire. Ces molécules permettent le contrôle et l'apport du CO exogène et présentent une action protectrice des cellules.

Les résultats encourageants de nos études concernant l'effet protecteur de ces CO-RMs dans diverses maladies comme l'infarctus du myocarde, l'inflammation et les dysfonctions vasculaires et métaboliques convergent vers la mise en évidence de l'importance du rôle du CO comme moyen thérapeutique.

Afin d'optimiser et d'augmenter le potentiel protecteur des CO-RMs, nous avons réussi la synthèse d'une nouvelle classe de molécules hybrides capables de délivrer simultanément du CO exogène et d'induire la voie HO-1.

Le but de notre projet est d'évaluer sur des animaux l'effet thérapeutique de cette nouvelle génération de molécules hybrides dans différents modèles cardiovasculaires et inflammatoires. Dans un souci de raffinement, les souris sont hébergées dans des cages à environnement enrichi, où l'accès à l'eau et à la nourriture est facilité, particulièrement après chirurgie d'ischémie/reperfusion. Les animaux font l'objet d'un suivi quotidien individuel pour relever tout signe de souffrance et y remédier si nécessaire par des analgésiques ou une mise à mort compassionnelle. Des tests préliminaires sur cellules ont permis de sélectionner les meilleurs candidats moléculaires à tester, afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser dans le présent projet : plus précisément, nous avons testé 100 molécules différentes afin de sélectionner les 10 plus prometteuses. Cette démarche nous a permis de réduire très significativement le nombre de souris à utiliser et ainsi 6638 souris seront utilisées sur les 5 années du projet.

5711. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) se caractérisent par une inflammation du tube digestif qui conduit à des diarrhées et des douleurs abdominales. Les MICI sont des maladies invalidantes et affectent la qualité de vie mais pas sa durée. Les MICI sont associés à un risque accru de cancer colorectal. La physiopathologie des MICI est décrite pour être le résultat d'une réponse anormale du système immunitaire stimulée par des modifications de la flore bactérienne. Bien qu'on ne connaisse pas, qui est l'œuf de la poule, entre les altérations de la flore bactérienne et du système immunitaire, un défaut de barrière de la muqueuse digestive est impliqué dans ce « dialogue anormal » aboutissant au processus inflammatoire et au cancer.

Les MICI sont des maladies dites complexes faisant intervenir des facteurs environnementaux et génétiques. Un facteur environnemental majeur, qui a été considérablement modifié au cours du siècle dernier est l'alimentation humaine, notamment par l'introduction de nombreux additifs alimentaires, autorisés comme agents texturants ou colorants. Contrairement à la composition (glucides, lipides...) de l'alimentation humaine, l'impact des additifs alimentaires sur la muqueuse digestive a été très peu étudié. Lorsqu'ils sont ingérés, on ne connaît pas leurs impacts sur le tube digestif ainsi que leurs capacités à passer à travers la muqueuse intestinale et à aller altérer le développement précoce (périodes embryonnaires et post-natales) de la muqueuse intestinale, favorisant ainsi le développement d'inflammation et de cancer chez le sujet adulte.

Les objectifs du projet sont d'étudier l'impact des additifs alimentaires, pendant les phases précoces (périodes embryonnaire et post-natale) du développement intestinal sur la susceptibilité de la muqueuse intestinale à développer des inflammations et des cancers chez le sujet adulte.

Afin d'étudier l'impact des additifs alimentaires pendant les phases précoces du développement intestinal, l'utilisation d'un modèle animal, dynamique et intégré est indispensable. Pour étudier l'impact de deux additifs alimentaire sur le développement de la muqueuse digestive dans plusieurs lignées de souris sauvages et de souris présentant des susceptibilités génétiques à développer des inflammations et des cancers, nous utiliserons 1314 souris. Afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées, nous avons utilisé la règle des 3R et un calcul statistique permettant de limiter le nombre de souris nécessaire à la réalisation de ce projet. Les responsables scientifiques du projet sont tous détenteurs du certificat d'expérimentation animale de niveau 1. La souffrance et la douleur liées au développement de l'inflammation colique et du cancer (2 procédures classées sévères) ont été prises en compte dans le « bien-être animal ». Les animaux seront observés quotidiennement par les zootechniciens qui travaillent sur place et par les expérimentateurs du projet qui passeront au moins une fois par jour pour la pesée des animaux. L'état des animaux sera observé pour détecter d'éventuelles blessures, un comportement anormal (douleur, souffrance...). En cas d'une perte de poids supérieure à 20% de leur poids d'origine (avant l'induction de l'inflammation ou du cancer), les animaux seront sacrifiés automatiquement afin de limiter leur souffrance. Malheureusement, nous ne pouvons pas utiliser des traitements permettant de réduire la souffrance des animaux (analgésiques, anti-inflammatoires...) car ils interféreraient sur le développement de l'inflammation et du cancer. Enfin, une évaluation rétrospective de la douleur et de la souffrance animale induite par les deux procédures classées sévères sera réalisée afin de limiter au maximum l'intensité de ces dernières au cours des expériences futures.

5712. Les pathologies associées à une expansion excessive (surpoids et obésité) de la masse grasse (tissu adipeux) sont parmi les premières causes de morbidité et mortalité dans les pays occidentalisés. Ces pathologies résulteraient en partie de la toxicité d'un excès de certains lipides circulant dans le sang (lipotoxicité) et de leur déposition dans d'autres organes à la suite d'un défaut de leur gestion par le tissu adipeux. Des travaux antérieurs suggèrent que des anomalies du réseau microvasculaire du tissu adipeux pourraient conditionner ces désordres qui se répercutent sur diverses fonctions de l'organisme. Ainsi nos travaux ont pour objectif d'identifier des mécanismes clés et spécifiques au réseau microvasculaire pouvant être modulés pour limiter l'expansion et le dysfonctionnement du tissu adipeux et prévenir la progression des anomalies métaboliques et cardiovasculaires associées au surpoids et à l'obésité.

Chez la souris, nous évaluerons l'impact de différents régimes alimentaires sur les cellules des vaisseaux sanguins du tissu adipeux. Les effets de ces régimes et de la modulation de la fonction des cellules vasculaires sur la composition corporelle ainsi que divers paramètres physiologiques seront étudiés en parallèle.

L'étude nécessitera l'utilisation d'une souche de souris classiquement utilisée dans les études du métabolisme et de l'obésité. En parallèle, un modèle de souris génétiquement modifiées pour une voie de signalisation d'intérêt sera utilisé. Ces animaux sont viables, fertiles et ne développent pas d'anomalies pouvant entraîner un mal-être. Les souris seront hébergées par cage comportant un nombre d'individus adapté en fonction de leur poids. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés une fois par semaine pour déceler de potentielles anomalies (comportementales et notamment au niveau de la prise alimentaire). Des carrés de ouate seront placés dans les cages systématiquement (pour permettre aux animaux de faire des nids), ainsi que des igloos lors de la première mise en contact avec leurs congénères.

Pour éviter l'agressivité entre les mâles, nous maintiendrons des fratries au sein de la même cage et/ou des animaux de carrure et âge comparables. Néanmoins, si des blessures subviennent, les animaux seront soit séparés et leurs blessures traitées, soit euthanasiés (en fonction des blessures, sur avis du responsable de la structure). Les manipulations prévues sont non-invasives ne devraient et en aucun cas entraîner de douleur ou mettre en danger la vie de l'animal. Les études sur ces souris seront terminées par des prélèvements de tissus et organes après une méthode d'euthanasie appropriée et réglementaire.

Afin de limiter le nombre d'animaux pour cette étude, nous avons réalisé une veille bibliographique et conçu les expériences afin d'obtenir un pouvoir statistique (Student t-test ou un 2-ways-ANOVA en fonction de l'expérience) suffisant avec un nombre minimum d'individus. Lorsque certains animaux seront utilisés pour plusieurs procédures indolores il sera vérifié que celles-ci sont compatibles et appliquées séquentiellement après un repos entre chaque procédure. La réalisation de ce projet nécessite l'étude de 696 animaux.

5713. Le diabète est une pathologie caractérisée par une hyperglycémie chronique (taux trop élevé de sucre dans le sang). Le nombre de personnes diabétiques est en constante progression et cette tendance est en partie attribuée à une prévalence croissante de l'obésité ainsi qu'au vieillissement de la population. A l'heure actuelle, le diabète peut être soigné mais pas encore guéri et le traitement doit donc être envisagé au long cours.

Dans ce contexte, il est nécessaire d'avoir une recherche préclinique intensive pour pouvoir sélectionner et évaluer l'efficacité de candidats médicaments.

Chez un individu sain, le contrôle de la glycémie se fait par l'insuline, qui permet l'entrée du glucose dans les cellules afin d'assurer leur métabolisme énergétique. Chez une personne diabétique, la glycémie n'est plus régulée. Elle s'élève donc progressivement et entraîne à plus ou moins long terme des lésions d'organes (reins, vaisseaux...). La prise en charge médicamenteuse vise essentiellement à contrôler la glycémie des patients. Néanmoins, la plupart des médicaments classiques hypoglycémisants (insuline...) sont souvent associés à une prise de poids des patients, alimentant ainsi le cercle vicieux : prise de poids / aggravation de la pathologie / augmentation de la dose médicamenteuse. Récemment, de nouvelles approches thérapeutiques ont permis chez les patients, d'une part de réduire leur glycémie et d'autre part d'engendrer une perte de poids. En effet, certains de ces traitements antidiabétiques exercent leur action en favorisant l'élimination du glucose en excès par les urines (glycosurie). Cependant, cette glycosurie peut également induire une hypoxie transitoire rénale puisque l'organisme va tenter de réabsorber activement le sodium entraîné par l'élimination de glucose, les deux étant co-transportés. C'est l'étendue de cette hypoxie rénale transitoire que nous voulons caractériser par le biais de mesures d'oxymétrie dans des organes cibles tels que le rein.

L'objectif de ce projet est donc de caractériser l'atteinte de tissus et organes cibles (sang, urines et reins) après un traitement aigu ou chronique par des antidiabétiques sur des rats normaux ou pathologiques. Différents paramètres seront mesurés grâce à des méthodes peu ou non invasives (recueil d'urine (mesure de glycosurie), prise de sang (mesures hématologiques)) ou invasives et sans réveil notamment via l'implantation *in vivo* de sondes dans des organes cibles (mesures d'oxymétrie et/ou de flux sanguin). Pour compléter ces données, des analyses biochimiques, d'ARNm et histologiques pourront être réalisées ex vivo à partir d'organes prélevés.

Dans ce contexte, l'utilisation d'un modèle animal est nécessaire car aucun modèle *in vitro* (remplacement) ne peut permettre l'étude de cette pathologie. Ces études pharmacologiques conduiront à l'utilisation de 400 rats sur une période de 5 ans. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum nécessaire (réduction) pour réaliser des statistiques acceptables (10 rats par groupe), du fait des connaissances des modèles/procédures liés au projet et de l'expérience du personnel y participant. Par ailleurs, les animaux seront hébergés par 2 afin de favoriser leur interaction sociale et réduire leur stress, et seront ajoutés dans leur cage des éléments d'enrichissement adaptés à leur espèce (litière à base de frisure de papier pour nicher et bûchettes de peuplier à ronger) (raffinement). Enfin, un suivi quotidien de l'état général et du poids des animaux sera réalisé, pour une action rapide en cas d'état de souffrance.

5714. L'os est le deuxième tissu le plus transplanté après le sang, avec plus de 2,2 millions de greffes osseuses réalisées chaque année dans le monde. Les transplants osseux sont généralement récoltés chez le patient (autogreffes), mais les complications associées au site donneur, ainsi que la faible quantité et/ou qualité de l'os récolté chez les patients âgés, pédiatriques ou cancéreux, constituent des limites sérieuses pour cette technique. Les produits d'ingénierie tissulaire osseuse (PITO), qui consistent à combiner un matériau support et des cellules capables de produire de la matrice osseuse, représentent un traitement alternatif aux autogreffes prometteur.

Il est déjà bien établi dans la littérature que l'architecture du matériau support contrôle, au moins en partie, le potentiel réparateur des PITO. Les techniques conventionnelles de fabrication manquant de précision et de reproductibilité, cependant, entravaient jusqu'ici l'exploration d'architectures complexes pour améliorer ces PITO. Les nouveaux procédés de fabrication additive permettent maintenant de surmonter ces obstacles.

L'objectif de ce projet est d'utiliser ces techniques innovantes de fabrication pour optimiser la macroarchitecture du matériau support et améliorer la réparation osseuse par PITO. Nous allons produire des implants en céramique possédant des architectures (i) définies

mathématiquement comme optimales pour la prolifération des cellulesensemencées sur le matériau support, (ii) reproduisant l'architecture naturelle de l'os (bio-mimétisme), et (iii) reproduisant l'architecture de biomatériaux déjà utilisés en chirurgie orthopédique. L'effet de ces différentes architectures sur la viabilité cellulaire et la formation osseuse sera évalué par des implantations sous-cutanées et osseuses, respectivement.

Un modèle d'implantation sous-cutané chez le rat sera utilisé dans un premier temps pour cribler les différentes architectures et tester deux compositions différentes de céramique. Ce modèle permet, en effet, de suivre aisément la viabilité des cellules implantées par imagerie bioluminescente et de tester plusieurs PITO chez un même animal. En outre, ce modèle permettra d'évaluer le potentiel ostéogénique propre des PITO (i.e. en absence de tout contact osseux). Les résultats obtenus permettront alors de sélectionner les 3 meilleures architectures, ainsi que la meilleure composition céramique, pour l'implantation intra-osseuse.

Pour cette seconde étude, un modèle de défaut osseux fémoral chez le rat sera utilisé. Il s'agit d'une technique d'évaluation du potentiel réparateur des PITO reconnue et validée dans la littérature. La formation osseuse sera suivie par imagerie rayon X.

Les deux modèles d'implantation ont déjà été validés par le comité d'éthique pour d'autres études du groupe chez la souris et le rat. Nous profiterons également de cette étude pour évaluer l'impact de notre chirurgie sur le comportement des animaux grâce à une évaluation comportementale classique.

Ce projet s'inscrit dans le cadre de la recherche fondamentale et appliquée qui vise à élargir les connaissances afin de développer une alternative à l'autogreffe osseuse pour combler des grandes pertes de substance osseuse chez l'homme. Il permettra de mieux comprendre l'impact de la macroarchitecture du matériau support sur le potentiel de réparation osseuse des PITO.

Lors de l'implantation sous-cutané, 6 différents types d'architecture seront testés : (1) deux architectures définies mathématiquement (petits et grands pores gyroïdes), (2) deux architectures biomimétiques (os trabéculaire et os cortical) ; (3) deux architectures reproduisant des matériaux de comblement osseux cliniques (hydroxyapatite/ tricalcium phosphate et corail). Par ailleurs, deux compositions chimiques de la céramique seront testées à ce stade (hydroxyapatite et hydroxyapatite carbonatée). La viabilité cellulaire sera évaluée sur animaux anesthésiés à J1 et 1, 2, 4 et 8 semaines par imagerie bioluminescente non invasive. Les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude (8 semaines) et la formation osseuse évaluée par imagerie rayon X et histologie. Avec 6 types de macroarchitectures et 2 matériaux testés (soit 12 groupes), et avec 8 implants/groupes et 4 implants/rat, 24 rats seront impliqués dans la première étape du projet. Les résultats permettront de sélectionner la meilleure architecture de chaque type mathématique/biomimétique/clinique ainsi que la meilleure composition de la céramique pour l'étape suivante. Lors de l'implantation intra-osseuse, la formation osseuse sera évaluée sur animaux anesthésiés à 1, 4 et 8 semaines par imagerie rayon X non invasive. Par ailleurs, nous profiterons de cette étude pour évaluer l'impact de notre expérimentation sur le comportement des rats grâce à des analyses éthologiques standards. Les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude (12 semaines) et la formation osseuse évaluée par imagerie rayon X et histologie. Avec 3 types de macroarchitectures (soit 3 groupes), et avec 10 implants/groupes et 1 implant/rat, 30 rats seront impliqués dans la seconde étape du projet.

Soit un total de 54 rats impliqués dans le projet.

Remplacement

Il n'existe pas de modèle *in vitro* ou *in silico* permettant de reproduire la complexité de l'environnement *in vivo* impliqué dans la survie cellulaire et la formation osseuse.

Réduction

L'étude sous-cutanée, où 4 implants peuvent être implantés par rat, nous permettra de réduire le nombre total d'animaux impliqués dans le projet en sélectionnant seulement les implants les plus prometteurs pour l'implantation intra-osseuse. Compte tenu de la complexité de la formation osseuse, de telles implantations sous-cutanées ne sont néanmoins pas suffisantes pour conclure sur l'impact de la macroarchitecture de l'implant sur la réparation osseuse. De plus, des techniques d'imagerie non-invasives (bioluminescence et rayon X) seront utilisées pour suivre la survie cellulaire et la formation osseuse sur le même animal. Les animaux ne seront mis à mort qu'aux temps terminaux des études.

Raffinement

Les animaux seront hébergés dans des conditions permettant un enrichissement social et l'expression de comportement de fouissage, de nidification et de rongement. La souffrance sera limitée par analgésie post-opératoire et contrôlée par une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude. Une évaluation scorée du bien-être des animaux, sur laquelle seront basés les points limites, sera mis en place.

5715. Objectif du projet: Détecter les propriétés irritantes et sensibilisantes de nouvelles entités chimiques après administration par voie topique chez la souris.

Avantages: Les procédures expérimentales mises en œuvre permettent de rechercher *in vivo* les propriétés irritantes ou sensibilisantes des composés évalués. Les données ainsi obtenues contribueront à anticiper des effets adverses potentiels de molécules candidates pour une utilisation finale chez l'homme pour le traitement de désordres cutanés tels que l'acné, la rosacée, le psoriasis ou la dermatite atopique.

Domages escomptés: Les composés irritants ou sensibilisants induisent une réaction inflammatoire aigüe de la peau chez le rongeur. Ces lésions sont susceptibles d'entraîner un certain niveau d'inconfort pour les animaux (par exemple: démangeaisons, sensation de chaleur au niveau de la peau). Cet inconfort pour l'animal sera maîtrisé par le choix des doses du stimulus utilisé et si jugé nécessaire par le vétérinaire en charge du bien-être des animaux par le recours à un produit analgésique et l'arrêt du traitement.

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

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

-Choix des espèces: Les souris seront utilisées en raison de l'abondance de littérature sur le système immunitaire de ces modèles; de l'existence des outils d'analyses ex vivo spécifiques de ces espèces comme par exemple des anticorps pour la localisation des protéines ou des amorces pour l'analyse de l'expression des gènes.

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

un maximum de 60 études par an sera réalisé et un maximum de 3650 souris (dont 3600 souris utilisées en études et 50 souris dédiées aux actions potentielles d'acquisition et de maintien des compétences pour l'ensemble des procédures expérimentales présentées dans ce projet) sera utilisé sur une période de 5 ans.

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

5716. Le rôle de la flore intestinale sur la santé de l'homme est maintenant largement reconnu. La flore intestinale est composée de nombreuses et diverses souches de bactéries qui participent à la dégradation des aliments (par exemple la fermentation des fibres alimentaires), permettent la synthèse de vitamines (vitamine K) ou encore protègent contre les infections par d'autres bactéries virulentes qui provoqueraient des maladies intestinales. La composition de cette microflore est importante car celle-ci agit sur le développement des défenses immunitaires, et jouerait un rôle dans certaines maladies inflammatoires chroniques (comme les rectocolites hémorragiques, maladies de Crohn), l'obésité ou encore le diabète et le cancer.

Nous étudions l'une des bactéries commensales, c'est à dire considérée comme inoffensive, présente naturellement dans la flore intestinale dès les premières heures après la naissance puis persistant toute la vie de l'individu. De nombreuses études montrent cependant que certaines de ces bactéries produisent des substances appelées toxines dont l'impact sur notre santé reste encore inconnu. Nos études visent à comprendre leur rôle dans le développement ou la protection vis-à-vis de certaines maladies.

Dans cette étude, un modèle de colite chimio induite au dextran sulfate sodium (DSS) chez la souris sera utilisé. Cette approche permet d'induire une colite très reproductible dont les altérations après traitement sont proches de celles observées au cours de la rectocolite hémorragique chez l'homme. La toxicité du DSS s'exerce directement au niveau basal des cryptes entraînant une rupture de l'intégrité de la barrière intestinale suivie d'une diffusion des bactéries au sein des muqueuses. Nous étudierons donc le rôle de différentes bactéries (produisant ou non des toxines) présentes dans la flore intestinale dans ce modèle. Les souris traitées oralement par les bactéries d'intérêt seront ensuite examinées pour déterminer la localisation des bactéries dans le tube digestif, la production de toxines bactériennes et leur impact sur le tissu intestinal, l'intensité de la rectocolite et les symptômes inflammatoires associés.

À l'issue de l'expérience, une étude rétrospective sera réalisée.

La règle des 3R est respectée:

Remplacer : Nous avons au préalable fait des études en utilisant des cellules de mammifères en culture permettant d'élucider comment agissent les toxines produites par les bactéries étudiées. Cependant, le recours à l'animal est irremplaçable car aucun autre modèle ou tube à essai ne permet d'évaluer, au niveau d'un individu, les répercussions de cette bactérie au sein de la flore intestinale et de ses toxines sur la santé.

Réduire : Ce projet nécessite l'utilisation de 340 souris âgées de 7 semaines et 68 femelles gravides (x 6/7 souriceaux par portée soit 476 souriceaux). Plusieurs paramètres seront analysés et suivis dans le temps sur le même animal vivant (poids, score clinique, nombre de bactéries, prélèvements de fèces) et lors du sacrifice (appareil digestif, nœuds mésentériques, foie, rate et sang).

Raffiner : Les souris sont hébergées dans des conditions d'hygrométrie et température constantes. Le change de la cage et litière est effectué toutes les semaines. La surveillance quotidienne permet de veiller à une hydratation et alimentation ad libitum (change des biberons assuré par le personnel de la zootechnie et remplissage de la mangeoire par les expérimentateurs). Chez l'animal adulte, des problèmes respiratoires, des tremblements, pli de peau persistant, poils ébouriffés, absence de toilettage, un état de prostration et/ou une perte de poids supérieure à 20 % du poids initial nous conduira à sortir l'animal du protocole expérimental et à l'euthanasier.

5717. Cette étude va permettre de déterminer le seuil de sensibilité d'un nouveau dispositif non invasif et peu coûteux de certains paramètres cardiovasculaires : la fréquence cardiaque et l'onde de pouls. Bien qu'un grand nombre de dispositifs permettent de recueillir la fréquence cardiaque, il n'y en a que deux actuellement sur le marché pour évaluer la forme de l'onde de pouls. Ces dispositifs sont très coûteux et demandent une habitude de manipulation.

L'intérêt de cette étude est de déterminer la fiabilité de la mesure de la fréquence cardiaque et de l'onde de pouls au niveau de la carotide afin de poursuivre des études comparatives avec un gold standard.

Le projet vise donc à vérifier la sensibilité de capteurs de pouls qui peuvent être miniaturisés et sensibles à une diminution ou augmentation de pouls : fréquence cardiaque, pression artérielle, modification du tonus artériel... Ces capteurs mesureront en temps réel la fréquence cardiaque et l'onde de pouls.

Il est nécessaire d'utiliser un modèle animal du fait que ces capteurs miniaturisés sont très sensibles au mouvement et il est nécessaire de réaliser leur validation en premier lieu avec les capteurs installés horizontalement. Ceci rends difficile la vérification

méthodologique chez l'homme du fait qu'il est nécessaire de garder la personne allongée et en même temps lui demander de faire un effort qui associera une augmentation de la pression artérielle et fréquence cardiaque lui laissant au repos à posteriori.

L'espèce animale choisie a été la chèvre du fait que le cou est similaire à celui de l'homme (accessible, long et moins gras que celui du cochon) et il présente un pouls carotidien facilement palpable.

Les constantes physiologiques seront contrôlées (température, saturation d'oxygène, capnie, fréquence cardiaque, pression artérielle non invasive) la fréquence respiratoire maintenue grâce à un respirateur qui permettra de maintenir les paramètres physiologiques. Une voie veineuse sera posée afin de permettre l'injection de noradrénaline afin de réaliser une hypertension contrôlée et un cathéter artériel permettra de contrôler au plus près la pression artérielle de façon continue. La pression artérielle (non invasive et invasive) ainsi que la fréquence cardiaque seront corrélées aux données enregistrées par les capteurs de pouls. Le cathéter artériel nous permettra un suivi immédiat de la pression artérielle et nous servira de complément à la pression non invasive utilisée au brassard. Ces deux mesures permettront de comparer avec les valeurs relevées par le capteur posé.

Les expériences ont été prévues pour minimiser au maximum le nombre d'animaux nécessaires afin d'avoir des résultats reproductibles avec une robustesse dans les données de prise de signal des capteurs. Dans ce cadre, les expériences ont été prévues avec 3 animaux, même si dans les faits il n'y en aura que 2 utilisés. De cette façon, s'il s'avère avoir un problème avec un animal, il n'en resterait plus que $n=1$ ce qui impacterait sur la pertinence des résultats statistiques. Sur chacune des deux chèvres utilisées, des mesures seront répétées 3 fois afin de gagner en robustesse pour les analyses du signal. Si nécessaire, deux sessions par animal seront organisées pour rajouter des informations.

Les animaux seront réintroduits dans l'élevage dont ils sont issus à la fin des deux expériences une fois qu'ils auront récupérés complètement de la pose de cathéters.

5718. Les myopathies inflammatoires sont un ensemble de maladies graves caractérisées par une faiblesse musculaire, une élévation sérique des enzymes musculaires et la présence dans les muscles squelettiques d'un infiltrat cellulaire inflammatoire. Cliniquement ces pathologies peuvent se manifester de façon très différente d'un individu à l'autre. On distingue ainsi plusieurs groupes : la polymyosite, la dermatomyosite, la myosite à inclusions, mais aussi les myosites associées à certains auto-anticorps ou à une connectivité et les myopathies nécrosantes auto-immunes. Cependant, la physiopathologie de ces maladies est très mal connue, et les thérapeutiques utilisées sont donc peu ciblées. De plus aucun modèle animal n'a été développé à ce jour pour permettre les études cognitives indispensables à la compréhension des voies physiopathologiques mises en jeu et le développement de thérapeutiques ciblées.

La souris NOD (Non Obese Diabetic), génétiquement susceptible aux maladies auto-immunes, développe un diabète de type 1 spontané. De plus, il a été montré chez ces souris qu'un déséquilibre entre les lymphocytes T effecteurs et régulateurs était en cause et pouvait être restauré par injection d'IL-2 à faible dose, aboutissant à la guérison des souris. Récemment, nous avons développé deux lignées de souris NOD déficientes dans la voie de costimulation lymphocytaire ICOS/ICOSL. Ces souris sont protégées du diabète mais développent une myosite auto-immune spontanée très proche de ce qui est observé chez l'Homme (faiblesse musculaire, nécrose/régénération myocytaire, infiltrat inflammatoire). Il s'agit donc d'un modèle nouveau et unique dans lequel nous proposons de caractériser phénotypiquement les atteintes musculaires et neurologiques, d'étudier le rôle physiopathologique des lymphocytes T et notamment des lymphocytes T régulateurs ainsi que la capacité de l'IL-2 à restaurer un phénotype sain chez ces souris.

Les résultats obtenus au cours d'une étude antérieure menée dans le laboratoire sur un autre modèle murin de myosite, nous permettent de mettre en place les deux procédures expérimentales précitées en respectant le concept des 3R. Le nombre d'animaux envisagés est de 225. Il est réduit au minimum en tenant compte (i) de la mortalité liée au diabète développé par les animaux et (ii) de la variabilité des mesures de la force musculaire et de l'évaluation la locomotion. Une échelle de gravité des symptômes observés a été établie et permet d'établir un point limite dans l'ensemble des expériences. Elle permettra également d'évaluer la douleur des animaux et de mettre en place une procédure visant à la limiter.

Enfin, l'ensemble des expériences sera réalisé dans une animalerie agréée, où les conditions d'hébergement sont contrôlées : température, hygrométrie, cycle jour/nuit, change et nourriture.

5719. Malgré des progrès notables dans le traitement de certains cancers deux problèmes persistent. D'une part certains patients restent résistants aux traitements et d'autre part les cas de rechutes sont encore élevés. On sait aujourd'hui que ces résistances et ces rechutes sont dues à l'existence de cellules cancéreuses qui ont la particularité d'être protégées des traitements par un environnement tissulaire particulier. Dans le cas des leucémies (cancers du sang), ces cellules sont ainsi protégées par l'environnement de la moelle osseuse.

Ce projet d'expérimentation animale a pour but de mesurer l'efficacité de nouvelles molécules anticancéreuses pour lutter contre les leucémies, afin de proposer des solutions dans les cas d'échec thérapeutique (résistances et rechutes). Nous allons utiliser dans ce projet un modèle de niches osseuses reconstituées sous la peau de souris, capable de mimer l'environnement de la moelle osseuse nécessaire au développement des cellules cancéreuses.

Conformément aux exigences de remplacement, les expériences *in vivo* ont été précédées de multiples expériences et mises au point *in vitro* permettant de n'utiliser que le nombre de souris strictement nécessaire. Seule l'utilisation de modèles animaux permettra de définir si une des molécules testées pourra être développée en vue d'une application clinique. Pour la réduction, le programme prévoit d'implanter quatre greffons osseux par souris ce qui augmentera la valeur statistique de chaque expérience tout en permettant de réduire considérablement le nombre d'animaux requis. En outre, ce nombre pourra être revu à la baisse dès que des résultats statistiques auront été obtenus. Pour le raffinement, une grande importance sera accordée au bien-être des animaux avec un suivi régulier permettant de détecter tout signe de souffrance, détresse de l'animal et ainsi la prise immédiate des mesures adéquates. La

notion d'enrichissement du milieu des rongeurs sera également prise en compte. L'ensemble des protocoles de ce projet prévoit ainsi l'utilisation de 432 souris.

5720. La Bretagne est un des plus riches gisements d'algues au monde. Parmi elles, certaines macro-algues contiennent des molécules dotées de qualités nutritives et sanitaires. Des extraits d'algues (5 au total) alimentaires ont été produits et leur innocuité *in vitro* a été démontrée. Parmi les 5 extraits, 2 sont des extraits d'algues vertes, similaires à des produits déjà commercialisés. Les 3 autres (un extrait d'algue rouge et 2 extraits d'algues brunes) n'ont pas d'équivalent sur le marché. Après cette phase d'innocuité *in vitro*, ce projet a pour objectif d'évaluer l'innocuité de ces extraits au travers des effets zootechniques et sanitaires chez le porc et le poulet. Cependant, ces extraits provenant d'algues alimentaires, il n'est pas attendu d'effets secondaires importants.

En comparaison d'animaux témoins dont l'aliment ne sera pas supplémenté avec des composés algaux, l'état de santé de porcs et de poulets alimentés par les différents extraits d'algues (4 extraits, chacun à deux concentrations chez le porc et 5, à deux concentrations chez le poulet) sera évalué de manière globale aux travers d'examen cliniques quotidiens, d'un suivi des performances zootechniques (croissance et consommation) et de prélèvements biologiques (prélèvements de fèces et prélèvements de sang et d'organes après euthanasie). Ces prélèvements biologiques ne sont pas douloureux pour les animaux. Deux procédures expérimentales (une pour le porc et une pour le poulet) seront menées dans le respect de la règle des 3R : réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique (36 porcs et 200 poulets) ainsi que le raffinement des conditions d'hébergement. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions d'hébergement (respect des densités, litière adaptée, eau et nourriture à volonté, enrichissements adaptés, ...). L'utilisation des animaux cibles est nécessaire pour évaluer les effets zootechniques et sanitaires. Tous les animaux seront euthanasiés à la fin de la procédure expérimentale.

5721. Au cours des dernières années les technologies d'imagerie médicale se sont imposées comme une référence en matière de diagnostic et de suivi de pathologies comme le cancer par exemple. Ces technologies reposent sur l'utilisation de molécules appelées agents de contraste. De nombreuses équipes cherchent à obtenir des agents de contraste qui soient informatifs pour plusieurs techniques d'imagerie. C'est le cas de la molécule de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$. Les études *in vitro* ont montré que la molécule $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ utilisée comme agent de contraste pour l'IRM, présente une grande stabilité et qu'elle combine des avantages à la fois pour le marquage de cellules, la détection ou le suivi par rayon X ou photoluminescence. L'utilisation de cette molécule chez l'homme devrait permettre le suivi de pathologies sur des temps plus longs avec des quantités moindres d'agent de contraste. Ceci entraînerait l'amélioration du confort du patient (moins d'injection) tout en augmentant la précision du diagnostic (cette molécule marque les cellules cancéreuses en respectant les cellules saines), et en limitant le coût du suivi.

Évaluer la toxicité de cette molécule au niveau de l'animal est un préalable à son utilisation chez l'homme.

Nous devons vérifier que le gadolinium contenu dans la molécule reste bien stable pendant tout son séjour dans l'organisme et n'apparaît pas sous sa forme Gd^{3+} car cet ion présente une toxicité chez les patients souffrant d'insuffisance rénale conduisant au développement de la fibrose systémique néphrogénique qui peut conduire au décès du patient après atteinte de différents organes tels que les muscles et les poumons en autres.

Nous proposons d'évaluer cette toxicité en comparant 12 souris réparties en 2 groupes. Un groupe témoin et un groupe recevant une dose unique de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ et d'observer les modifications délétères au niveau du foie, du cerveau, des reins, de la rate et des poumons. Encadrés par un personnel habilité qui veillera au bien-être des animaux et à limiter leurs souffrances, les résultats obtenus devront valider l'intérêt scientifique de notre molécule de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$.

5722. L'infarctus du myocarde reste l'une des causes principales de décès chaque année. Notre laboratoire travaille depuis de nombreuses années sur la compréhension des mécanismes visant à limiter la taille de l'infarctus et d'explorer in fine de nouvelles pistes thérapeutiques.

Dans cette optique nous avons développé un modèle murin d'ischémie-reperfusion qui nous permet de réaliser des études sur la taille de l'infarctus, ainsi que des études fonctionnelles, biochimiques et biomoléculaires.

Dans ce projet, il est question de caractériser les mécanismes d'action d'une molécule que nous avons précédemment identifiée comme étant effectivement cardioprotectrice. Il s'agira donc ici de mesurer l'impact de l'administration de cette molécule, pendant l'ischémie-reperfusion, sur plusieurs paramètres mitochondriaux habituellement impliqués dans les mécanismes de cardioprotection. Ce projet prend place dans le cadre d'un partenariat avec l'industrie pharmaceutique qui a développé cette molécule.

L'expérimentation portera sur notre modèle murin d'ischémie-reperfusion, par ailleurs largement utilisé dans la littérature pour l'étude de l'infarctus du myocarde. Il s'agira de souris C57bl/6J âgées de 8 à 10 semaines au moment de l'expérimentation, commandées chez un fournisseur agréé.

Pour l'obtention de résultats fiables et exploitables, le nombre total d'animaux nécessaire est de 90. Cependant, il est prévu que, chaque fois que cela sera possible (quand la quantité de matériel biologique prélevée est suffisante), deux paramètres au lieu d'un seul soient mesurés par animal, réduisant ainsi considérablement le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de tous les résultats. Pour garantir le bien-être des animaux dès leur arrivée, un enrichissement est immédiatement mis en place puis renouvelé très régulièrement jusqu'à l'expérimentation. En outre, aucun geste ou traitement pouvant occasionner douleur ou stress n'est réalisé en amont de l'intervention.

Enfin, cette intervention (incluant la chirurgie qui permet la mise en place de l'ischémie) est entièrement réalisée sous anesthésie profonde par administration d'un mélange Xylazine/Kétamine (avec prémédication analgésique préalable par administration de

buprénorphine). L'analgésie et l'anesthésie sont ainsi maintenues jusqu'à la mise à mort de l'animal en fin d'expérimentation, évitant ainsi toute souffrance, douleur ou angoisse de l'animal liées à l'intervention.

Le prélèvement (puis la conservation) d'autres tissus que le cœur est envisagé en concertation avec l'ensemble du laboratoire au moment de la réalisation du projet afin d'optimiser et de valoriser au mieux les prélèvements.

5723. Les anévrismes de l'aorte abdominale représentent une maladie fréquente de la population de plus de 65 ans, dont l'évolution, en l'absence de traitement, est la rupture de l'anévrisme entraînant le décès par hémorragie interne.

Leur traitement est actuellement largement dominé par le traitement dit endovasculaire, c'est à dire par l'introduction dans l'aorte d'une prothèse par l'intermédiaire d'une artère dans le pli de l'aîne. L'objectif de ce traitement est de recouvrir la surface interne de l'artère malade par une prothèse vasculaire pour "exclure" l'anévrisme du reste de la circulation et donc empêcher le risque de rupture de ce dernier. Une des causes d'échec de ce traitement est la survenue de fuites sanguines, ce qui correspond à la reperfusion de l'anévrisme par des branches collatérales de l'aorte abdominale: l'anévrisme n'est alors plus exclu, il est donc de nouveau à risque de rupture et donc le décès brutal du patient.

La prévention de ce type de fuites est donc un enjeu majeur et il existe actuellement peu de méthodes pour les prévenir.

Un nouveau modèle de prothèse est actuellement en cours de développement dans notre hôpital pour palier à cette problématique. Cette prothèse innovante intègre un nouveau concept qui consiste à utiliser sur sa face externe des fibres qui, au contact du sang, favorisent une thrombose locale permettant ainsi de combler le sac anévrysmal et de prévenir l'apparition de fuites réalimentant l'anévrisme.

Après une phase de mise au point *in vitro*, qui nous a permis de valider le concept et le choix des matériaux, nous devons, avant de proposer cette solution thérapeutique pour l'Homme, vérifier *in vivo* l'efficacité et l'innocuité de ce dispositif.

En effet nous ne pouvons pas modéliser *in vitro* ou *ex vivo* les aspects hémodynamiques complexes des fuites qui siègent au sein de l'anévrisme, ni les aspects physiologiques pro et anti-thrombotiques d'un organisme vivant évolué.

Nous utiliserons des porcs pour modéliser les anévrismes présentant les caractéristiques d'anévrisme "à fuite" afin de tester cette prothèse. Le porc constitue un modèle de choix en santé humaine pour l'étude des maladies cardiovasculaires, de par l'existence de caractéristiques et de propriétés anatomiques et physiologiques cardio-vasculaires comparables à celles de l'Homme. De plus la modélisation chirurgicale d'un anévrisme de l'aorte abdominale et l'implantation de notre prothèse ne peut être envisagée, avec un fort taux de succès, que sur une espèce aux dimensions anatomique accessibles à la chirurgie.

Pour la totalité du projet, nous utiliserons au maximum 17 porcs à croissance lente.

Le nombre d'animaux utilisé est déterminé par un test statistique permettant de déterminer un nombre nécessaire et suffisant d'animaux pour affirmer l'efficacité du nouveau traitement. Les animaux utilisés dans l'étude de faisabilité seront ensuite inclus dans le groupe témoin en vue de réduire le nombre d'animaux nécessaires au strict minimum.

Le chercheur responsable de ce projet est chirurgien vasculaire et sera assisté par des praticiens spécialisés (cardiologue et radiologue) afin d'optimiser les procédures non invasives (échographie doppler et scanner) ce qui permet d'optimiser chaque procédure et de réduire ainsi le nombre d'animaux impliqués dans cette étude.

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

Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs auront une période d'acclimatation d'une semaine avant d'être inclus dans le protocole. Leur nourriture sera adaptée et ils seront stabulés en groupe dans des cages adaptées à leurs poids, afin de permettre un contact régulier entre congénères et réduire leur stress. Leur environnement sera enrichi (activité de foussement encouragée, « médecine ball », jeux dans le couloir, planche à gratter, distributeur d'aliment actif...) et adapté à chaque phase de l'expérimentation pour réduire leur angoisse. Tout constat d'un mal-être sera remonté au responsable du bien-être des animaux pour examen approfondi et traitements adaptés. Si la douleur, la souffrance et l'angoisse ne pouvaient être réduites à leur minimum, une décision d'interruption d'expérimentation sera prise en concertation avec le vétérinaire sanitaire.

5724. Ce projet a pour but d'identifier de nouveaux mécanismes dans les cancers du sang, et en particulier de certains gènes. Pour ce faire, les conséquences de la suppression de ces gènes dans des souris seront étudiées. Nous étudierons l'effet de la délétion concomitante ou de l'association délétion/mutation de ces gènes chez la souris et verront si les souris développent une maladie plus agressive. Si c'est le cas, elles pourront servir de modèles à l'étude des mécanismes pathologiques à l'origine du développement de la leucémie.

Ces dernières années, l'importance de protéines impliquées dans un phénomène appelé épigénétique a été mise en évidence dans le processus de formation des cellules sanguines (ou hématopoïèse) et dans les cancers du sang. L'épigénétique consiste en des modifications réversibles au niveau de l'ADN, qui vont activer ou inhiber l'expression de gènes. Parmi ces facteurs épigénétiques, certaines protéines (de la famille ASXL, ASXL1 et 2), ont été retrouvées impliquées dans divers cancers du sang, tels que les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Peu de choses sont connues sur le rôle de ces protéines au cours de l'hématopoïèse. La perte d'ASXL1 chez la souris résulte en un syndrome myélodysplasique, un autre cancer du sang. Des données préliminaires révèlent que la délétion d'ASXL1 et/ou ASXL2 entraîne une diminution du nombre de plaquettes, cellules essentielles à la coagulation, dans le sang et une diminution du nombre de mégacaryocytes, précurseurs des plaquettes, dans la moelle osseuse. Nous étudierons dans ce projet quelles sont les conséquences exactes de la perte des protéines ASXL1/2 sur la mégacaryopoïèse, processus aboutissant à la formation des plaquettes, et par quels mécanismes ce processus est dérégulé. Nous pourrions décrire ainsi pour la première fois le rôle important de facteurs épigénétiques dans la mégacaryopoïèse.

Une deuxième partie consistera à étudier la coopération d'ASXL1 avec d'autres gènes impliqués dans des hémopathies : RUNX1, CALR et JAK2. Dans les LAM, près d'un tiers des patients porteurs de mutations d'ASXL1 ont également des mutations du facteur de transcription RUNX1. Dans les LAM post-syndromes myéloprolifératifs, des mutations de la Calréticuline (CALR) et de JAK2 sont associées à des mutations d'ASXL1.

Pour réaliser ces projets, des souris C57/BL6 seront utilisées. Nous estimons à 1106 le nombre de souris nécessaires pour mener à bien ce projet. Le nombre d'animaux choisi pour chaque lot représente le minimum requis pour constituer un échantillonnage représentatif. Etant donné l'implication d'ASXL1/2 dans les hémopathies malignes humaines, un modèle *in vivo* est indispensable car il nous permettra d'étudier le rôle de ces gènes dans le développement de la maladie en association avec d'autres facteurs oncogéniques et ce, à long terme, dans l'organisme entier vivant, ce qui n'est pas possible autrement. Ceci permettra de décrire précisément les fonctions de ces gènes lors de l'hématopoïèse normale et pathologique, ASXL1 et 2 étant impliqués chez l'homme dans des hémopathies malignes. L'accès aux prélèvements humains étant limité, l'étude de modèles murins est indispensable. Il nous permettra d'étudier l'effet des délétions d'ASXL1/2 à long terme, ce qui n'est pas possible *in vitro*. Des données préliminaires réalisées sur les différents lots de souris et menées par nos collaborateurs ont déjà révélé des rôles importants pour ASXL1/2 lors de l'hématopoïèse; c'est pourquoi l'utilisation des mêmes animaux est appropriée pour ce projet. De plus, la prolifération *in vitro* de cellules tumorales est très limitée et ne reflète pas ce qui se passe *in vivo* chez l'homme.

Globalement, les effets attendus chez la souris sont d'une part le développement éventuel de pathologie de type cancer du sang et d'autre part les conséquences de prises de sang sous anesthésie, indispensables pour vérifier le développement éventuel de ces maladies. La réussite du projet permettrait de mieux connaître les mécanismes à l'origine de certains cancers du sang chez l'Homme et d'autre part, d'obtenir des modèles de ces maladies, très utiles pour d'éventuels développements diagnostiques ou thérapeutiques. Les points limite seront strictement appliqués. Toutes les interventions invasives (injections, prélèvements de sang) seront faites sous anesthésie à l'isoflurane. Les animaux bénéficieront d'un environnement enrichi en tout temps. Du DietGel Energy sera ajouté dans les cages en cas de diminution de la prise alimentaire.

5725. La chirurgie est le traitement le plus efficace pour éliminer du foie une tumeur de taille importante. Les conséquences de cette ablation sont minimales car le foie peut se régénérer. Toutefois, il est parfois nécessaire d'enlever beaucoup de tissu. Dans ce cas les capacités de régénération du foie laissé en place sont limitées et il ne pourra plus assurer ses fonctions naturelles. L'insuffisance hépatique qui en résulte est l'une des complications post-opératoires les plus redoutées. Ceci est particulièrement vrai pour les patients présentant une stéatose hépatique (foie gras) ou une stéato-hépatite non alcoolique (NASH) (foie gras avec souffrance hépatique sévère).

La médecine régénératrice qui met en jeu des cellules souches pour réparer les organes endommagés est une approche intéressante dans ce contexte. Nous proposons dans ce projet d'utiliser des cellules souches mésenchymateuses (MSC) isolés de la moelle osseuse pour aider la régénération hépatique chez des souris atteintes de la pathologie NASH et auxquelles 80% du foie a été retiré. La voie d'administration des cellules constitue l'originalité de ce projet. Elles seront directement appliquées et maintenues au contact du foie restant à l'aide d'une membrane amniotique afin de prolonger leurs effets et d'éviter leur dispersion dans l'organisme. Les résultats attendus de cette étude sont une augmentation de la survie après intervention, et une amélioration de la régénération et de la fonction hépatique.

Ce projet constitue une étape préclinique nécessaire avant la réalisation d'un essai clinique chez l'homme. Il n'est actuellement pas possible de valider *in vitro* l'efficacité d'une telle stratégie thérapeutique (implantation de cellules souches mésenchymateuses dans une membrane amniotique au contact d'une tranche d'hépatectomie). La maladie NASH sera induite chez des souris par un régime alimentaire riche en gras et en sucres, comme décrit dans la littérature. Une première étape de validation de la procédure expérimentale de chirurgie sera réalisée sur un groupe d'animaux atteints de la pathologie, puis l'efficacité du patch de cellules MSC sera testée. Nous aurons besoin de 110 souris au total pour assurer des résultats statistiquement fiables.

Une grille d'évaluation de la douleur établie selon les critères de Morton et Griffiths permettra d'évaluer quotidiennement la souffrance des animaux. Etant donnée la sévérité des interventions réalisées, un examen clinique bi-quotidien sera effectué et une couverture antalgique sera adaptée en fonction de l'évaluation clinique de la douleur (injection sous cutanée de Buprecaire toutes les 12h si nécessaire). Si la souffrance persiste, l'animal sera euthanasié.

5726. *Staphylococcus aureus* est l'une des principales causes bactériennes d'infections dans le monde. En effet, ce pathogène serait responsable d'un tiers des infections cutanées et ostéo-articulaires, et d'un quart des infections broncho-pulmonaires et septicémie. De plus *S. aureus* présente également la plus grande variété de résistances aux antibiotiques observée. Du fait de leur fréquence et de leur gravité potentielle, les infections à *S. aureus* constituent aujourd'hui un problème majeur de santé publique, et il existe une attente très forte concernant le développement d'approches vaccinales efficaces.

Le développement d'un vaccin contre *S. aureus* est donc un domaine très actif, dans lequel plusieurs essais vaccinaux ont été entrepris aux cours de ces dernières années. Plusieurs de ces essais étudient des antigènes intéressants de par leur rôle dans la pathogénicité de *S. aureus* qui ont ensuite été testés pour leur capacité à induire une réponse immunitaire.

Dans ce contexte le projet décrit par la suite est une approche directe, c'est-à-dire que nous nous sommes basés sur la réponse immunitaire observée chez des patients infectés. Les antigènes candidats de ce projet sont des antigènes identifiés dans les sérums de patients atteints d'infections ostéo-articulaires à *S. aureus*. Ce sont donc des antigènes qui sont naturellement reconnus par le système immunitaire lors d'une infection à *S. aureus*.

L'objectif de ce projet est de déterminer si ces cibles naturelles du système immunitaire sont l'objet d'une bonne réponse immunitaire dans le cadre d'une vaccination directe par l'antigène. Ce projet prévoit ainsi de caractériser la réponse immunitaire obtenue grâce

au modèle murin, avec un protocole d'immunisation mimant le principe de la vaccination par l'antigène candidat. Deux séries de 24 antigènes candidats seront testées et comparées à deux groupes témoins, l'un avec un antigène polypeptidique ne provenant pas de *S. aureus* et l'autre avec injection de PBS pour chaque série. Chaque groupe comprendra 6 souris. Ces études menées sur ce modèle conduiront à l'utilisation d'environ 312 souris femelles sur 5 ans.

Par la suite, les sérums murins ainsi obtenus seront testés pour vérifier la présence d'anticorps capables de reconnaître *S. aureus in vitro* et d'aider à sa prise en charge par d'autres cellules du système immunitaire telles que les macrophages.

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 de réponse humorale est le seul modèle disponible développé jusqu'à présent, présentant des caractéristiques similaires à celles observées dans la pathologie humaine.

Ainsi, les méthodologies utilisées dans ce projet ont été adaptées afin de compiler des résultats fiables, tout en limitant le nombre d'animaux (réduction). Un suivi bi-hebdomadaire de l'état général selon une grille d'évaluation de la douleur et périodique du poids des animaux est réalisé, pour une action rapide en cas d'état de souffrance de l'animal. Enfin, les souris sont hébergées par 6 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).

5727. Les lipopolysaccharides (LPS) sont des composants de la membrane externe des bactéries Gram (-). Leur présence dans la circulation sanguine conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires stimulant la réponse immunitaire permettant la destruction et l'élimination des bactéries pathogènes. Cependant, une réponse inflammatoire excessive peut conduire au choc septique pouvant provoquer dans 30 à 50% des cas la mort des patients. L'incidence mondiale de ce syndrome est estimée à 18 millions de cas par an et aucun traitement réellement efficace du choc septique n'a été identifié à ce jour. Aussi une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires gouvernant le métabolisme et l'inactivation du LPS est fondamentale afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

La Protéine de Transfert des Esters de Cholestérol (CETP), est une protéine plasmatique connue pour son implication dans le remodelage des lipoprotéines circulantes chez l'Homme. Bien que la CETP ait été principalement étudiée dans le contexte du transport du cholestérol et des maladies cardiovasculaires, de récents travaux semblent indiquer qu'elle pourrait être aussi impliquée dans l'immunité innée. En effet, en influençant la fonctionnalité des lipoprotéines, qui sont connues pour favoriser la neutralisation des LPS dans la circulation et leur élimination par le foie, la CETP pourrait limiter l'activation excessive de la réponse immunitaire et de l'inflammation. Il a notamment été montré que l'expression de la CETP chez la souris prévient la mortalité après injection de LPS et qu'un faible taux de CETP est un facteur de risque de développement de sepsis chez des patients hospitalisés.

L'objectif de notre projet de recherche est donc de préciser le rôle physiopathologique de la CETP dans la réponse immunitaire induite par le LPS et la prévention du choc septique. Nous utiliserons pour cela un modèle expérimental reconnu d'infection polymicrobienne chez la souris. La réponse inflammatoire et les taux de survie suite à l'infection seront comparés chez des souris type sauvage (pas de CETP active), des souris génétiquement modifiées pour présenter une activité CETP modérée (TgCETP), élevée (TgCETP/KO Apo-C1) ou réduite (TgCETP/TgApo-C1).

Notre démarche expérimentale répondra aux exigences de la règle des 3R.

- Remplacement : Le protocole vise à élucider un mécanisme complexe mettant en jeu l'interaction de plusieurs tissus (foie, rate, organes lymphoïdes), et de plusieurs compartiments (sang, bile) ce qui exclut l'utilisation de modèles *in vitro* ou de modèles animaux inférieurs dont le métabolisme lipidique et le système immunitaire sont trop éloignés de celui des mammifères. Nous utiliserons dans ce projet le plus petit modèle de mammifère, la souris, en tirant parti de l'existence d'un modèle transgénique exprimant la CETP humaine.

- Réduction : Les effectifs ont été optimisés sur la base des coefficients de variabilité reportés dans la littérature et les différences attendues entre les différents groupes pour les paramètres clés de l'étude (taux de survie et concentrations de LPS).

- Raffinement : Afin de réduire la souffrance des animaux, les procédures chirurgicales seront toutes réalisées sous anesthésie suivies d'administration d'antalgiques. Des points limites seront déterminés. Le milieu d'hébergement des animaux sera enrichi.

Ces études nécessiteront au total l'utilisation de 325 souris.

5728. Les patients atteints de maladies pulmonaires arrivées au stade d'insuffisance respiratoire terminale et candidats à une transplantation pulmonaire risquent de mourir sur liste d'attente en attendant un greffon compatible. Seuls 11% des greffons pulmonaires recensés sont finalement transplantés, les autres étant récusés à cause de lésions réversibles ou non. Les greffons présentant des lésions fonctionnelles, secondaires à un encombrement bronchique par exemple, peuvent être améliorés par un nettoyage des bronches au cours d'une perfusion en dehors de l'organisme (dite *ex vivo*) pendant 4 heures. Les greffons présentant des lésions tissulaires, secondaires à une inhalation de contenu gastrique par exemple, nécessitent des traitements plus complexes. Ainsi, l'injection de cellules souches pendant la perfusion *ex vivo* du greffon pourrait permettre de réparer certaines lésions des bronches et des alvéoles. La limite actuelle est le délai d'action de ces cellules, qui est habituellement estimé à 24 heures. La pénurie de greffon reste un frein majeur au développement de la transplantation pulmonaire pour les patients atteints de maladies pulmonaires graves (fibrose, emphysème, mucoviscidose, hypertension artérielle pulmonaire). Les indicateurs de pénurie de greffon se sont dégradés au cours des dernières années. Or les greffons sont là - ils sont juste sous-utilisés. La perfusion *ex vivo* pendant 4 heures permet aujourd'hui de mieux évaluer les greffons pulmonaires, et d'améliorer des petites lésions facilement réversibles, comme l'encombrement des grosses bronches. Mais la perfusion *ex vivo* pendant 24 heures pourrait permettre demain de traiter des lésions complexes des alvéoles et des petites bronches, en injectant des cellules souches qui participeraient spécifiquement à la réparation

du poumon avant la greffe. Notre objectif est donc de mettre au point un protocole de perfusion *ex vivo* des greffons pulmonaires qui soit stable pendant 24 heures et permette d'envisager l'administration de cellules souches pour réparer les poumons lésés. Ce projet prévoit d'utiliser un modèle animal pour comparer deux protocoles de perfusion *ex vivo*, afin de déterminer lequel peut permettre de maintenir le poumon en bon état pendant 12 heures, puis pendant 24 heures d'affilée. Les deux protocoles suivent la technique décrite par l'équipe de Toronto, qui consiste à réchauffer progressivement le greffon, à le ventiler de façon douce et à le perfuser par une solution spécifique. Le protocole standard ne prévoit pas de déterminer le contenu de la solution pendant la perfusion *ex vivo* du greffon. Ce protocole standard sera le groupe témoin. A l'inverse, le protocole de soins intensifs du greffon prévoit de déterminer le contenu de la solution pendant la perfusion *ex vivo* du greffon et de corriger les anomalies qui pourraient être délétères pour le greffon. Ce protocole de soins intensifs du greffon sera le groupe expérimental. A la fin de la perfusion, les greffons seront transplantés à un animal, perfusés et ventilés pendant 4h, afin de déterminer quel protocole est associé à la meilleure fonction de greffon après transplantation. Pour la totalité du projet, nous utiliserons 48 animaux, c'est à dire 24 animaux donneurs, qui seront prélevés d'un poumon, et 24 animaux receveurs, qui recevront le greffon après sa perfusion *ex vivo*. L'ensemble des procédures sera réalisé sous anesthésie générale par un mélange couvrant les composantes hypnotiques et antalgiques de l'anesthésie. La profondeur de l'anesthésie sera monitorée afin d'éviter les phénomènes de mémorisation. Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs auront une nourriture adaptée et seront stabulés en groupe de deux dans des cages de 2m² lors de la période d'acclimatation (individus de poids <50kg) pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire ainsi les stress. Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, leur environnement sera enrichi (activité de foussement encouragée, « médecine ball », jeux dans le couloir, planche à gratter, distributeur d'aliment actif...).

5729. Chez l'homme, l'hyperactivité détrusorienne est définie par l'International Continence Society comme étant « la constatation urodynamique de contractions détrusoriennes involontaires pendant la phase de remplissage vésical, qui peuvent être spontanées ou provoquées ». On distingue deux types d'hyperactivité détrusorienne (HD) selon le facteur étiopathogénique en cause (1) idiopathique (aucune cause définie n'est suspectée); ou (2) neurogène (HDN) quand il existe une cause neurologique identifiée (traumatisme médullaire etc.). La prise en charge médicale des patients est financièrement très lourde notamment suite aux complications urologiques (incontinence), modifications urodynamiques, infections urinaires ou insuffisance rénale chronique. Ces complications sont les premières causes de ré-hospitalisation et affectent la qualité de vie et la morbidité des patients. La prévalence élevée, les conséquences psychosociales et les coûts relatifs à la prise en charge médicale font de ce syndrome un réel problème de santé publique.

Le bon fonctionnement du bas appareil urinaire impose l'intégrité du système nerveux central et périphérique, somatique et neurovégétatif. C'est à cette seule condition que la motricité vésico-sphinctérienne peut assurer l'alternance des phases de remplissage (continence) et de vidange (miction), par des phénomènes d'activation et de désactivation de fibres musculaires des différentes structures anatomiques. Malgré les avancées médicales et chirurgicales, les traitements actuels pour cette pathologie et ses complications sont limités. L'association antimuscariniques/cathétérismes vésicaux intermittents est le traitement de première intention de l'HDN. L'efficacité de cette prise en charge est limitée et les effets secondaires des antimuscariniques peuvent altérer l'observance du traitement. En deuxième intention, l'injection intradétrusorienne de toxine botulique A est désormais souvent proposée. Toutefois, l'efficacité à long terme de la toxine botulique dans cette indication n'est pas connue et le caractère invasif de sa délivrance est certain.

Il est donc nécessaire de conduire une recherche visant à une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'HDN et la réalisation de tests précliniques sur un modèle animal fiable, pour permettre le développement de traitements pharmacologiques innovants, tout en optimisant leur efficacité et en limitant leurs effets secondaires.

Il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* permettant l'étude de cette pathologie (remplacement) définie par des symptômes et donc difficile à appréhender hors d'une situation physiologique. Dans ce contexte, le modèle préclinique le plus pertinent qui présente des caractéristiques similaires à celles observées dans la pathologie humaine est le rat ayant subi une transection de la moelle épinière (SCI). Ce modèle de rats SCI a, par ailleurs, été précédemment employé pour évaluer l'effet des médicaments ou un dispositif de stimulation électrique pour le traitement de la NDO.

Les études pharmacologiques menées sur ce modèle conduiront à l'utilisation d'environ 900 rats femelles sur 5 ans. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum nécessaire (réduction) pour réaliser des statistiques acceptables (12 rats par groupe de traitement), du fait des connaissances et de l'expérience du personnel participant au projet et des procédures liées. 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. De plus, ces animaux présentent un trouble mictionnel qui nécessite un change adapté : augmentation de la fréquence, augmentation de la quantité de litière (raffinement).

5730. Les patients atteints du syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire (SEDv) présentent une fragilité artérielle conduisant à des ruptures des vaisseaux et au décès avant 50 ans. Il n'existe pas aujourd'hui de traitement efficace pour guérir cette maladie. Un des objectifs des thérapeutiques à venir est d'augmenter la solidité ou rigidité des artères chez ces patients. Les recherches se sont donc orientées vers des outils non invasifs d'étude de la rigidité artérielle, et notamment la mesure de la vitesse de l'onde de pouls (VOP). La VOP se propage d'autant plus vite le long des artères que celles-ci sont rigides.

L'UltraFastEcho est une technologie d'imagerie ultrasonore permettant de mesurer la VOP, sur un court segment artériel, de manière non invasive et pouvant s'appliquer chez le petit animal. L'utilisation de l'UltraFastEcho a été récemment validée chez l'homme dans d'autres applications. Nous souhaitons valider l'efficacité de cette méthode de mesure chez l'animal afin de l'appliquer ultérieurement chez l'homme. L'intérêt est de mettre en évidence des anomalies de la rigidité de la paroi artérielle. Dans ce projet,

nous évaluerons la VOP de l'aorte abdominale de souris génétiquement modifiées, modèles du SEDv. Nous analyserons nos résultats en fonction de la mesure de la pression artérielle par la pose d'un cathéter carotidien.

Nous souhaitons mettre en évidence *in vivo* la différence de rigidité artérielle en fonction du génotype. Le nombre total sera de 60 souris réparties en deux groupes : les souris génétiquement modifiées et les souris contrôles.

Dans l'objectif de suivre la règle des 3R, et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques, nous avons évalué à 60 le nombre de souris nécessaires pour obtenir des différences significatives entre les groupes étudiés. Afin de limiter le plus possible la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie générale. L'analgésie pré-opératoire est prévue par injection sous-cutanée de 0,1mg/kg de buprénorphine, et lidocaïne 5% en injection sous-cutanée aux sites d'incision. Les points limites prévus au cours de la procédure sont : hémorragie aux sites d'insertion des cathéters non contrôlée, c'est à dire malgré la reprise des ligatures, accélération brutale de la fréquence respiratoire ou apparition de mouvements respiratoires inefficaces ou fréquence respiratoire basse de type « gasping », chute de la pression artérielle au-dessous de 40mmHg ou élévation de la pression artérielle systolique au-dessus de 250mmHg, persistance de signe de souffrance (vocalisation, mouvements des pattes) malgré l'approfondissement de l'anesthésie.

Ce travail permettra de valider la possibilité de mesure de la rigidité artérielle chez la souris mutante, de manière non invasive par technique ultrasonore. En perspective il permettra d'évaluer, dans des projets ultérieurs, l'effet de traitements modifiant la rigidité artérielle et de trouver ainsi des cibles pour traiter cette pathologie.

5731. Les patients atteints du syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire (SEDv) présentent une fragilité artérielle conduisant à des ruptures des vaisseaux et au décès avant 50 ans. Il n'existe pas aujourd'hui de traitement efficace pour guérir cette maladie. Un des objectifs des thérapeutiques à venir est d'augmenter la solidité ou rigidité des artères chez ces patients. Les recherches se sont donc orientées vers des outils non invasifs d'étude de la rigidité artérielle, et notamment la mesure de la vitesse de l'onde de pouls (VOP). La VOP se propage d'autant plus vite le long des artères que celles-ci sont rigides.

L'UltraFastEcho est une technologie d'imagerie ultrasonore récemment validée chez l'homme qui permet de mesurer la VOP sur un court segment artériel de manière non invasive et pouvant s'appliquer chez le petit animal. Nous souhaitons utiliser méthode de mesure pour mettre en évidence des anomalies de la rigidité de la paroi artérielle, en évaluant la VOP dans un modèle murin du SEDv. Les souris mutantes présentent un phénotype très proche de la maladie humaine avec une surmortalité précoce par ruptures et dissections artérielles. Ces événements entraînent un décès brutal de l'animal, ce de manière imprévisible sans signe préalable. Cependant, afin de réduire cette surmortalité, nous mettons en œuvre des mesures évitant les poussées d'hypertension artérielle qui pourraient favoriser les ruptures artérielles.

Nous analyserons nos résultats en fonction du niveau de la pression artérielle par la pose d'un cathéter carotidien. Le nombre total de souris sera de 60, réparties en deux groupes (souris mutantes et contrôles).

Dans l'objectif de suivre la règle des 3R, et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques, le nombre de souris a été calculé de manière à étudier le minimum de souris pour obtenir des différences significatives entre les groupes. Nous souhaitons mettre en évidence *in vivo*, la différence de rigidité artérielle en fonction du génotype.

Afin de limiter le plus possible la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie générale. L'analgésie pré-opératoire est prévue par injection sous-cutanée de 0,1mg/kg de buprénorphine, et lidocaïne 5% en injection sous-cutanée aux sites d'incision. Les points limites prévus au cours de la procédure sont : hémorragie aux sites d'insertion des cathéters non contrôlée, c'est à dire malgré la reprise des ligatures, accélération brutale de la fréquence respiratoire ou apparition de mouvements respiratoires inefficaces ou fréquence respiratoire basse de type « gasping », chute de la pression artérielle en dessous de 40mmHg ou élévation de la pression artérielle systolique au-dessus de 250mmHg, persistance de signe de souffrance (vocalisation, mouvements des pattes) malgré l'approfondissement de l'anesthésie.

Ce travail permettra d'étudier la rigidité artérielle chez les souris mutantes par technique ultrasonore. Par ailleurs, la variation de la rigidité artérielle en fonction de la pression artérielle est un marqueur de fragilité vasculaire. Moins l'artère se rigidifie à l'augmentation de pression artérielle, plus elle est à même de se rompre. La mise au point de cet outil d'évaluation pourrait être utile dans l'étude pharmacodynamique de thérapeutiques potentielles.

5732. Cette demande concerne des activités pédagogiques dans le cadre d'enseignement de 'Physiologie et Physiopathologie' destiné à la formation d'étudiants vétérinaires et ingénieurs. Il s'agit de séances de travaux dirigés et pratiques permettant aux étudiants un abord avec l'animal (le lapin), une première formation sur sa contention, sa tranquillisation, son anesthésie-réanimation et son analgésie ainsi que l'acquisition des bases de chirurgie vétérinaire. Ces séances traitent aussi de la nécessité de préserver le bien-être animal et les notions de bientraitance et d'éthique en expérimentation animale. Ces séances incluent de manière intégrée, le suivi et le monitoring de trois fonctions biologiques vitales de l'organisme et leur régulations principales chez l'animal anesthésié: les fonctions cardio-vasculaire, ventilatoire et rénale. Ces séances sont nécessaires et déterminantes pour la formation des futurs vétérinaires. Les méthodes alternatives (que nous développons par ailleurs) ne peuvent à ce jour se substituer complètement à l'animal vivant pour former des futurs vétérinaires. Pour les étudiants ingénieurs, les activités pédagogiques se limitent à une séance unique de travaux dirigés, chaque année, au cours de laquelle les étudiants sont spectateurs.

Dans un souci éthique constant et en intégrant la règle des trois R :

- Réduire : en tant qu'enseignants vétérinaires, nous sommes pleinement conscients de la nécessité de limiter le besoin en animaux vivants pour nos enseignements. C'est pourquoi, depuis une dizaine d'années, nous réduisons constamment le nombre d'animaux utilisés parallèlement au développement de méthodes alternatives (cf. ci-dessous). Ainsi, si historiquement les étudiants vétérinaires

de première année se formaient sur différents modèles de rongeurs et de gros animaux, aujourd'hui, ils ne travaillent plus que sur lapin, à raison d'une séance de travaux dirigés et de deux séances de travaux pratiques par étudiant. Globalement, la réduction nette du nombre d'animaux utilisés correspond aujourd'hui à 68 lapins, 4 cobayes et 2 brebis par an et le ratio du nombre de lapins utilisés par étudiant est passé de 1,2 avant 2004 à 0,4 depuis 2014.

Au total, notre projet implique l'utilisation de 73 lapins par année universitaire (72 pour les étudiants vétérinaires +1 pour les étudiants ingénieurs), soit un nombre total de 365 lapins pour les cinq années à venir. Chaque année, les animaux euthanasiés ont ensuite une deuxième application pour la formation initiale (anatomie vétérinaire) et/ou continue (dentisterie ...).

- Remplacer et Raffiner : une formation 'virtuelle' est dispensée aux étudiants lors de séances précédant l'accès à l'animal. Cette formation 'virtuelle' comprend une information théorique sur l'ensemble des étapes des séances en présence de l'animal (de la contention à l'euthanasie) et inclut une formation pratique sur 'mannequins' pour les injections et les cathétérismes vasculaires et sur peaux artificielles pour l'incision cutanée, complétée par l'utilisation de logiciels de simulation et de vidéos pratiques commentées ... Les séances pratiques se font avec un encadrement adéquat et adapté (trois enseignants expérimentés dont deux vétérinaires, plus un assistant technique recherche-formation). Les séances de travaux pratiques sont réalisées en huitième de promotion permettant un encadrement optimal (quatre étudiants pour un lapin sous la responsabilité d'un encadrant).

5733. Le processus de réparation ou régénération tissulaire est présent et indispensable aux organismes vivants. C'est un processus complexe, finement contrôlé qui fait intervenir de nombreux types cellulaires et qui a pour but de restaurer l'intégrité et la fonction d'un tissu lésé. Ce processus peut être schématiquement divisé en 3 étapes successives : une réponse inflammatoire précoce, une étape de prolifération et différenciation cellulaire et finalement une étape de remodelage tissulaire. Les macrophages s'accumulent rapidement dans les lésions (d'origine infectieuse ou non) et ont un rôle central non seulement dans l'élimination des microorganismes et/ou des débris cellulaires mais également dans le contrôle des premières étapes de réparation. Les macrophages présents dans les lésions vont orchestrer une inflammation modérée et contrôler la revascularisation du tissu et la restructuration de la barrière épithéliale lésée.

Le processus de cicatrisation est essentiel, finement contrôlé. Néanmoins, dans de nombreuses situations, ce processus est insuffisamment efficace et/ou inadéquat comme par exemple dans les cas de brûlures graves, de fibrose, d'ulcère ou de diabète de type 2. Les macrophages sont des cellules très plastiques qui s'adaptent à l'environnement et qui auront des fonctions différentes en fonction de l'environnement dans lequel ils se trouvent. Les macrophages sont donc une cible thérapeutique de choix pour améliorer la réparation tissulaire. Nous avons identifié une molécule physiologique, naturellement utilisée par l'organisme, qui confère aux macrophages un phénotype "réparateur". Notre projet vise à vérifier *in vivo* nos observations afin d'envisager de proposer un traitement facile à mettre en œuvre et dénué de toxicité pour améliorer le processus de cicatrisation et de réparation tissulaire.

Notre démarche expérimentale tient ainsi en compte la règle des 3R :

Remplacement : l'utilisation des animaux est indispensable avant de proposer un traitement facile à mettre en œuvre et dénué de toxicité pour améliorer le processus de cicatrisation et de réparation tissulaire. En effet, seul un modèle *in vivo* nous assure de l'implication de notre traitement dans des conditions physiopathologiques proches de la réalité clinique.

Réduction : les modèles seront réalisés sur un nombre nécessaire et suffisant d'animaux (354 souris). Ce nombre a été défini afin d'exploiter des résultats statistiquement fiables.

Raffinement : les souris seront hébergées dans des conditions adaptées à l'espèce avec un enrichissement du milieu. Le protocole expérimental comprend un suivi quotidien des animaux, des indicateurs comportementaux et physiques prédéfinis (état général, prostration, poil hérissé, suivi pondéral de l'animal) seront évalués quotidiennement, et constitueront les points limites de l'expérience (mise à mort de l'animal). Pour éviter toute souffrance de l'animal au cours du protocole expérimental des analgésiques seront donnés. Ce projet s'inscrit ainsi dans une gestion éthique de l'expérimentation animale et est donc en accord avec les réglementations européennes et françaises de bonnes pratiques de laboratoire.

5734. L'arrêt cardiaque est un problème de santé publique, responsable de plus de 500000 morts par an en Europe et aux Etats-Unis. Cette mortalité peut être due bien sûr à l'incapacité des manœuvres de réanimation (comprenant notamment le massage cardiaque) à faire repartir le cœur. Néanmoins, même en cas de succès de cette réanimation initiale, un nombre important de patient décèdera au cours de l'hospitalisation. En effet, l'arrêt cardiaque entraîne une hypoxie globale profonde (baisse de l'apport en oxygène aux cellules) à l'origine de lésions cellulaires et de dysfonctionnement des organes vitaux, souvent irréversible, même après reprise de la circulation sanguine. Le cerveau est l'organe le plus sensible à cette hypoxie et ce sont principalement les lésions neurologiques qui conditionnent le pronostic des patients. A ce jour, l'hypothermie thérapeutique est le seul traitement adjuvant de la réanimation cardio-pulmonaire permettant de limiter les lésions cérébrales et ainsi de réduire la mortalité chez l'Homme. Ce traitement consiste à refroidir l'organisme de 3 à 5°C en dessous de sa température physiologique le plus précocement possible après la survenue de l'arrêt cardiaque. Malgré une recherche intensive, les mécanismes protecteurs de l'hypothermie restent en grande partie méconnus. Une meilleure connaissance de ses mécanismes d'action pourrait permettre d'améliorer son utilisation mais aussi de reproduire pharmacologiquement ses effets bénéfiques.

Un précédent travail a montré que l'ouverture d'un canal localisé dans la mitochondrie était impliquée dans les lésions cellulaires consécutives à l'arrêt cardiaque. L'ouverture de ce canal est favorisée par la fixation à ses composants d'une protéine appelée cyclophiline D. Notre hypothèse est que l'hypothermie thérapeutique prévient l'ouverture du canal mitochondrial et ses conséquences délétères, en inhibant la fixation de la cyclophiline D sur ce canal.

Pour vérifier notre hypothèse, nous avons mis au point un modèle d'arrêt cardiaque chez la souris. Les animaux bénéficieront d'une anesthésie générale pour la réalisation de la chirurgie (peu invasive) et de l'arrêt cardiaque puis d'un traitement antalgique administré

avant la fin de la chirurgie pour empêcher toute douleur post-opératoire. Les séquelles éventuelles, notamment cérébrales, de l'arrêt cardiaque ne sont pas source de douleur (comme chez l'Homme). Après une phase de réveil en couveuse, les animaux sont hébergés dans une animalerie au sein d'un environnement à l'enrichissement renforcé. En cas de difficulté à se nourrir ou s'hydrater seuls, suite à l'intervention, des traitements adaptés sont mis en place. Une surveillance post-opératoire stricte pluriquotidienne sera mise en place tout au long du protocole (pesées biquotidiennes, observations de la fréquence respiratoire, mécanique respiratoire, déplacement dans la cage, réactivité, capacité à se nourrir ou s'hydrater seul...) pour s'assurer de l'absence de douleur et de souffrance et des points limites sont définis.

L'intérêt de cette espèce (souris) est qu'il existe des animaux dépourvus de cyclophiline D (après modification génétique) permettant d'étudier spécifiquement le rôle de cette protéine. Il est attendu que les animaux génétiquement modifiés soumis à un arrêt cardiaque soient protégés de la même manière que les animaux (non génétiquement modifiés) traités par l'hypothermie thérapeutique. Il est également attendu que l'application de l'hypothermie thérapeutique chez les animaux dépourvus de cyclophiline D n'apporte pas de protection supplémentaire. Nous souhaitons étudier les séquelles visibles sur une IRM cérébrale réalisée 24h après l'arrêt cardiaque ainsi que le taux de survie à 7 jours. Dans chacun des groupes de souris (au nombre de 5), au moins 4 animaux devront être réanimés avec succès pour analyser les différents critères de jugement. Il s'agit du nombre minimal le plus juste permettant ensuite notre analyse statistique. Les différents groupes seront obtenus après randomisation. D'après la littérature et notre précédente étude, la mortalité attendue lors de ce protocole est élevée puisque, comme chez l'Homme, les conséquences d'un arrêt cardiaque de quelques minutes sont majeures et la réanimation n'est pas systématiquement efficace. Notre calcul du nombre d'animaux nécessaires tient compte de cette mortalité élevée. Le nombre total maximum de souris nécessaire est donc de 138. Si la mortalité est trop élevée, entraînant un nombre d'animaux théoriquement nécessaire dépassant ce total, le protocole est arrêté.

5735. L'obésité est une pandémie qui touche 300 millions de personnes dans le monde et en France, 15% de la population adulte est obèse et un tiers est en surpoids. Les formes sévères d'obésité, souvent associées à d'autres pathologies telles que le diabète de type 2 et la stéatose hépatique, sont généralement réfractaires au régime, à l'exercice physique et à la pharmacothérapie. La chirurgie bariatrique est alors le traitement le plus efficace. Elle permet une perte de poids qui s'accompagne d'une amélioration des comorbidités et guérit le diabète dans 4 cas sur 5. Les deux montages chirurgicaux les plus pratiqués sont la gastrectomie longitudinale (sleeve) et le court-circuit gastro-intestinal de type Roux-en-Y (bypass). Ces chirurgies de l'obésité sont très efficaces mais très invasives, et s'accompagnent d'une mortalité et d'une morbidité non négligeable, d'où l'intérêt de rechercher des alternatives thérapeutiques. Pour ce faire, il est essentiel de comprendre comment la chirurgie améliore les paramètres métaboliques des obèses.

Sans être identique, l'adaptation de l'architecture et des fonctions intestinales suite à la chirurgie bariatrique rappelle ce qui est rapporté pour les patients ayant subi une résection étendue de l'intestin grêle pratiquée pour des raisons accidentelles ou pathologiques. Cette résection étendue (plus de 80% de l'intestin grêle et souvent une partie du colon) est à l'origine d'une insuffisance intestinale et d'une pathologie appelée le syndrome de grêle court.

Nous émettons l'hypothèse que l'épithélium intestinal s'adapte après la chirurgie (modifications des cellules endocrines, des capacités absorbatives et de barrière). Ces différents types de restructuration gastro-intestinale modifient sa physiologie et induisent des changements du microbiote intestinal qui pourraient contribuer à la perte ou à la reprise de poids et à l'amélioration des paramètres métaboliques.

Les objectifs de ce projet sont de caractériser les mécanismes de l'adaptation gastro-intestinale en réponse à la chirurgie chez des modèles de rats (obèses ou non) et à terme chez des modèles de souris transgéniques afin de déterminer l'origine de l'amélioration des paramètres métaboliques en focalisant sur le rôle de la leptine, de l'insuline et des acides biliaires. Le but ultime est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques accessibles par voie orale pour palier à la chirurgie bariatrique chez les patients obèses ou au contraire stimuler la reprise de poids chez les patients souffrant du syndrome de grêle court.

Les études de la physiologie gastro-intestinale, de son microbiote et des interactions entre l'intestin et le foie, le pancréas ou le cerveau, ne peuvent être réalisées que sur des animaux. Nous sommes en train de développer des cultures d'organoïdes pour favoriser le remplacement des modèles animaux dans le cas de questions extrêmement précises et se posant uniquement au niveau d'un seul organe. Ces études de la physiologie gastro-intestinale ne peuvent être réalisées que sur des animaux (rats et souris) car aujourd'hui aucun système cellulaire ne permet de reproduire le développement de l'intestin *ex vivo*.

De plus, nos études qui s'intéressent aux relations physiologiques et à l'étude des discussions croisées entéro-hépatique (intestin-foie), intestin-cerveau et intestin-pancréas ne sont réalisables qu'*in vivo* chez un animal entier et vivant. Enfin nos études présentent également une étude du microbiote intestinal dont la majorité des espèces ne peut pas être cultivée hors de l'organisme lui-même. Au jour d'aujourd'hui pour comprendre les interactions entre les organes il n'existe pas d'alternative à l'expérimentation animale. Pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nos conditions d'élevage limitent au mieux les variations physiologiques et nos expériences pilotes ont permis d'accéder aux moyennes de variations attendues de certains paramètres (% de gain ou perte de poids, glycémie à jeun, etc.). Nous avons réalisé des analyses statistiques afin de déterminer le nombre optimal (et donc minimal) d'animaux nécessaires par groupe pour observer une différence significative si elle existe avec un risque α inférieur à 5% et un risque β inférieur à 10%. Un même groupe d'animaux sera analysé pour les mêmes paramètres en pré- et post-chirurgie puis post-mortem les tissus seront caractérisés en détails. Pour favoriser le raffinement, des moyens antalgiques sont utilisés. Par ailleurs, mais au moment du sacrifice de très nombreux organes seront prélevés pour être analysés dans le cadre de ce projet mais également pour des projets en collaboration, sur d'autres questions, avec d'autres équipes de recherche (anémie et obésité, fertilité et chirurgie bariatrique, stéatose hépatique et insuffisance hépatique...).

Le bien-être animal sera toujours une préoccupation majeure de ce projet, la chirurgie bariatrique étant réalisée pour induire une réduction de la prise alimentaire et une perte de poids, un % de perte de poids maximum ne peut pas être défini comme point limite.

En revanche, l'observation journalière des animaux permettra d'identifier rapidement les animaux qui ne s'alimentent pas du tout, semblent très déshydratés et/ou perdent plus de 20% de leur poids d'un jour à l'autre. Ces critères seront nos points limites. Au final, ce projet nécessitera l'utilisation de 630 rats et 1104 souris.

5736. La prévalence (nombre de patients atteints dans la population générale) de la dermatite atopique (eczéma) a triplé en 30 ans dans les pays industrialisés. En France, près de 15% des enfants seraient affectés. La dermatite atopique (DA) est une affection de la peau chronique, prurigineuse et inflammatoire, alternant périodes de poussées et périodes d'accalmie. La dermatite atopique se manifeste par une altération de la barrière épidermique qui rend la peau sèche et anormalement sensible à toutes les agressions et est accompagnée d'une sensibilisation aux allergènes, avec une réaction immunitaire excessive. Il n'existe pas actuellement de traitement curatif contre la DA. Les traitements sont exclusivement préventifs (prévention des poussées) et symptomatiques (anti-inflammatoire et antihistaminique + antibiotique et antiviraux en cas de complications).

Les anti-inflammatoires utilisés actuellement, les corticoïdes, présentent de nombreux effets indésirables. Il apparaît donc nécessaire de mettre au point de nouveaux traitements ciblant la dermatite atopique.

Notre objectif est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire de produits pharmacologiques, candidats-médicaments, dans un modèle de dermatite atopique chez la souris. Le développement de candidats-médicaments à partir de modèles moléculaires et cellulaires disponibles requiert une transposition dans des modèles intégrés et complexes. C'est pour cette raison qu'une approche *in vivo* chez la souris est nécessaire pour s'assurer de l'activité anti-inflammatoire des nouveaux candidats-médicaments.

Adéquation avec la règle des 3R :

Remplacer

Pour réaliser ce projet, nous utiliserons la souris, car cette espèce animale est la plus utilisée dans le développement de médicaments. A ce jour, aucun modèle alternatif n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre d'évaluer la biodisponibilité d'une molécule, qui met en jeu les mécanismes d'absorption, de distribution, de dégradation, et d'élimination des composés susceptibles d'affecter l'activité des molécules. Pour cette raison, une approche *in vivo* est nécessaire pour s'assurer de l'activité des nouveaux candidats-médicaments.

Réduire

La réalisation des procédures par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Nous avons montré de par notre expérience antérieure que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet d'obtenir une dermatite reproductible avec 8 souris par groupe. Nous proposons d'utiliser un protocole utilisant un groupe témoin, un groupe contrôle recevant le candidat-médicament à la plus forte dose, un groupe témoin de dermatite atopique et un/des groupe/s thérapeutique/s avec administration du candidat-médicament, à une/des doses croissantes dans le modèle de dermatite atopique.

Il est prévu d'évaluer l'activité de 8 candidats-médicaments à une dose unique par an (8 protocoles comprenant chacun 4 groupes de 8 souris, pour un total de 256 souris par an). L'activité des 3 candidats médicaments les plus actifs sera étudiée plus précisément en utilisant des doses croissantes (l'effet sera mesuré à 5 doses, soit 8 souris x 8 groupes = 64 souris par candidat médicament, un total de 192 souris pour 3 candidats médicaments par an). Nous envisageons donc l'utilisation d'un maximum de 2240 souris sur une période de 5 ans.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien-être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupes de 6 à 10, dans des cages de grande taille enrichies de tubes en carton. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, de la nourriture et de l'état des animaux.

La douleur liée aux injections est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'administration des candidats-médicaments pour visualiser tout signe de toxicité imprévue qui nécessiterait la mise à mort de l'animal.

5737. Le stress oxydant est identifié comme un des mécanismes principaux du vieillissement et de la sénescence des individus, notamment à travers les dommages qu'il peut causer à différents compartiments biologiques (lipides, protéines, ADN). Le stress oxydant se définit autour d'une balance, et a lieu lorsque les dommages oxydants imposés à l'organisme surpassent les défenses anti-oxydantes de ce dernier. Les défenses anti-oxydantes de l'organisme sont de deux natures : endogènes (notamment enzymatiques) et exogènes (issues de l'alimentation). Ainsi, le statut antioxydant des organismes change activement en fonction de l'accès à des ressources alimentaires particulières (pauvres ou riches en antioxydants). Si de nombreuses espèces animales sont capables d'auto-médication, une question largement inexplorée concerne la capacité des individus à moduler leurs défenses anti-oxydantes par un choix actif d'aliments spécifiques (riches en antioxydants) en fonction de leur statut oxydatif. Ceci est particulièrement vrai chez les oiseaux granivores qui ont accès dans leur environnement à une diversité de graines dont la teneur en antioxydants varie substantiellement. Le but de ce projet est d'évaluer la capacité de diamants mandarins (*Taeniopygia guttata*), oiseaux granivores, à discriminer et effectuer un choix actif d'alimentation en fonction de leur statut antioxydant initial. Ce projet sera réalisé en accord avec la règle des 3R. Nous allons utiliser des animaux non-reproducteurs achetés en animalerie (N = 18 mâles et 18 femelles, soit 36 animaux) d'âge connu pour avoir une puissance de test satisfaisante (3x3 réplicats mâles et 3x3 réplicats femelles) (=Réduction). Pour l'enrichissement des cages nous utilisons des perchoirs et également des bassines remplies d'eau dans lesquelles les oiseaux peuvent se baigner (=Raffinement). Enfin, les expériences de choix alimentaire ne peuvent être réalisées que chez l'animal vivant (=Remplacement).

5738. Ce projet a pour objectif d'évaluer la pharmacocinétique de nouvelles spécialités vétérinaires destinées aux chevaux. La pharmacocinétique a pour but d'étudier le devenir d'une substance active contenue dans un médicament après son administration dans l'organisme. C'est une étape nécessaire à l'autorisation de mise sur le marché de nouveaux produits.

Les évaluations sont faites sur l'espèce cible, qui est pour ce projet le cheval. Cette évaluation nécessite l'administration ou l'application des spécialités en phase de développement. Ce projet concerne plusieurs spécialités vétérinaires présentant un bénéfice pour la santé des chevaux ou leur apportant un confort :

Exemples :

- antiparasitaire,
- antibiotique,
- répulsif d'insectes...

Les spécialités sont administrées aux chevaux puis, des prélèvements sanguins et urinaires sont réalisés afin de suivre leur persistance respectivement dans le sang ou les urines. Les chevaux font l'objet d'un examen clinique quotidien tout au long de l'étude (observation de potentiels effets secondaires, suivi de température corporelle...).

Pour ce projet, il n'est pas attendu d'effets secondaires notables. En effet, la plupart des spécialités utilisées existent déjà et elles ont fait la preuve de leur innocuité chez d'autres espèces. Concernant la sévérité, les procédures de ce projet sont classées en catégorie légère.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Il n'existe pas à ce jour de méthode alternative au recours à l'animal permettant d'évaluer la pharmacocinétique ou la pharmacodynamique des médicaments. Un nouveau médicament doit être testé avec l'espèce cible avant d'obtenir une autorisation de commercialisation.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisé est limité au plus juste pour permettre de répondre aux exigences réglementaires et scientifiques des études. La variabilité individuelle des réponses aux traitements contraint toutefois à constituer des effectifs représentatifs.

Raffinement :

Les animaux sont hébergés en groupe et observés quotidiennement. En cas de problème de santé, l'animal est examiné et traité par un vétérinaire.

Animaux concernés :

200 chevaux sont prévus pour la durée du projet (5 ans).

Les procédures expérimentales n'étant pas invasives, les animaux peuvent être inclus dans plusieurs études.

A l'issue de leur carrière, les animaux peuvent être adoptés pour des activités de sport et loisirs. Dans ce cadre, un programme d'adoption est en place.

5739. 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. Elle est classée dans la catégorie B des agents bioterroristes dans la liste CDC (Centers for Disease 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. Dans le cadre de ce projet, un modèle *in vivo* d'intoxication à la ricine a été développé et ce modèle est utilisé pour la validation des molécules inhibitrices.

Dans ce contexte, le projet a pour objet d'évaluer l'effet neutralisant des anticorps monoclonaux anti-ricine et de ses mêmes anticorps anti-ricine produit dans un plant de tabac. Ces Ac ont été sélectionnés pour les essais *in vivo* car ils ont présenté un effet inhibiteur *in vitro*.

L'anticorps sera également produit sous forme modifiée et sous forme chimérique.

Le nombre de groupes et le nombre d'animaux par groupe permettra d'évaluer l'effet du traitement en co-administration, en prophylaxie et en curatif. Cette répartition a été déterminée en se basant sur les essais précédents.

Les souris seront hébergées dans un environnement enrichi (carrés de cellulose, poches de gel hydratant) et seront observées 2 fois par jour. Tous ces éléments montrent que les essais sont réalisés dans le respect de la règle des 3R.

L'ensemble de ce projet nécessitera 540 souris de souche CD1.

5740. Ce projet de recherche fondamentale a pour but d'étudier les propriétés de transmission et de codage de l'information par les synapses excitatrices dans les cellules de Purkinje du cervelet de rat. Cette structure du cerveau, impliquée dans la coordination motrice, la régulation des mouvements, l'équilibre, et l'apprentissage moteur, intègre l'information somatosensorielle provenant de l'ensemble du corps. Nous étudierons les connections synaptiques qui transmettent cette information aux cellules de Purkinje afin de déterminer si cette population est homogène ou bien s'il existe différents types de synapses.

Ces travaux sont basés sur l'utilisation de tranches de cervelet de rat dont l'architecture et les mécanismes fondamentaux sont proches de ceux du cerveau humain. Ils s'appuient sur de nombreux travaux réalisés *in vitro*, dans des tranches de cervelet et des cellules en culture.

Le cervelet présente une structure hautement organisée, mise en place au cours du développement. L'architecture des connections locales ne peut se mettre en place que *in situ*, en présence des diverses afférences du cervelet. Seul un prélèvement de tissu chez l'animal nous permet d'étudier les propriétés des synapses de cette structure cérébrale, leur fonction et leur intégration.

Ce projet nécessitera 300 rats pour une durée de 3 ans.

Le prélèvement sera effectué après euthanasie réalisée sous anesthésie générale et ne générera ni stress ni douleur chez l'animal. A terme, ces travaux nous permettront d'approfondir nos connaissances des synapses et de leur capacité de codage, ainsi que le rôle des récepteurs et de leurs protéines associées. La connaissance de ces mécanismes fondamentaux ouvre la porte à notre compréhension des phénomènes et mécanismes pathologiques du système nerveux.

5741. Lorsqu'elles se déclenchent de façon inappropriée et/ou de façon trop intense, les réactions inflammatoires peuvent causer des dégâts tissulaires et ainsi contribuer au développement et à l'évolution de différentes maladies parmi lesquelles l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde, l'asthme allergique et les maladies auto-immunes. Les plaquettes sanguines sont maintenant reconnues comme étant des acteurs importants des réactions inflammatoires. Parmi leurs actions bien caractérisées, elles favorisent l'entrée des cellules immunitaires dans les tissus où ont lieu ces réactions et participent ainsi à leur bon déroulement. Nos résultats ont montré que malgré cet effet pro-inflammatoire, les plaquettes limitent les dégâts vasculaires et tissulaires associés à l'infiltration leucocytaire dans les tissus enflammés et les tumeurs solides. Les mécanismes de cette régulation des activités délétères des leucocytes par les plaquettes restent méconnus. Leur identification permettrait d'évaluer l'intérêt thérapeutique des anti-plaquettaires dans différentes situations inflammatoires avec le souci du respect de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer). En effet, nous aurons notamment recours à des expériences *in vitro* réalisées en chambres de perfusion avec des cellules humaines afin de limiter l'utilisation des animaux. Par ailleurs, des mesures de raffinement seront prises en compte par l'administration de dérivés morphiniques ainsi que par de l'enrichissement dans les cages pour occuper les animaux. Le nombre de souris nécessaires à la réalisation de ce projet de 5 ans est estimé à 480 parmi lesquelles figureront des souris transgéniques afin de réaliser les modèles les plus adaptés à la pathologie recherchée.

Notre projet fera appel principalement à des réactions induites par injection de complexes-immuns et à des modèles de tumeurs solides induites par injection sous-cutanée de cellules tumorales.

5742. Le projet vise à évaluer deux nouvelles techniques d'imagerie des propriétés mécaniques des tissus: une permettant de voir la force, l'autre la pression. Ces techniques seront appliquées à des modèles de tumeurs traitées avec des molécules spécifiques. Il portera sur un total estimé de 165 animaux (souris). Il s'inscrit pleinement dans la démarche des 3R (réduire, raffiner, remplacer), en

-réduisant au maximum le nombre d'animaux de par l'analyse statistique préalable sur la taille des groupes requis pour réaliser l'étude avec significativité

-raffinant les manipulations de par l'utilisation de la technique complètement non invasive qu'est l'IRM, qui permet le suivi longitudinal sur les mêmes animaux sans souffrance, et en

-remplaçant par des simulations numériques quand c'est possible, tous les aspects expérimentaux de cette étude qui s'inscrit dans un projet vaste sur l'étude des forces et des pressions dans les tumeurs.

5743. Les myosites regroupent un ensemble de maladies graves caractérisées par une faiblesse musculaire, une élévation sérique des enzymes musculaires et la présence dans le muscle squelettique d'un infiltrat cellulaire inflammatoire. Chez environ 60% des patients, des auto-anticorps (aAc) spécifiques ou associés aux myosites sont retrouvés dans le sang des patients. Ils ont, d'une part, un intérêt diagnostique et ont permis d'identifier de nouvelles formes de la maladie et d'autre part un rôle potentiel dans la physiopathologie. Le manque de modèle animal approprié constitue un frein important à la découverte de biomarqueurs, aux études physiopathologiques et au développement thérapeutique.

La souris NOD (non obese diabetic), génétiquement susceptible aux maladies auto-immunes, développe un diabète de type 1 spontané. Récemment, nous avons développé deux lignées de souris NOD déficientes dans la voie de costimulation lymphocytaire ICOS/ICOSL. Ces souris sont protégées du diabète mais développent une myosite auto-immune spontanée très proche de ce qui est observé chez l'Homme (faiblesse musculaire, nécrose/régénération myocytaire, infiltrat inflammatoire endomysial).

Il s'agit donc d'un modèle nouveau et unique dans lequel nous proposons de (i) caractériser phénotypiquement les atteintes musculaires et neurologiques et d'identifier de nouveaux aAc et (ii) de conduire des études physiopathologiques par immunisation avec les Ag cibles des aAc identifiés.

Les résultats obtenus au cours d'une étude antérieure menée dans le laboratoire sur un autre modèle murin de myosite, nous permettent de mettre en place les deux procédures expérimentales précitées en respectant le concept des 3R. Le nombre d'animaux nécessaires est de 144. Il est réduit au minimum en tenant compte (i) de la mortalité liée au diabète développé par les animaux et (ii) de la variabilité des mesures de la force musculaire et de l'évaluation la locomotion. Une échelle de gravité des symptômes observés a été établie et permet d'établir un point limite dans l'ensemble des expériences. Elle permettra également d'évaluer la douleur des animaux et de mettre en place une procédure visant à la limiter.

Enfin, l'ensemble des expériences sera réalisé dans une animalerie agréée, où les conditions d'hébergement sont contrôlées : température, hygrométrie, cycle jour/nuit, change et nourriture.

5744. L'hémostase est l'ensemble des mécanismes biologiques qui assurent le maintien du sang à l'intérieur des vaisseaux et qui se mettent en place pour arrêter le saignement lorsqu'un vaisseau est blessé spontanément ou secondairement à une intervention chirurgicale. Quand les techniques conventionnelles sont insuffisantes, l'hémostase peut être améliorée en chirurgie par les hémostatiques chirurgicaux.

Les hémostatiques chirurgicaux regroupent des médicaments et des dispositifs médicaux qui ont un champ d'utilisation très large à l'hôpital. Ceci est expliqué par les nombreux facteurs de risques hémorragiques liés aux patients et à la chirurgie. A ce jour, il n'existe encore aucune stratégie thérapeutique validée pour orienter le chirurgien vers le choix de produit le plus adapté à chaque situation. Ce projet de recherche s'intéresse au traitement des plaies vasculaires et à l'hémostase chirurgicale et a pour objectif ultime de développer de nouvelles approches multimodales.

L'évaluation et le développement de nouveaux dispositifs, techniques et méthodes pour l'hémostase chirurgicale nécessite une phase de recherche préclinique et de développement qui permet de les mettre au point et de vérifier leur sécurité. A l'heure actuelle ce projet ne peut pas être réalisé à l'aide de modèles cellulaires ou simulé par des techniques informatiques. Le projet prévoit donc le recours à des modèles porcins et ovins, justifié par des organes de taille proche de ceux de l'homme dans des conditions fonctionnelles comparables. Pour réaliser ce projet, des interventions expérimentales de chirurgie et d'imagerie mini-invasive seront réalisées sur 75 animaux de chaque espèce pour assurer l'évaluation fonctionnelle chronique des dispositifs médicaux implantés. Le nombre d'animaux a été évalué et réduit au minimum nécessaire pour répondre aux besoins scientifiques de ce projet et obtenir des données fiables.

Les modèles animaux suivront exactement le cheminement d'un futur patient avec les mêmes exigences et techniques médicales mises en œuvre pour la réalisation des interventions (personnel hautement qualifié, et plateau technique de bloc opératoire et d'imagerie de pointe).

Une évaluation clinique quotidienne sera réalisée et des critères d'arrêt mis en œuvre pour assurer le bien-être des animaux. Tous les actes de chirurgies et les mesures de prise en charge complète de la douleur ont été validées par une équipe de vétérinaires et d'experts chargés du bien-être animal.

5745. Le traumatisme crânien (TC) grave est l'une des premières causes de mortalité chez les adultes jeunes. Actuellement, il existe seulement des thérapeutiques symptomatiques concernant la prise en charge des patients ayant subi un TC. Le manque d'oxygène au niveau cérébral est un facteur indépendant de mortalité après un traumatisme crânien grave et les moyens thérapeutiques sont très limités.

L'objectif de notre étude est d'étudier les effets de différents neuroprotecteurs sur le métabolisme et l'oxygénation cérébrale, évalués à l'aide d'un monitoring multimodal, dans un modèle expérimental de traumatisme crânien diffus chez l'animal. Nous analyserons également le devenir neurocomportemental par des tests spécifiques afin d'évaluer l'effet des différents neuroprotecteurs sur le devenir neurologique des animaux.

Design: L'étude comportera 4 groupes de rats Wistar mâles (350-500g). Deux groupes de rats subiront un traumatisme crânien expérimental et recevront soit un placebo soit la molécule neuroprotectrice (TC-placebo et TC-neuroprotecteur). Cinq molécules différentes seront étudiées au cours de ce projet. Deux groupes de rats non traumatisés recevront les mêmes traitements (sham-placebo et sham-neuroprotecteur). Les quatre groupes d'animaux seront au préalable placés sous anesthésie générale avant le début de la procédure afin de réduire la douleur et le stress engendré par l'équipement de monitoring et le traumatisme crânien pour les rats traumatisés. L'imagerie comportera des séquences IRM de diffusion, d'étude de la saturation tissulaire en oxygène et du débit sanguin cérébral. Les rats seront ensuite réveillés à la fin de la première série d'expériences et étudiés aux 7ème et 15ème jours du traumatisme par des tests neurocomportementaux. Les animaux seront ensuite sacrifiés à la fin des tests, afin de réaliser sur les cerveaux prélevés une étude histologique et en microscopie électronique.

Hypothèse principale : L'administration de molécule neuroprotectrice à la phase aigüe d'un TC améliore l'œdème cérébral et l'oxygénation tissulaire et améliore ensuite le devenir neurocomportemental des animaux après le TC.

Lors des différentes étapes du protocole, les animaux seront manipulés et surveillés minutieusement par des expérimentateurs habilités et compétents. Le nombre d'animaux utilisés pour ce projet sera de 600 rats sur 5 ans, à raison d'une drogue neuroprotectrice testée par an et avec une analyse IRM et des tests comportementaux, afin de conserver un volume d'animaux limité chaque année.

Ce projet respecte la règle des 3R.

- Nous avons effectué une recherche approfondie sur Pubmed et Google Scholar afin de nous assurer de l'inexistence d'approches alternatives *in vitro*, pharmacologique ou informatique qui pourraient être utilisées pour reproduire les effets d'un traumatisme crânien. En effet les méthodes *in vitro* basées sur la culture cellulaire ne présentent pas la complexité du fonctionnement cérébral après un traumatisme crânien.

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

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

5746. L'addiction est un problème de santé publique majeur, avec des impacts multiples : sanitaires, médicaux et sociaux. Elle peut concerner les substances illicites (cannabis, héroïne, cocaïne...), l'alcool, le jeu, les compulsions alimentaires ou le sexe notamment. Elle est la cause de 100 000 décès par an en France et est responsable de 30% de la mortalité prématurée (avant 65 ans). La cocaïne est la substance illicite la plus consommée en France après le cannabis, dans des milieux sociaux larges et hétérogènes. Sa consommation entraîne des complications physiques et est à l'origine de pratiques à risque (liées au partage de matériel). Ces risques sanitaires suscitent une inquiétude croissante liée à la tendance à la hausse de l'usage récréatif de cocaïne.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de thérapeutique satisfaisante pour traiter l'addiction à cette drogue. L'objet de nos recherches est de proposer une stratégie chirurgicale de stimulation cérébrale profonde, déjà utilisée pour traiter les patients Parkinsoniens ou présentant des troubles obsessionnels compulsifs, comme thérapeutique. Des premières études menées chez le rongeur se sont avérées prometteuses. Cependant, il est éthiquement indispensable de reproduire les résultats obtenus chez le primate non humain avant l'application à l'homme. Le modèle utilisé est le macaque, il a été choisi pour la proximité phylogénétique et anatomo-fonctionnelle du cerveau du macaque avec celui de l'homme, par rapport au rongeur. Le projet soumis ici concerne une procédure d'imagerie isotopique (tomographie par émission de positrons) qui permet l'étude *in vivo* de processus biologiques, ici, la compréhension des mécanismes fonctionnels sous-tendant l'efficacité de la stimulation pour diminuer la motivation pour la cocaïne, de façon très peu invasive (raffinement). De plus, elle permet d'obtenir des résultats pertinents sur un échantillon réduit d'animaux (réduction). Dans cette étude, 5 animaux seront testés de manière longitudinale.

5747. Notre projet de recherche vise à améliorer la compréhension des interactions potentielles entre la prise d'un complément alimentaire : une micro-algue (*Arthrospira platensis* ou spiruline) et l'exercice physique aigu ou chronique dans un modèle animal atteint de dysfonctions métaboliques. En effet, le diabète (maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique) est reconnu comme un problème de santé publique avec une augmentation croissante des populations concernées. Cette maladie chronique est caractérisée par un contexte de stress oxydant, d'inflammation et de dysfonctionnements liés à une hormone appelée insuline. La prise en charge de ces populations repose en grande partie sur la mise en place de thérapies non médicamenteuses alliant la nutrition et l'activité physique. De plus, l'offre de compléments alimentaires pour ces populations diabétiques se développe fortement. Depuis quelques temps, la spiruline est mise en lumière de par sa composition, sa richesse en acides aminés, en vitamines et minéraux et ses propriétés biologiques. En effet, elle est connue pour être antioxydante, anti-inflammatoire et améliorant les effets de l'insuline. Malgré tout, les interactions entre ce complément alimentaire et l'exercice physique sont largement méconnues.

Notre objectif est donc de voir dans un modèle de rat diabétique, si l'adjonction de spiruline est susceptible de potentialiser les effets de l'exercice aigu ou chronique sur la performance, la récupération et les mécanismes physiologiques en lien avec ceux-ci.

Pour se faire, sur la base de notre expérience antérieure et du calcul statistique d'effectif, nous avons besoin de 120 animaux au total, répartis en fonction de la complémentation en spiruline ou non (spiruline, placebo), réalisant ou non l'exercice ou l'entraînement (Ex, NEx, E, NE) et le temps post- exercice (T0 ou T24h) pour juger de la récupération lors de l'exercice isolé. Le nombre d'animaux par groupe a été déterminé à 10.

Pour atteindre ces objectifs, nous ne pouvons utiliser que des modèles *in vivo* où des rats sont complémentés ou non avec de la spiruline (micro-algue utilisée comme complément alimentaire). Le choix d'utiliser de la spiruline se justifie quant à lui par ses propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et améliorant la sensibilité à l'insuline.

Les choix d'exercice sont justifiés par rapport aux recommandations d'activités physiques chez les sujets diabétiques

Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour étudier les interactions de la spiruline avec l'exercice physique sur des variables physiologiques. Il n'existe pas à notre connaissance de modèles *in vitro* susceptibles de répondre à nos questionnements.

Réduire : Le schéma expérimental et le traitement statistique des données permettront de répondre aux objectifs scientifiques tout en limitant le nombre d'animaux.

Raffiner : L'hébergement et la manipulation des rongeurs seront respectueux du bien-être des animaux et un suivi régulier du comportement des animaux sera mis en place pour détecter le plus rapidement possible tout signe de souffrance ou de douleur. Les prélèvements d'échantillons seront accompagnés d'une anesthésie et/ou d'une analgésie si besoin et des points limites adaptés ont été définis afin d'éviter ou d'atténuer au maximum toute forme de souffrance potentielle des animaux.

5748. Il est courant de se tourner vers une nourriture calorique pour apaiser les tensions émotionnelles en réponse à un stress ou à des émotions désagréables. Cette attitude de recours à l'« aliment-réconfort » génère parfois une culpabilité qui peut renforcer encore l'inconfort émotionnel, ce qui peut mener à manger toujours plus. Etant donné la disponibilité et variété actuelles d'aliments riches en calories, cette spirale peut mener à l'établissement du surpoids ou même de l'obésité.

Les mécanismes et les causes de cette spirale sont peu connus, mais impliquent nombre d'acteurs au niveau du système digestif, siège de la synthèse de médiateurs de la prise alimentaire, et au niveau du cerveau, qui reçoit ces messages. Dans le dialogue intestin-cerveau, le microbiote intestinal, ensemble des espèces bactériennes, fongiques et virales présentes dans le système digestif, joue un rôle de plus en plus avéré. Le microbiote est à l'origine de la synthèse de divers métabolites, ou molécules protéiques et lipidiques qui empruntent les voies nerveuses et/ou circulatoires jusqu'au système nerveux central. Cet ensemble de signaux est alors capable d'engendrer de multiples effets, certains régissant la prise alimentaire.

Si la prédisposition au recours à l'aliment-réconfort chez l'Homme peut avoir de multiples origines (génétiques, environnementales, culturelles etc.), l'implication de la composition du microbiote n'a jamais été envisagée. A l'aide d'un modèle animal expérimental, nous évaluerons donc ici la contribution des microbes intestinaux.

Pour cela, nous soumettrons des souris à un protocole de stress chronique modéré (SCM) et leur proposerons, à l'issue d'un évènement stressant (ex : contention), un aliment appétant et riche en calories. Nous distinguerons celles qui ont recours de manière intense à cet aliment (gros mangeurs émotionnels, GME) ou celles qui n'y ont pas recours (petits mangeurs émotionnels, PME). Nous comparerons la répartition des GME et PME chez deux groupes de 40 souris, les unes ayant leur microbiote naturel (conventionnelles) et les autres en étant dépourvues (axéniques). Nous conclurons à un rôle possible du microbiote intestinal si la répartition des GME et des PME diffère de façon significative entre ces deux groupes. Pour le prouver, les microbiotes intestinaux des GME et PME conventionnels seront administrés à des souris axéniques. Le comportement alimentaire de ces animaux sera alors examiné de la même façon que précédemment, de façon à déterminer si ce transfert reproduit les caractéristiques des animaux donneurs.

Le protocole de SCM est couramment utilisé au laboratoire et nous avons constaté qu'il induit chez les animaux un stress modéré sans douleur associée.

La première partie de l'expérimentation comporte 2 lots de 40 souris chacun (axéniques et conventionnelles). Ce nombre est le minimum nécessaire pour l'analyse des résultats et l'exploitation ultérieure. Si la deuxième partie est réalisée, elle comportera trente souris axéniques qui recevront des pools de microbiotes de 5 PME ou 5 GME (15 souris/pool). Au total, 110 souris seront nécessaires.

Seule l'utilisation d'animaux permet d'étudier les interactions complexes entre un microbiote intestinal particulier, le fonctionnement de l'axe intestin-cerveau et la survenue de troubles alimentaires. Pour les besoins de mesure de la prise alimentaire, les souris seront hébergées en cages individuelles transparentes leur permettant de se voir. Leurs états de santé et de bien-être seront évalués quotidiennement. L'ensemble des soins donnés aux souris visera à satisfaire le mieux possible leurs besoins physiologiques et comportementaux, conformément à la législation

5749. La sclérose en plaques est une maladie auto-immune qui touche un individu sur 1000. Cette pathologie se manifeste par des lésions du système nerveux central, qui conduisent à des troubles moteurs et cognitifs graves. La sclérose en plaques repose sur une attaque du système immunitaire dirigée contre la gaine de myéline qui entoure les axones du système nerveux central. Les lésions induites conduisent à une démyélinisation et à une dégénérescence des axones. Malgré de nombreuses avancées en recherche, aucune thérapie ne permet aujourd'hui de guérir de la sclérose en plaques. Les traitements actuels visent surtout à ralentir l'évolution de la pathologie et à soulager les patients des symptômes associés. Ils reposent notamment sur l'utilisation d'immunomodulateurs et d'immunosuppresseurs non spécifiques. L'objectif de ce projet est de mettre en place une stratégie efficace pour traiter et/ou prévenir la sclérose en plaques, et qui soit uniquement spécifique de cette pathologie. Pour cela, nous emploierons des modèles expérimentaux murins et nous testerons des peptides spécifiques. Le projet permettra également de comprendre les mécanismes d'action sous-jacents. Pour remplir l'objectif du projet, nous utiliserons un mode d'administration thérapeutique innovant, non invasif et sûr, décrit ultérieurement.

Dans le cadre de ce projet, nous appliquerons la règle des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement).

- Remplacement : Seule une approche expérimentale *in vivo* permet de rendre compte de la complexité des systèmes biologiques. Dans notre projet, nous aurons recours à des souris. Le modèle murin est le modèle le plus largement décrit et employé au sein de la communauté scientifique pour étudier la sclérose en plaques.

- Raffinement : Plusieurs mesures seront mises en place afin d'assurer le bien-être des animaux. Les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles et dans des conditions d'hébergement enrichis (ajout de papier cartonné permettant la nidification et de maisonnette dans les cages ainsi que de la musique dans la salle d'hébergement). Une surveillance quotidienne de tous les animaux sera réalisée. Toutes les observations seront consignées dans des tableaux d'observation manuscrits, insérés au rapport d'étude. De plus, une gestion précise de l'anesthésie/analgésie est étudiée pour chaque procédure expérimentale en vue d'optimiser le bien-être animal. Des points limites quantitatifs, spécifiques aux procédures, ont également été établis pour l'ensemble des procédures expérimentales.

- Réduction : Le nombre d'animaux prévu dans cette étude s'élève au maximum à 2660 souris. Ce nombre repose sur une analyse approfondie de la littérature scientifique pour optimiser les approches expérimentales ainsi que sur des analyses de puissance statistique de manière à utiliser le moins de souris possible. Ce nombre est également justifié par la nécessité de générer des mesures nous permettant de réaliser des analyses statistiques robustes, ce qui nous permettra de valider ou non l'efficacité du traitement.

5750. L'insuffisance cardiaque (IC) est une des principales causes de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. Compte tenu du vieillissement de notre population et de la prévalence des maladies telles que le diabète et l'hypertension qui prédisposent les patients à ce syndrome, l'IC va augmenter dans la prochaine décennie. Les traitements actuels ralentissent sa progression. Néanmoins il reste un réel besoin de développer de nouvelles thérapies et donc la mise en place de modèles expérimentaux appropriés.

Le recours à l'animal est inévitable dans l'étude d'une maladie aussi complexe qui affecte également d'autres organes que le cœur (les reins, le système nerveux, le système hormonal). Les interactions complexes entre ces organes, qui jouent un rôle majeur dans le développement de la pathologie, ne peuvent pas être reproduites de manière adéquate avec des cellules isolées ou des simulations informatiques.

Dans ce projet, l'espèce retenue est le chien du fait des fortes similitudes de son système cardiovasculaire avec celui de l'homme. La stratégie d'étude consiste, dans un premier temps, à étudier les effets des nouveaux produits sur des cardiomyocytes isolés, ces études *in vitro* permettant d'étudier les mécanismes d'action cellulaire puis, dans un second temps, à caractériser leurs effets cardiovasculaires en utilisant la télémétrie et l'échographie puis de tester leur efficacité dans un modèle physiopathologique d'IC

dont la prédictibilité a été démontrée pour des médicaments actuellement utilisés. Les études réalisées au sein du Centre de Recherche sont encadrées par des consignes établies et validées par le Comité d'Éthique, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (l'hébergement, les soins, la manipulation, les expérimentations) et ayant toutes pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal. Ainsi, l'hébergement en meute est privilégié, l'évaluation des paramètres cardiovasculaires se fait avec des moyens peu contraignants (télémétrie, échographie) et des critères d'arrêt sont définis et appliqués lors du suivi de la pathologie induite du modèle d'IC. Par ailleurs, chaque procédure impliquant l'utilisation d'un animal est soumise à l'approbation du Comité d'Éthique, avant toute intégration des animaux dans les études. Un support en biostatistique est apporté pour l'élaboration des designs expérimentaux avec optimisation du nombre d'animaux utilisés et pour effectuer ou revoir les analyses statistiques. Enfin, les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, à l'observation des signes cliniques fondamentaux et à la mise en œuvre des procédures expérimentales.

Étant donnée la complexité du projet, seules les molécules très avancées pourront être testées ce qui limitera le nombre d'études et nous estimons que nous allons utiliser un total maximal de 300 chiens sur 5 ans, avec pour certaines procédures des réutilisations possibles après une période de récupération et avis favorable du vétérinaire en accord avec les principes de réutilisation indiqués dans la réglementation.

5751. Notre projet a pour but de caractériser les mécanismes impliqués dans la différenciation cellulaire des cellules souches hématopoïétiques (CSH), et notamment les mécanismes clés dont la perturbation peut conduire à une différenciation anormale aboutissant à l'émergence de cellules leucémiques.

Notre équipe de recherche est notamment spécialisée dans l'étude des mécanismes de régulation épigénétique qui affectent la destinée et la transformation cellulaires.

Notre objectif principal est d'identifier un réseau de régulations impliquant des facteurs de transcription et des facteurs épigénétiques afin de mieux comprendre comment ces interactions peuvent conduire au développement pathologique du système hématopoïétique. Nous étudions le rôle d'un facteur de transcription, PLZF (pour « promyelocytic leukemia zinc finger »), impliqué dans l'une des principales translocations retrouvées dans les leucémies. L'activité de PLZF semble avoir un rôle important dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des CSH, et elle apparaît très liée à la régulation épigénétique médiée par le groupe de protéines polycomb connues pour réguler l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes.

L'approche expérimentale que nous développons repose sur l'étude de l'hématopoïèse normale et pathologique et se répartira comme suit:

1- L'étude de l'hématopoïèse chez des souris mutantes pour le facteur de transcription PLZF (souris *Zbtb16lu/lu*) afin d'étudier le rôle de PLZF dans le devenir des CSH. Dans certains cas, l'utilisation de transferts adoptifs de cellules souches hématopoïétiques mutées pour PLZF chez des souris receveuses irradiées pourra être préférée.

2- L'étude de la réponse des CSH à un stress induit par différentes molécules dans ce modèle *Zbtb16lu/lu*.

3- L'étude de l'effet de la mutation *Zbtb16lu/lu* sur l'hématopoïèse de souris susceptibles au développement tumoral car porteuses d'une mutation KO du gène *p16* (modèle double mutant *Ink4a-/- Zbtb16lu/lu*).

4- L'étude du rôle d'un biomarqueur épigénétique sur la physiopathologie des leucémies aigües myéloblastiques humaines via l'établissement de xénotreffes dans des souris immunodéficientes NSG, suivi de traitements par des épigénétiques.

Le nombre d'animaux prévus dans le projet comprend deux volets :

- la stabulation, le backcross et l'intercross des lignées de souris mutantes ou génétiquement modifiées afin de générer les animaux nécessaires aux expériences.

- l'utilisation des animaux mutants ou génétiquement modifiés et des souris contrôles qui rentreront dans les procédures expérimentales.

Le nombre d'animaux est estimé à 1296 sur quatre ans. L'hébergement des animaux se fait en confinement adapté en cages individuellement ventilées à raison de 3 à 5 souris par cage. La nourriture et l'eau sont fournies *ad libitum*. L'environnement est enrichi par ajout de coton et de copeaux compressés utiles à la nidification.

Afin de respecter au mieux les exigences de remplacement, réduction et raffinement, l'utilisation du modèle NSG sera restreinte à la greffe d'échantillons de patients pour lesquels les paramètres de prise de greffe et d'évolution tumorale sont connus. Le suivi du développement des pathologies se fera par des mesures cinétiques précoces et prédictives, notamment par le suivi des formules sanguines grâce aux appareils dédiés à l'hématologie vétérinaire disponibles au sein de l'animalerie. Par ailleurs, bien que le recours aux modèles murins soit rendu nécessaire par l'existence reconnue de mécanismes de régulation de la cellule souche hématopoïétique normale ou leucémique par le microenvironnement, nous nous attacherons à développer et valider des approches de co-cultures leuco-stromales *in vitro* afin de modéliser ce dialogue permanent. Par cette approche, nous espérons remplacer certaines expériences *in vivo* et réduire ainsi le nombre d'animaux.

Dans le souci du respect du bien-être animal, les animaux font l'objet d'une surveillance quotidienne permettant de s'assurer des conditions adéquates de stabulation et de l'état de santé des animaux.

5752. Le projet a pour but d'évaluer l'efficacité par épreuve de candidats médicaments destinés à l'espèce porcine.

Pour qu'un médicament soit commercialisé, il faut démontrer que celui-ci apporte un bilan risques/bénéfices favorable pour une ou plusieurs pathologies. Les études nécessaires comprennent, entre autres, des études menées sur les animaux.

Ces études sont réalisées sur l'espèce cible du produit développé (ici l'espèce porcine) ou sensible à la (aux) souche(s) utilisée(s), ce qui permet de s'approcher, au maximum, des conditions réelles d'utilisation. Ces études sont exigées par la Pharmacopée Européenne et les réglementations nationales et internationales concernant les vaccins.

Pour démontrer l'efficacité d'un médicament contre un agent pathogène, la mise au point d'un modèle d'épreuve est indispensable. L'épreuve correspond à l'administration de l'agent pathogène pour reproduire de manière expérimentale et le plus fidèlement possible, les conditions réelles de développement de la pathologie.

Pour certaines pathologies, une étude d'amplification *in vivo* de la souche d'épreuve chez les porcs peut être nécessaire pour obtenir une souche utilisable dans une épreuve expérimentale.

Avantages/dommages :

La finalité de ces études est la mise au point de médicaments d'un niveau d'efficacité satisfaisant. Ceux-ci sont essentiels en élevage afin de protéger les animaux contre les maladies infectieuses et garantir les performances zootechniques et économiques.

Le développement de la maladie chez l'animal peut donner lieu à des signes cliniques. C'est pourquoi, des points limites spécifiques aux pathologies sont appliqués. De plus, l'administration du pathogène et les prélèvements peuvent également générer du stress et une gêne. Pour limiter les contraintes induites par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés.

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur l'historique des substances testées, les exigences réglementaires et sur les projets Recherche et Développement (R&D) existants et à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé, au plus, à 4100 porcs.

Mise en œuvre des 3R's :

Remplacement : Lorsque cela est possible, une première étape dans le projet de développement d'un vaccin consiste à tester *in vitro* différents candidats. Ceci permet une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

Un recueil d'informations est également apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

Le recours à l'espèce cible est, à l'heure actuelle, indispensable, afin d'observer le plus fidèlement possible, les effets sur les espèces qui pourront bénéficier de ces traitements.

Réduction : Concernant les études réglementaires, le nombre minimal d'animaux à inclure est fixé par les textes. En amont, lors des phases recherche, les effectifs sont évalués au plus juste (historique, définition des objectifs, tests statistiques de puissance...) de façon à limiter le nombre d'animaux utilisés et les études non conclusives.

Raffinement :

Des points limites spécifiques aux pathologies ont été définis afin de limiter le plus précocement possible une dégradation de l'état général des animaux. Ces critères sont en constante évolution de manière à ce qu'ils reflètent au mieux l'expérience du terrain et l'état actuel des connaissances vétérinaires.

Le personnel est également formé et compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans son état physiologique optimal. Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux afin de maximiser leur confort et leur bien-être. Les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements du milieu sont installés dans les hébergements. La Structure en charge du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

5753. 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.

Pour cela nous utiliserons des modèles expérimentaux les plus prédictifs possible afin de mimer les pathologies humaines. Chez des souris, des cellules cancéreuses seront greffées sous la peau, ou directement dans la glande mammaire pour mieux simuler l'environnement originel du cancer. Les animaux seront ensuite traités avec les nouveaux agents d'imagerie diagnostique et thérapeutiques. Les animaux seront suivis individuellement.

Au cours de nos travaux, 2 types d'études seront réalisées :

1°) Etude pharmacocinétique / de biodistribution : cette stratégie permet de suivre une molécule dans l'organisme y ajoutant une molécule « signal » permettant sa détection (radioactivité ou fluorescence) par un examen non invasif d'imagerie. Cette technique peut être répétée chez le même animal pour suivre la molécule d'intérêt, vérifier si elle se lie bien à tumeur et la façon dont elle est éliminée.

2°) Etude thérapeutique : ce type d'étude permet d'évaluer dans le temps l'efficacité d'un traitement en suivant l'évolution d'un traceur d'imagerie tumorale ou en injectant un traitement marqué par une molécule radioactive (curi-thérapie) qui pourra être détectée par imagerie mais également avoir une action curative. 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. 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 soit réduite.

Environ 10 études sont réalisées chaque année. Dans chacune, nous formerons 2 à 5 groupes de 10 animaux, soit environ 400 animaux par an et 2000 sur 5 ans.

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). 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 réduisant l'inconfort potentiel à son minimum et permettant ainsi le raffinement de l'étude.

5754. Chaque année, 4600 cancers de l'ovaire sont diagnostiqués. Ce cancer présente un pronostic sombre avec une espérance de vie à quelques mois notamment en cas de récurrence. La propagation de ce cancer est principalement intra-abdominale, avec présence de nodules tumoraux sur le tissu protégeant les organes de l'abdomen, appelé péritoine. Dans la majorité des cas, le cancer de l'ovaire est diagnostiqué lorsque la tumeur s'est déjà propagée sur le péritoine : carcinose péritonéale. Le traitement de référence associe une chirurgie et une chimiothérapie. Cependant, la plupart des patientes récidivent. Hors, l'efficacité de la chimiothérapie diminue en cas de récurrence et la chirurgie n'est pas réalisable. Les possibilités de traitement deviennent très minces.

La maladie cancéreuse ovarienne étant souvent confinée à la cavité abdominale, elle est la cible idéale pour l'administration intra-abdominale de chimiothérapie. Depuis quelques années, une technique appelée Chimiothérapie Intra Péritonéale Pressurisée en Aérosol (ou PIPAC) est développée en Allemagne. Elle consiste à nébuliser de la chimiothérapie directement sur les nodules tumoraux dans l'abdomen sous anesthésie générale via un orifice de 1 cm dans la paroi abdominale. Les avantages de cette technique seraient une plus grande efficacité de la chimiothérapie par application directe sur les nodules avec une tolérance meilleure au traitement puisque le médicament ne passe pas par le sang.

Le PIPAC est une technique qui n'existe pas en France à ce jour. Elle est innovante et prometteuse dans le domaine du cancer de l'ovaire.

L'objectif de notre étude est d'évaluer la PIPAC chez la brebis.

Le produit testé est un traitement anti-cancéreux (ou chimiothérapie) utilisé en routine par voie sanguine dans le cancer de l'ovaire. Il agit sur la vascularisation de la tumeur par un effet inhibiteur du facteur de vascularisation VEGF. Ce facteur est par ailleurs aussi impliqué dans les processus de cicatrisation de plaies et c'est pourquoi son effet sera testé non pas sur une tumeur (douloureuse et difficile à induire) mais sur un processus de cicatrisation.

Pour cela, nous allons créer un modèle animal de scarification péritonéale. La scarification péritonéale consiste en la réalisation d'une plaie du péritoine de manière standardisée concernant la taille et la localisation dans l'abdomen. Elle est faite sous anesthésie générale, par cœlioscopie (intervention chirurgicale nécessitant seulement 4 incisions de 5 à 10mm). La création de ce modèle animal permettra de comparer la qualité de cicatrisation selon le traitement administré. Le médicament sera administré selon différents protocoles dans le même temps que la scarification péritonéale.

L'évaluation de la cicatrice sera faite 14 jours après la scarification, après sacrifice de la brebis. Elle sera faite à ventre ouvert, par l'aspect visuel de la cicatrice mais aussi par des prélèvements permettant une analyse microscopique du tissu péritonéal et des dosages biologiques dans le liquide présent dans l'abdomen.

Notre étude permettra tout d'abord de créer un modèle de PIPAC chez le grand animal qui offrira par la suite la possibilité de tester un nombre important de médicaments par PIPAC, qu'il s'agisse de traitements anti-cancéreux ou d'autres classes de médicaments. De plus, ce travail permettra d'évaluer la tolérance et l'effet du bevacizumab (ou toute autre molécule utilisée contre le cancer de l'ovaire) par PIPAC, méthode d'administration jamais réalisée à ce jour. Il pourrait être la première étape du développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique dans le cancer de l'ovaire.

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

Vingt-cinq brebis seront nécessaires:

Nous constituerons 5 groupes de brebis afin de tester les 5 protocoles différents. Chaque groupe sera constitué de 5 brebis. Les brebis seront hébergées en hébergement (bergerie) conventionnel, en groupe. Lors de la conception du protocole expérimental, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables sur la base d'études sur un modèle de scarification existant chez le lapin.

Toutes les brebis subiront une cœlioscopie sous anesthésie générale par voie gazeuse pour la réalisation de la scarification, associé à un protocole de traitement différent selon le groupe. Les 5 protocoles comparés seront: 1/ sans médicament, 2/ Médicament par PIPAC, 3/ Médicament par voie sanguine, 4/ médicament intra-abdominal par lavage simple, 5/ PIPAC sans médicament.

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

5755. L'utilisation d'immunosuppresseurs puissants à base d'anticorps polyclonaux est incontournable pour prévenir chaque année les rejets de greffes chez de nombreux patients, présentant notamment un profil d'hyper-immunisation. L'augmentation croissante du nombre de patients greffés (+ 7% entre 2014 et 2015, Plan Greffe - Agence de la Biomédecine) et en attente de greffe reste un enjeu majeur de santé publique.

Les anticorps polyclonaux thérapeutiques sont obtenus par purification de sérums immuns produits chez l'animal. Malgré l'amélioration du rendement de purification des sérums immuns pour en extraire les anticorps, le volume de sérum prélevé demeure le principal facteur limitant pour la production des médicaments en quantité suffisante pour les patients. A ce jour, il n'existe pas de méthode substitutive au recours à l'animal pour produire les anticorps polyclonaux.

Ce projet a pour objectif le raffinement des conditions de production *in vivo* d'anticorps polyclonaux chez le lapin. Pour ce faire, nous souhaitons évaluer l'impact sur le bien-être des animaux dans les conditions de production habituelles et déterminer

scientifiquement le volume de sang prélevé par lapin correspondant au meilleur compromis entre l'obligation de raffinement (bien-être animal) et l'obligation de réduction du nombre d'animaux utilisés.

Ce projet est mené dans le respect de la règle des 3R. Un support en biostatistiques est apporté par des experts de la spécialité, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées, et de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les expérimentateurs sont formés aux gestes techniques en lien avec l'animal et à l'observation des signes cliniques chez le lapin.

Ce projet nécessite l'utilisation d'un maximum de 150 lapins sur 1 an.

5756. Ce projet a pour objectif d'être en adéquation aux exigences réglementaires du dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour la fabrication d'un vaccin commercial destiné aux chiens. Le but est d'effectuer l'amplification chez le chien (seule espèce sensible) des parasites nécessaires à la constitution du principe actif du vaccin, étape incontournable pour obtenir le vaccin, toutes les autres étapes étant *in vitro*. Pour permettre le développement du parasite sur l'animal, une première étape consiste à l'ablation de la rate pour rendre le chien plus sensible aux parasites.

Evaluation avantages et dommages :

Les animaux peuvent présenter une légère augmentation de stress due à l'anesthésie, à l'opération (ablation de la rate) ainsi qu'aux injections et aux manipulations.

Lors de l'amplification *in vivo* des parasites, certains chiens peuvent exprimer des signes cliniques qui sont éventuellement associés à une douleur modérée.

L'avantage est que cette étape *in vivo* permet d'initier la production d'un nombre important de doses de vaccins améliorant considérablement la santé et le confort des animaux de compagnie ainsi que des propriétaires.

Informations sur les espèces utilisées :

Pour produire le nombre nécessaire de doses de vaccins sur le marché des animaux de compagnie : jusqu'à 15 chiens seront nécessaires sur 5 ans. Les nombres utilisés varient d'année en année et en fonction du nombre de lots de vaccins à produire.

Mise en avant des 3R :

Remplacement : la production du principe actif de ce vaccin nécessite des parasites. Le développement est possible uniquement sur un modèle *in vivo*. Toutes les autres étapes de production du vaccin sont *in vitro*.

Réduire : un seul chien est utilisé, il n'y a pas davantage de réduction possible.

Raffinement : L'ablation de la rate se déroule sous anesthésie, avec du personnel compétent en chirurgie et un suivi pré et post-opératoire rapproché.

Lors de la phase d'amplification *in vivo* des parasites, certains animaux peuvent déclencher des symptômes. Dans ce cas, des points limites spécifiques à la pathologie sont appliqués. Dans tous les cas, l'animal est euthanasié dès l'apparition de la parasitémie minimale attendue, associée ou non à la présence de signes cliniques moyens. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort.

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

Des enrichissements du milieu ont été mis en place dans les hébergements. La Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

5757. Etudes réglementaires de toxicité générale, cancérogénèse et de toxicocinétique et études supports à celles-ci chez la souris
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. De plus l'utilisation de 2 espèces rongeurs dans les études de cancérogénèse est exigée par les réglementations nationales et internationales pour l'enregistrement de certains nouveaux médicaments humains. Ces études, pour la majorité d'entre elles doivent 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. L'évaluation de la toxicité des résidus de produits vétérinaires requiert en général l'utilisation d'une seule espèce. Le choix de cette espèce (souvent rat, souris ou chien) est dicté par les réglementations nationales, internationales et dépend en général de la façon dont est métabolisé le produit dans les différentes espèces.

Ce projet couvre les études réglementaires de toxicologie, cancérogénèse et de toxicocinétique telles que définies ci-dessus et réalisées chez la souris. Des études d'efficacité, de pharmacologie, de pharmacocinétique, toxicocinétique, d'interaction entre médicaments ou à des visées plus mécanistiques (ex : biomarqueurs) permettant de comprendre et prédire les effets toxiques, et de sélection des candidats médicaments/doses, sont aussi couvertes par cette demande. De même que l'utilisation des souris dans des études visant l'acquisition et le maintien des compétences techniques par le personnel assurant l'application des procédures expérimentales aux animaux, le développement de techniques et/ou de méthodes, la validation d'équipements et/ou la génération de données historiques. Certaines de ces études peuvent en outre viser à raffiner et réduire le recours à l'animal, voire de le remplacer dans l'avenir. Le nombre total d'animaux couverts par ce projet est 5000 sur une période de 5 ans (une cinquantaine d'études). La composition, le contenu et le déroulement des études réglementaires couvertes par ce projet sont précisées dans des lignes directrices internationales (OCDE, ICH, VICH, EMA, CPMP...) 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 souris des 2 sexes, d'environ 4 à 10 semaines d'âge en début d'études (et donc d'un poids approximatif entre 10 et 50 g)
- un nombre minimal d'animaux [généralement, 10 à 15 animaux/sexe/groupe et 4 groupes, soit 80 à 120 animaux par étude, ou pour des besoins spécifiques justifiés et des études chroniques (études des cancérogénèses), jusqu'à 750 par étude. Les études de cancérogénèse de durée d'environ 2 ans conduites généralement avec des souris CD1 comptent environ 56 animaux/sexe/groupe. Les études de cancérogénèse de durée d'environ 6 mois conduites sur des souris transgéniques hétérozygotes, exprimant le gène humain rasH2 ou knock-out pour le gène p53 comptent en général 27 animaux/sexe/groupe. Dans ces études, un groupe supplémentaire (groupe contrôle positif) incluant environ 12 animaux/sexe reçoit un carcinogène connu afin d'évaluer la stabilité du transgène dans les souris utilisées en étude, conformément aux recommandations de ILSI. Le nombre d'animaux inclus dans les études de toxicocinétique est défini par le volume de sang à prélever pour obtenir des données pertinentes d'exposition au produit(s) à tester et peut donc varier. Des sous-groupes d'animaux dédiés à l'évaluation toxicocinétique du produit à tester peuvent être inclus dans les études décrites ci-dessus.
- une durée (de un jour à deux ans),
- 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 (ex. nombre de souris 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 pas avoir 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. Le nombre d'animaux par groupe et le nombre des groupes sont définis par les lignes directrices internationales et limités aux besoins scientifiques. Les souris sont hébergées collectivement avec des enrichissements environnementaux tels que des nids de coton. Les animaux sont observés quotidiennement et des points limites pertinents et internationalement reconnus sont définis afin de rapidement prendre les dispositions appropriées afin d'éviter une souffrance des animaux. Le personnel en charge des gestes techniques décrits dans cette demande d'autorisation de projet a la formation, les compétences et l'expérience nécessaires pour reconnaître les signes d'inconfort, de souffrance ou de détresse et agir en conséquence en accord avec le directeur d'étude et/ou le vétérinaire responsable

5758. Dans le domaine médical, les anticorps monoclonaux (AcM) sont utilisés en thérapeutique et comme outils diagnostiques. Notre objectif est le développement des d'AcM de souris pour la fabrication de réactifs permettant le diagnostic des maladies infectieuses ou parasitaires. L'obtention de ces AcM nécessite l'immunisation de souris.

Les anticorps spécifiques peuvent être fabriqués en injectant (en immunisant) à plusieurs reprises un produit (antigène ou immunogène) à un animal (généralement : lapin ou chèvre ou mouton). On recueille ensuite le sérum qui contient des anticorps dits polyclonaux (AcP), car ils sont produits par différentes cellules (plasmocytes). Ces AcP reconnaissent les antigènes qui ont suscité leur production. Les problèmes majeurs des AcP sont (i) leur l'hétérogénéité et (ii) l'utilisation d'un grand nombre d'animaux pour l'obtention d'une grande quantité indispensable pour le développement des réactifs. Ces AcP peuvent être remplacés, pour certaines applications, par des AcM qui sont produits par exemple par des hybridomes murins (cellules "hybrides"). La technique des hybridomes consiste à injecter l'antigène à des souris. Après sélection d'une souris ("bonne répondeuse en Ac"), les cellules (plasmocytes ou lymphocytes B) de la rate sont fusionnées *in vitro* avec des cellules tumorales (myéломes), ayant la propriété de se multiplier indéfiniment. Les hybridomes sont sélectionnés puis multipliés *in vitro* dans un milieu de culture approprié pour la production illimitée et quantité importante des AcM.

La technique d'obtention des hybridomes et celle de leur culture *in vitro* sont donc des méthodes alternatives qui permettent l'application du principe des 3R. Elles permettent en effet de :

- Réduire le recours aux animaux pour l'immunisation. En effet le nombre de souris immunisées pour l'obtention d'un AcM est faible (7 souris par antigène pour notre projet). Après sélection des souris et l'obtention de l'hybridome immortalisé, la production d'AcM est illimitée. Par contre pour les AcP, les animaux (lapins, chèvres ou moutons) immunisés, sont saignés puis euthanasiés. Lorsque les lots de sérums ou les lots d'AcP obtenus sont épuisés, des nouveaux animaux doivent être immunisés.
- Supprimer le recours aux animaux pour la production massive des AcM en utilisant la culture *in vitro* des hybridomes.
- Améliorer ou diminuer les contraintes imposées aux animaux. Contrairement au temps d'immunisation (4 à 8 mois) et au nombre d'injections (8 à 16) nécessaires pour l'obtention des AcP, pour notre projet l'immunisation des souris pour les AcM sera de courte durée (1 mois) avec 4 injections. De plus l'immunisation sera réalisée avec des antigènes ne contenant pas de micro-organismes vivants. La douleur liée aux manifestations cliniques dues à une infection (ou infestation) sera donc absente. Cette immunisation sera effectuée en utilisant des adjuvants mieux tolérés par les souris que l'adjuvant de Freund complet (AFC).

Pour ce projet les souris seront donc utilisées uniquement pour l'obtention des lymphocytes qui permettront le développement des hybridomes qui seront utilisés pour une culture *in vitro* pour la production massive des AcM.

Pour ce projet 7 souris seront immunisées avec un antigène donné. Pour les 5 ans nos développements d'anticorps monoclonaux concerneront 26 microorganismes avec un total de 72 antigènes soit 504 souris à immuniser.

5759. Les acouphènes subjectifs (les sensations de bruit non liées à une source externe) sont souvent la conséquence d'une perte temporaire ou permanente de la fonction auditive (surdité). Ils causent de nombreuses gènes sévères avec un impact sur la qualité de vie des patients comme les perturbations de la fonction auditive, les déficits de sommeil, l'anxiété, la dépression et peuvent conduire jusqu'à la tentative de suicide.

Actuellement, aucun traitement ciblé et efficace n'est disponible pour les patients souffrant de telles pathologies. Nous travaillons à l'identification et au développement de traitements ciblés pour satisfaire ce besoin médical en santé publique. Ce projet répond aux demandes des autorités réglementaires liées au développement d'un composé déjà identifié mais aussi de futurs composés ayant une efficacité plus élevée et moins d'effets secondaires. Après avoir été testés dans des études *in vitro*, il est nécessaire que ces composés démontrent efficacité et sécurité *in vivo* chez l'animal avant passage chez l'homme. La capacité des candidats-médicaments à atteindre les cibles dans l'oreille interne et/ou le système nerveux central pour traiter les acouphènes ne peut être évaluée que chez l'animal avec un système auditif et un système nerveux central complet, capable de reproduire le fonctionnement et les symptômes observés chez le patient. De plus, pour soutenir le développement d'un candidat-médicament, il est nécessaire de bien établir la relation entre les doses efficaces et l'exposition au produit.

C'est pourquoi ce projet inclut 4 procédures : Les trois premières permettent de tester l'efficacité des candidats-médicaments sur les modèles pathologiques chez le rat, la dernière permet d'étudier la pharmacocinétique des candidats-médicaments chez le rat également. Il couvre l'utilisation d'au maximum 16176 animaux sur 4 ans. Les études réalisées au sein du centre de recherche, par du personnel formé et compétente, sont encadrées par des recommandations internes, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux ( thique, hébergement, soins, manipulation, expérimentations), et ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal (utilisation d'anesthésiques et d'antalgiques). Une analyse statistique en continue optimise les méthodes expérimentales employées, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés au strict nécessaire. Tous ces éléments assurent l'application maximale du principe des 3R.

5760. L'objectif de notre étude est de pouvoir développer une solution nutritionnelle (composé de vitamine E, d'arginine, de bêta-carotène et de nucléotides) permettant de soutenir les défenses immunitaires du chiot et des chatons et de renforcer leur réponse vaccinale. Nous nous sommes intéressés à quatre nutriments connus pour leurs propriétés immunomodulatrices et antioxydantes chez le chien et le chat ainsi que chez d'autres espèces animales. Pour des raisons de disponibilité des animaux, d'une part, et dans le but de minimiser les interventions et les prélèvements sur les chiots et les chatons, d'autre part, l'étude sera conduite dans un premier temps sur des animaux adultes afin d'évaluer l'effet de cette solution nutritionnelle sur la réponse immunitaire cellulaire (phénotypage, production de cytokines, prolifération cellulaire) et humorale ( valuation de la réponse vaccinale) ainsi que sur leur statut antioxydant.

Cette étude sera conduite tout d'abord sur des animaux adultes dans un but de minimiser les interventions, manipulations et prélèvements sanguins sur les chiots et les chatons qui sont beaucoup plus sensibles à la douleur.

Nous avons fait le choix de travailler sur un échantillon restreint (24 chats, d'une part, et 24 chiens, d'autre part) par rapport aux études antérieures publiées visant étudier l'effet de la nutrition sur la réponse immunitaire des chiots et des chatons. Cet échantillon est toutefois suffisamment représentatif d'un point de vue statistique (12 chiens et 12 chats par groupe) dans notre étude pour prétendre à un effet significatif de notre solution nutritionnelle sur au moins un des paramètres immunitaires évalués.

Finalement notre étude s'inscrit parfaitement dans une vraie démarche de respect de la règle des 3R (réduire, raffiner, replacer) en terme de réduction du nombre d'animaux, optimiser le nombre de prélèvements et d'interventions pour mesurer le maximum de paramètres physiologiques indispensables à l'étude (par exemple, un prélèvement sanguin réalisé sur un animal permettrait d'évaluer à la fois la prolifération cellulaire, le phénotypage, la production de cytokines, le suivi des titres d'anticorps post vaccination ainsi que la production de certains paramètres antioxydants). De plus, certains paramètres de la réponse immunitaire n'ont pas été intégrés dans nos protocoles expérimentaux puisqu'ils ont été évalués en parallèle dans une étude *in vitro* (par exemple, l'effet sur la phagocytose et la production de TNF-alpha et de NO ont été évalués sur des lignées cellulaires de macrophages) pour minimiser la manipulation des animaux.

Enfin, après la fin de l'étude, les animaux resteront au sein de l'établissement.

5761. Les oléoprotéagineux cultivés en France présentent un intérêt agronomique et économique en raison notamment du besoin de nouvelles têtes d'assolement et de la recherche de réduction d'intrants. Leur intérêt nutritionnel porte sur la qualité de leurs fractions protéique et lipidique. En effet, les profils en acides aminés des protéines des oléoprotéagineux varient principalement selon leur type botanique. Mais la valeur azot e de ces matières premières peut être pénalisée chez les ruminants par une forte dégradation des protéines dans le rumen. Cependant, cet inconvénient peut être levé par l'application de traitements technologiques, notamment les traitements mécaniques et thermiques comme l'extrusion. De plus, les lipides des oléagineux métropolitains sont riches en acides gras d'intérêt nutritionnel (oméga 3, acide oléique...), comparés notamment à l'huile de palme import e, riche en acide palmitique qui est un acide gras saturé (Tables INRA-AFZ, 2004). Ces profils en acides gras peuvent conduire à améliorer la qualité nutritionnelle des produits animaux à destination de l'alimentation humaine. Ainsi, le développement des productions métropolitaines d'oléoprotéagineux peut contribuer à améliorer la durabilité des systèmes agricoles, en particulier des élevages laitiers (réduction des importations, moindre utilisation d'engrais et de pesticides...), et à répondre aux attentes sociétales (utilisation de matières premières non OGM, qualité diététique des produits animaux, création d'emplois locaux...). L'objectif de ce projet est de mettre au point des traitements technologiques (mécaniques, extrusion, enzymatiques) des graines protéagineuses et oléagineuses, d'étudier l'utilisation digestive et métabolique de ces aliments traités par les ruminants laitiers, de déterminer l'empreinte environnementale (bilan azoté et émissions de méthane) des rations comportant ces graines traitées et d'étudier l'effet de l'apport

de ces protéines traitées sur la qualité du lait. Deux expérimentations, conformes aux directives européennes relatives au bien-être animal, se dérouleront en 2017 et 2018. - En 2017, un essai zootechnique sur 10 vaches laitières (2 carrés latins 4×4 sur 4 mois, 16 janvier – 06 mai 2017) pour caractériser les réponses animales (production, efficacité, qualité, rejets) aux aliments (ou combinaisons) les plus prometteurs issus des phases de screening réalisées en amont. - En 2018, un essai de digestion sur 5 vaches laitières fistulées du rumen et du duodénum, et le cas échéant de l'iléon (1 carré latin 4×4 sur 4 mois, janvier à mai 2018) pour approfondir *in vivo* les mécanismes digestifs avec les aliments (ou combinaisons) les plus pertinents choisis en fonction des phases de screening et/ou de l'essai zootechnique. Cette stratégie (screening de nombreuses combinaisons par les méthodes *in situ* et *in vitro*, puis essai zootechnique sur les 8 combinaisons les plus prometteuses suivi d'un essai de digestion sur les seules combinaisons pertinentes sur le plan pratique) est celle qui permet le mieux de satisfaire aux règles des 3 R. En effet, elle permet de réduire au maximum le recours aux animaux et de réduire le nombre d'animaux soumis à une forte pression de mesure. Cette stratégie permet toutefois d'acquérir un nombre de données *in vivo* suffisant pour évaluer les données obtenues lors des phases de screening par les approches alternatives. En effet, en raison de leur importante fraction rapidement dégradable, l'application aux graines protéagineuses des méthodes alternatives rend leur extrapolation *in vivo* délicate, ce qui rend l'utilisation d'animaux fistulés indispensable sur une partie du projet pour quantifier précisément les mécanismes digestifs mis en jeu. Des prélèvements de différents fluides (plasma, urine, lait) ou tissus périphériques (poils) seront également réalisés dans ces 2 études pour valider et/ou contribuer à la mise en place d'indicateurs périphériques du fonctionnement du rumen ou de l'efficacité d'utilisation de l'azote. La mesure des émissions de CH₄ sera également réalisée. Les schémas expérimentaux en carrés latins permettent également de réduire le nombre d'animaux utilisés (4 animaux au lieu de 16 pour un carré latin 4×4) et sont adaptés en terme statistique pour analyser l'utilisation digestive et métabolique de ces graines traitées. Les principales mesures seront : production et composition du lait, quantités ingérées, bilan azoté, digestibilité de la ration. Des analyses ponctuelles sur différentes matrices corporelles (sang, urine, fèces, contenu de rumen) seront réalisées parallèlement pour une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'efficacité digestive et métabolique des graines testées.

5762. L'exposition aux rayonnements ionisants à la suite d'un accident d'irradiation (accident dans une centrale nucléaire, manipulation d'une source radioactive...) ou d'un acte de malveillance peut engendrer des conséquences graves sur la santé des personnes impactées. En effet, l'irradiation d'une large surface du corps, à des doses d'irradiation moyennes à fortes, induit des lésions irréversibles regroupées sous le nom de syndrome aigu d'irradiation (SAI). Ce syndrome inclut des atteintes du compartiment sanguin, du système digestif, du système neuro-vasculaire et de la peau. A l'heure actuelle, les traitements ciblent préférentiellement le compartiment sanguin, et la prise en charge du syndrome gastro-intestinal (SGI) ne reste que symptomatique, alors que les diarrhées associées à ce syndrome peuvent engager le pronostic vital.

L'objectif de cette étude sera de développer une stratégie thérapeutique innovante afin de traiter le SGI dans le cadre d'une irradiation accidentelle. Cette étude vise particulièrement à apporter des preuves de concept précliniques sur l'utilisation de 3 types de produits cellulaires issus du tissu adipeux en tant que traitement du SGI.

Pour comprendre de manière intégrée et fiable ces mécanismes, nous devons utiliser des modèles expérimentaux précliniques *in vivo*, comme la souris, afin de démontrer des phénomènes à l'échelle d'un organisme entier.

Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 1240. Le nombre de souris choisi pour ce protocole est nécessaire et suffisant pour exploiter d'un point de vue statistique les résultats obtenus.

Dans le contexte du bien-être animal, le raffinement est assuré par le fait que ces animaux seront anesthésiés, prélevés et euthanasiés selon la réglementation en vigueur. Des points limites seront définis et appliqués tout au long des procédures expérimentales constituant ce projet.

5763. Le concept d'élevage à haute valeur environnementale, en cohérence avec la vision agro-écologique de l'élevage, devrait favoriser l'émergence de pratiques limitant les intrants et faisant de plus en plus appel aux capacités d'adaptation des animaux. Concernant les relations entre l'animal et son environnement alimentaire, le processus d'apprentissage est le processus majeur permettant à l'animal d'adapter son régime à ses besoins. Plusieurs études ont montré les capacités des ruminants à ajuster leur sélection afin de rectifier un déséquilibre alimentaire ou de limiter l'ingestion de composés toxiques. L'hypothèse est qu'ils seraient également capables d'ajuster leur sélection d'aliments afin de rectifier un état sanitaire affecté. Le parasitisme par les nématodes gastro-intestinaux (NGI) représente une contrainte majeure des systèmes d'élevage herbagers de petits ruminants (ovins, caprins). De plus, l'utilisation massive de ces molécules chimiques ces dernières décennies a entraîné le développement de résistance des populations de nématodes compromettant leur efficacité et laissant les éleveurs démunis pour maîtriser les charges parasitaires de leurs animaux. Parmi les solutions alternatives à l'usage systématique de ces molécules, l'utilisation de plantes fourragères riches en certains composés secondaires bioactifs tels que les tannins condensés aux propriétés anthelminthiques, suscite un intérêt croissant. C'est le modèle que nous avons choisi pour tester notre hypothèse de capacité d'automédication chez les petits ruminants. Dans cette étude nous allons comparer deux espèces de petits ruminants, les ovins et les caprins, qui partagent plusieurs espèces de NGI. Ceci n'a jamais été testé jusqu'à présent, et pourtant on s'attend à des différences entre ces deux espèces compte-tenu du fait (1) que les caprins, contrairement aux ovins, ne développent quasiment pas d'immunité contre les parasites avec le temps ce qui les rend plus vulnérables, (2) que les caprins, naturellement, par leur comportement alimentaire évitent la strate herbacée où se trouvent les larves infestantes, en consommant plutôt la strate arbustive, et (3) que les caprins sont plus confrontés aux composés secondaires largement présents dans les plantes ligneuses et plus enclins à consommer. Compte-tenu de ces différences, l'hypothèse est que le comportement d'automédication serait favorisé chez les caprins.

L'expérimentation durera 5 mois et utilisera 20 chevrettes et 20 agnelles récemment sevrées (1.5 mois d'âge). À l'âge de 2.5 mois, chaque groupe sera divisé en 2 lots de 10 individus, un des lots restant exempt de NGI durant toute l'expérimentation tandis que l'autre sera infesté expérimentalement avec *Haemonchus contortus*. L'effectif de 10 animaux par lot est le minimum nécessaire compte-tenu de la variabilité inter-individuelle concernant l'implantation et l'impact du parasite, ainsi que celle concernant les préférences alimentaires. Le parasite utilisé est une espèce très répandue et fréquemment rencontrée dans nos prairies, et qui est responsable de pertes de production importantes à l'échelle mondiale. Nous prenons ici la précaution que la souche utilisée soit modérément virulente et sensible aux traitements chimiques pour pouvoir soulager rapidement un animal qui se trouverait en souffrance vis-à-vis de son fardeau parasitaire. Après une période de développement parasitaire (35 jours), deux phases expérimentales se succéderont.

Lors de la phase 1 (4 semaines), les animaux des 4 lots auront le choix entre deux types de granulés de sainfoin différant par leur teneur en tannins (faible (T-) vs. élevée (T+)). Le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) est un fourrage légumineux qui contient des tannins condensés et qui a montré des effets anthelminthiques aux fortes concentrations en tannins. Le choix des animaux pour ces 2 types de granulés, au cours de cette phase 1, sera libre et sans contrainte (choix dit "en cafétéria"). Les granulés de sainfoin seront offerts aux animaux 7h / j sur 4 semaines de façon à leur laisser le temps d'expérimenter ces aliments et d'ajuster leur sélection alimentaire selon leur état parasitaire. Les granulés de sainfoin représenteront au minimum 70% de la ration qui sera complétée par du foin âgé ou de la paille, ainsi que des céréales pour maintenir un bon fonctionnement du rumen et assurer la croissance des animaux. Pendant cette phase, les animaux seront conduits en lots (n=10) et les ingestions individuelles seront mesurées grâce à un système automatisé de pesée des auges et de reconnaissance électronique individuelle.

Suite à la phase 1, nous testerons en phase 2 (2 semaines) la motivation des animaux pour consommer le granulé T+ en les confrontant à une situation de choix dit de "conditionnement opérant". Chaque agnelle et chaque chevrerie passera alors individuellement pendant 5 min dans une arène en "U" où l'accès du T+ sera contraint par une distance à parcourir. Nous proposerons 3 niveaux de récompense (quantité de granulé proposée à chaque déplacement), qui seront chacun testés 3 fois. La réussite de cette phase nécessitera un apprentissage préalable des conditions de tests pour que l'animal accepte de rester seul quelques minutes et qu'il comprenne le principe d'obtention du granulé. Cet apprentissage se fera dès le plus jeune âge (au sevrage) et pendant les 2 mois précédant le début de la phase 1. Un rappel sera fait après la phase 1 pour s'assurer que les animaux n'ont pas oublié le principe du test avant de débiter la phase 2. La phase 2 devrait se dérouler sur 9 jours de tests sur 2 semaines.

Sur l'ensemble de l'expérimentation, les animaux seront pesés chaque semaine afin de vérifier leur croissance et de contrôler leur état de santé en relation avec leur charge parasitaire. Les niveaux d'infestation et leurs conséquences sur les animaux seront contrôlés par des coproscopies et des prises de sang hebdomadaires qui nous permettront de rapidement identifier un animal qui supporterait mal l'infestation et qu'il conviendra de traiter avec un anthelminthique chimique. Également, les animaux seront surveillés quotidiennement par du personnel qualifié pour déceler tout changement anormal de comportement (comportement général, apathie, baisse d'ingestion).

5764. La douleur abdominale chronique rencontrée dans le syndrome de l'intestin irritable (SII) a des répercussions négatives sur la qualité de vie des patients. Les traitements médicamenteux actuels sont généralement inefficaces pour soulager ce type de douleur ou présentent d'importants effets indésirables. Par conséquent, un besoin d'innovation thérapeutique présentant un meilleur rapport bénéfice/risque est attendu. Afin de mimer cette pathologie nous avons développé un modèle chez la souris permettant de reproduire les symptômes douloureux. Nous proposons ici d'étudier l'implication des canaux Cav3.2 dans la douleur viscérale. Il s'agit de canaux calciques localisés sur la membrane de certains neurones. Pour cela nous mettrons en place deux stratégies complémentaires, une stratégie « génétique » en utilisant des souris génétiquement modifiées chez qui l'expression de Cav3.2 est inhibée et une seconde stratégie « pharmacologique » en utilisant des bloqueurs des Cav3.2. Nous évaluerons l'effet de ces 2 stratégies sur des souris présentant une douleur viscérale.

Ces travaux permettront d'apporter des connaissances nouvelles sur l'implication des Cav3.2 dans la douleur viscérale. Ceci permettra à terme la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à bloquer les Cav3.2 afin de soulager ce type de douleur.

Cette étude sera réalisée chez la souris mâle âgée de 8 semaines. Le nombre total d'animaux utilisés sur une période de 3 ans est estimé à environ 240 souris, ce dernier est justifié dans le dossier technique et répond à la fois à la règle des 3 R (remplacement, réduction, raffinement) et aux contraintes statistiques prenant en compte la variabilité des paramètres étudiés. Les animaux seront surveillés quotidiennement, si un animal présente une trop forte douleur (mesurée expérimentalement), un comportement stéréotypé ou anormal ou une posture anormale ou une réduction de poids de 20%, celui-ci sera euthanasié par le personnel de l'unité de stabulation animale. Afin d'améliorer les conditions d'hébergement des souris, un enrichissement du milieu sera mis en place par ajout de morceaux de carton et de coton dans les cages. Également, afin de diminuer le stress des animaux au moment du test comportemental et d'éviter les biais de réponse, une période d'habituation dans le système de contention est prévue. Les expérimentations seront effectuées de manière séquentielles, si les résultats vont à l'encontre de notre hypothèse, alors l'étude sera arrêtée.

5765. Nos précédents travaux ont permis de mettre en évidence l'effet bénéfique d'une association de 5 extraits de végétaux sur le métabolisme de souris diabétiques, à travers différents paramètres mesurés, tels que la glycémie, les tests de tolérance à l'insuline ou à l'amidon, le profil lipidique sérique ou la composition corporelle.

Toutefois, les mécanismes physiologiques qui sous-tendent ces adaptations positives restent à élucider.

Ce projet propose ainsi de combiner différentes conditions qui permettent l'activation de certains mécanismes qui nous permettront de mettre en lumière ceux qui sont impliqués.

La combinaison d'extraits de végétaux sera ainsi incorporée dans la nourriture des animaux sur une durée de 6 semaines. Le projet inclut 8 groupes de 14 souris diabétiques et 3 groupes de 16 souris saines.

Les procédures réalisées sur les animaux (pesée, composition corporelle, injection d'insuline, mesure de la glycémie à jeun) sont pour la plupart non-invasives et réalisées sans anesthésie car elles n'engendrent qu'un état de stress minimal.

Seule une étape du projet implique pour certains animaux leur détention en cages calorimétriques pendant une durée de 48h.

Le modèle de souris diabétique est particulièrement bien adapté à l'étude des syndromes du diabète, l'âge choisi correspond au début du développement du syndrome métabolique chez ce modèle. Le recours à un modèle *in vitro* n'est pas souhaitable car les modèles cellulaires de mimétisme du diabète de type 2 sont très incomplets et peu représentatifs du fonctionnement *in vivo*. Nous avons choisi de le compléter avec un modèle de souris saines nourries avec un régime riche en graisse afin de vérifier l'efficacité de la combinaison sur un modèle non-mutant.

Une justification statistique prédictive du nombre d'animaux nécessaire par groupe a été établie à partir de travaux similaires réalisés sur le même modèle, un minimum de 14 animaux par groupe est ainsi nécessaire pour mettre en évidence un résultat statistiquement significatif chez les souris diabétiques, un minimum de 16 est nécessaire chez les souris saines.

Une attention particulière sera prêtée au comportement des animaux par les expérimentateurs et la personne chargée du bien-être animal afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes de douleur chez l'animal, auquel cas ce dernier serait immédiatement sorti du protocole.

Un nombre maximal de 112 souris db/db et 48 souris saines seront utilisées pour ces travaux de recherche.

5766. Contexte scientifique: Le sens de l'équilibre est une fonction vitale pour la survie car il permet de manière réflexe, automatique, le maintien et la stabilisation d'une posture cohérente. Les organes de l'équilibre, appelés organes vestibulaires, sont localisés au niveau de l'oreille interne. Ils nous permettent de nous orienter dans l'espace et de distinguer nos mouvements propres et ceux de notre environnement, et ainsi de nous déplacer en toute sécurité. Lors de séjours dans l'espace, l'absence de gravité perturbe ces organes, ce qui est à l'origine de désorientations, d'illusions d'inversion et d'une forme de mal des transports : le mal de l'espace. Le sens de l'équilibre est capable de s'adapter à ces nouvelles conditions en quelques jours. De retour sur terre, le sens de l'équilibre revient à la normale après un temps d'adaptation plus ou moins long selon la durée du séjour dans l'espace.

Le but de nos expériences est de comprendre comment le sens de l'équilibre s'adapte lorsque les mammifères sont exposés à des changements de gravité. Il est très difficile de mener à bien ces expériences dans l'espace pour des questions de coût et d'accessibilité. Sur terre, il est impossible de supprimer la gravité. Afin d'étudier cette question nous utilisons un plateau à gravité augmentée. Les protocoles expérimentaux consistent donc à étudier comment les animaux s'adaptent à des transitions répétées entre des niveaux de gravité de 1G et 5G.

Objectifs de l'étude: nous explorons l'hypothèse d'un lien entre des processus inflammatoires et les capacités d'adaptation du système nerveux central des souris. Chez certains animaux, la présence d'immunoglobuline au niveau du cerveau suggère que l'hypergravité pourrait conduire à des processus inflammatoires que nous voulons corrélés à la qualité de l'adaptation/ réadaptation. Nous souhaitons en particulier tester des accélérations courtes mais de forte intensité mimant celles subies par l'organisme au cours de la mise en orbite. Une rupture temporaire de la barrière hémato-encéphalique au cours de ces phases pourrait avoir des implications importantes pour les spatonautes. Ces recherches nous permettent de mieux comprendre les mécanismes liant la plasticité adaptative au système immunitaire et notamment au rôle de la barrière hémato-encéphalique et de l'inflammation. Il s'agit de questions importantes pour la physiologie spatiale ayant des implications également pour les situations de fortes accélérations rencontrées sur terre.

La présente demande concerne un total de 96 souris. Les animaux sont répartis en 4 groupes, 1 groupe contrôles et 3 groupes centrifugés à des intensités et durées croissantes. Nous évaluerons ensuite l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et les changements immuno-histochimiques intervenant au niveau cérébral.

La mise en place de ce protocole respecte les objectifs des 3R

Réduction: Afin de Réduire le nombre de souris, les résultats seront évalués statistiquement une fois les 2/3 de l'étude réalisés afin de voir si les résultats obtenus permettent de ne pas réaliser le dernier 1/3.

Remplacement: Les expériences proposées visent à identifier les mécanismes cellulaires à l'origine des capacités d'adaptation du cerveau à des perturbations de l'environnement telles que celles observées par exemple lors de séjours spatiaux au cours des phases de décollage et de rentrée dans l'atmosphère. La corrélation comportement / processus cellulaires ne peut être effectuée que sur modèle animal et il n'est à ce stade des expériences pas possible de Remplacer ce modèle.

Raffinement: Enfin chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant / anesthésie/analgesie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum".

5767. L'anastomose chirurgicale est la connexion entre deux segments du tractus gastro-intestinale qui est réalisé soit pour rétablir la continuité après ablation d'un segment intermédiaire abritant, par exemple, une tumeur, ou pour reconnecter les différents éléments après une greffe, par exemple, lors d'une greffe hépatique, il est nécessaire de reconnecter l'arbre biliaire du greffon avec l'anse digestive du receveur.

Suite à une altération du processus de guérison, les anastomoses digestives peuvent être compliquées par des sténoses, c.à.d. une réduction de la lumière du tube. La sténose de l'anastomose est potentiellement source d'importante morbidité [1].

L'incidence de sténoses après chirurgie colorectale varie entre 3%-30%. Chez les receveurs de greffe de foie, les voies biliaires sont le site de complications post-opératoires les plus courantes, la sténose biliaire étant l'une des plus fréquentes. Les sténoses anastomotiques sont isolées sur le site anastomotique (biliaire-biliaire ou biliaire-entérique) et sont généralement courtes. L'incidence des sténoses biliaires est estimée entre 9 et 24%. Dans le monde occidental, la cholécystectomie laparoscopique (LC) représente un pourcentage élevé de sténoses biliaires post-opératoires. Même si l'incidence de la lésion biliaire est relativement faible après LC (environ 0,6%), l'utilisation répandue de cette technique entraîne, au total, un nombre considérable de lésions post-opératoires des voies biliaires, y compris les sténoses causées par une lésion thermique, une ligature iatrogène ou une ischémie. La sténose biliaire peut provoquer des occlusions et souvent nécessite une décompression, même en urgence, pour permettre l'évacuation de la bile. Parmi les techniques de décompression utilisées, il y a le drainage percutané, sous guide radiologique. Mais ceci est une mesure temporaire. La révision chirurgicale est une procédure lourde, avec un risque de récurrence tout de même de 20%.

L'uretère, la structure portant l'urine du rein à la vessie, peut être aussi victime de sténoses, dans plusieurs situations [2].

Actuellement, les sténoses digestives sont traitées par dilatation à l'aide d'un ballon gonflable. Le taux de succès d'un tel traitement est variable de 63-100%, selon les séries, mais requiert jusqu'à 3.7 séances de dilatations et expose à un risque de perforation [3].

Similairement, les sténoses urétérales sont traitées par des techniques chirurgicales invasives ou par des méthodes « endo-urétérales » non invasives (dilatation par ballon, pose de stent métalliques, destruction du tissu excédant par coagulation). Mais le taux de succès demeure limité [2].

Nous avons développé un nouveau système modulaire d'anastomose magnétique pouvant, théoriquement, réaliser le traitement d'une sténose par voie complètement endoscopique et en un seul traitement. Le mécanisme d'action est fondé sur la compression produite par les anneaux magnétiques de part et d'autre de la sténose, générant une nécrose contrôlée du tissu cicatriciel surabondant. Le but de l'étude est d'évaluer sur le modèle animal la faisabilité de cette approche.

Le projet respecte le principe de 3R :

1) Remplacement: le recours à l'animal vivant est nécessaire pour tester l'hypothèse que la technique puisse obtenir un élargissement d'une sténose digestive. Le prérequis du mécanisme d'action est le remodelage physiologique des tissus généré par la compression magnétique. Le porc est un modèle de choix car il présente une anatomie similaire à celle de l'homme, permettant l'utilisation d'instruments chirurgicaux et endoscopiques standard. En plus, on retrouve dans la littérature la description de modèles reproductibles chez le porc pour obtenir des véritables sténoses anastomotiques.

2) Réduction: le nombre total d'animaux à inclure dans le projet est de 120. Une approche de type statistique pour définir la taille de l'échantillon nécessaire à obtenir des résultats exploitables a été appliquée pour chaque procédure ou il était possible de trouver des données publiées dans la littérature médicale pertinente. Dans l'absence totale de données préalables, l'utilisation de 8 animaux par groupe devrait représenter un compromis acceptable pour l'obtention de résultats satisfaisants.

3) Raffinement: le projet prévoit des procédures mini-invasives engendrant des douleurs post-opératoires modérées. Toutefois, les animaux recevront un protocole de soins post-opératoires comprenant une évaluation clinique quotidienne, des antidouleurs et des anti-inflammatoires et un régime standardisé. Des critères d'arrêt anticipé de l'expérimentation en cas de survenue d'une complication ont été identifiés. Les conditions d'hébergement et de suivi des animaux sont conformes à la directive EU2010/63. En particulier, les conditions de température, humidité et le cycle lumière-obscurité sont strictement contrôlées. Afin de réduire le stress, de la musique est jouée en permanence dans l'animalerie et le milieu est enrichi par la présence de jouets visant à stimuler les animaux.

5768. La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique du système digestif, qui évolue par poussées (ou crises) et phases de rémission. A première vue, la maladie de Crohn n'a aucun lien avec les spondylarthrites ou le psoriasis. La spondylarthrite ankylosante est une maladie rhumatismale qui atteint surtout la colonne vertébrale et le bas du dos, il s'agit d'une maladie chronique et évolutive, qui conduit à un enraidissement (rigidité) progressif des articulations. Le psoriasis est une maladie inflammatoire de la peau. Il se caractérise généralement par l'apparition d'épaisses plaques de peau qui desquament (qui se détachent sous formes « d'écailles » blanches). Les plaques apparaissent à différents endroits du corps, le plus souvent sur les coudes, les genoux et le cuir chevelu. Elles laissent des zones de peau rouge. Pourtant, les patients Crohn risquent davantage de développer une spondylarthrite ankylosante (jusqu'à 15%) ou un psoriasis. Ce lien est d'ailleurs aussi valable dans l'autre sens: près de 5 à 10% des patients qui sont atteints de spondylarthrite ankylosante développent aussi la maladie de Crohn, même si les scientifiques ne s'accordent pas sur ce chiffre.

L'origine précise du lien entre la maladie de Crohn et la spondylarthrite ankylosante est encore inconnue. Les scientifiques supposent que la maladie de Crohn, le psoriasis et la spondylarthrite ankylosante, ainsi que quelques autres affections, sont des expressions d'un même problème: un système immunitaire déficient. Ces maladies sont rassemblées sous le terme "IMID" ou "maladies inflammatoires à médiation immunitaire". Depuis plusieurs années, la recherche s'intéresse de plus près à certains médiateurs de l'immunité telles que les interleukines afin de mieux comprendre le développement de ces pathologies et d'explorer de nouvelles voies de traitement possible.

Notre approche vise à développer des candidats médicament permettant de réduire ou d'annihiler les processus immunitaires et inflammatoires à l'origine de ces désordres. Afin d'étudier et d'étayer nos hypothèses lors du développement de nos molécules, il sera inévitable d'avoir recours à des modèles animaux présentant une pathologie similaire à celle qui se produit chez l'Homme, des modèles alternatifs n'étant pas disponibles actuellement.

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

des 3R. L'évaluation finale du potentiel thérapeutique des produits dans des modèles animaux reste cependant nécessaire. En effet, l'administration des composés dans le contexte d'un animal vivant permet d'évaluer la réelle efficacité des composés dans un système biologique complexe et « global ».

L'évaluation de l'efficacité de nos molécules sera réalisée dans un modèle de rongeurs chez qui nous pouvons reproduire cette association de trouble : inflammation intestinale, articulaire et cutanée. Elle sera réalisée au cours des 5 années couvertes par ce projet sur 4880 souris et 4880 rats.

Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle du raffinement, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Nous parlons ici de pathologie inflammatoire chronique donc douloureuse chez l'homme. Une prise en charge de cette douleur dans notre modèle est donc envisagée, il est important toutefois que cette prise en charge médicamenteuse de la douleur n'interfère pas avec l'installation de la pathologie ou l'efficacité de la molécule étudiée. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ne sera maintenu dans cet état, il serait mis à mort par une méthode adaptée le cas échéant.

5769. Le syndrome métabolique, caractérisé principalement par des taux élevés de glucose, insuline et cholestérol dans le sang, est une maladie en constante progression dans les sociétés occidentales. Si son origine est multifactorielle, l'importance de la nutrition dans la prévention du syndrome métabolique est néanmoins largement reconnue.

Des études récentes soulignent les bénéfices des produits laitiers sur le risque de syndrome métabolique. Parmi les molécules potentielles expliquant ces effets, ou y contribuant, l'acide trans-palmitoléique (TPA), acide gras à seize carbones comportant une double liaison en configuration trans, est présent exclusivement dans les produits laitiers.

En dépit d'études épidémiologiques révélant une solide association entre forts taux circulants en TPA et moindre risque de syndrome métabolique, aucune étude d'intervention pour vérifier ces bénéfices n'existe à ce jour. L'objectif de notre équipe est donc la mise en place d'une étude de supplémentation en TPA dans un contexte de syndrome métabolique, pour vérifier les hypothèses suggérées par les données épidémiologiques.

Toutefois, parce qu'aucune étude de supplémentation en TPA n'a à ce jour été conduite, la prudence est de mise concernant une telle supplémentation et une éventuelle nocivité. Même si le TPA est un acide gras trans (AGT) naturel, que ses apports dans la population générale sont réels, et qu'il s'oppose a priori aux AGT industriels dont les effets néfastes sont connus, une approche pas à pas est requise. Dans ces conditions, la présente étude pilote est proposée : la tolérance de souris à une supplémentation en TPA sera vérifiée dans un contexte de syndrome métabolique induit. Pour cela, les souris seront nourries par un régime de type occidental (i.e., riche en graisses et en sucres), avec trois acides gras différents donnant lieu à trois régimes différents. En outre, la part lipidique du régime sera caractérisée soit par de la matière grasse laitière (MGL), soit par de la matière grasse végétale (MGV), afin de comparer ces deux types de matières grasses.

Cette expérimentation impliquera ainsi huit lots de cinq souris âgées de six semaines (quarante souris), nourries *ad libitum* pendant six semaines.

Ce projet s'appuie sur la règle des 3R dans sa démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale.

Réduction : L'objectif est d'avoir un maximum de résultats sur de nombreux paramètres (ex : tolérance au TPA, effets sur le syndrome métabolique, durée de régime adéquate), à la fois pour la vérification de la bonne tolérance au TPA mais aussi en guise de support pour des études ultérieures. De telles conclusions peuvent être tirées sans faire appel à un grand nombre d'animaux. Ce nombre a donc été réduit afin non seulement de rester dans l'optique d'une étude pilote, mais aussi de valoriser au mieux le rapport entre quantité d'information extraite et nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : La supplémentation en TPA pour notre expérimentation est à une valeur physiologique. Nous avons opté pour une supplémentation courte de six semaines, durée pour laquelle l'on pourra observer des premières complications liées au syndrome métabolique. Par ailleurs, les animaux bénéficieront d'une semaine pendant laquelle ils seront nourris avec le même aliment que celui de l'établissement fournisseur, afin de favoriser les conditions de découverte et d'habitation au nouvel environnement.

Remplacement : Le syndrome métabolique mettant en jeu des dysfonctionnements métaboliques et hormonaux, associés à des modifications physiques d'organes, la complexité de l'organisme doit être prise en compte. Le modèle *in vivo* est donc nécessaire puisqu'il n'existe pas à ce jour de modèle *in vitro* reproduisant la complexité des interactions entre organes.

5770. Ce projet vise à former des chercheurs, ingénieur ou étudiants en thèse à la réalisation de modèles animaux pour l'étude de l'insuffisance cardiaque.

L'insuffisance cardiaque est une maladie fréquente, touchant un million de personnes en France et dont la fréquence d'apparition a doublé en 10 ans. Elle correspond à l'incapacité du cœur à pomper suffisamment de sang pour répondre aux besoins de l'organisme. Les personnels voulant se former travaillent dans des équipes de recherche s'intéressant aux mécanismes impliqués dans le développement de l'insuffisance cardiaque avec l'objectif d'identifier de nouveaux traitements pour cette pathologie sévère qui présente encore à l'heure actuelle une mortalité à 5 ans proche de 50%. Afin de respecter le principe des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement), le laboratoire développe au maximum des méthodes d'analyses *in vitro* (cellules cardiaques primaires, lignées iPS). Cependant pour étudier la pathologie de l'insuffisance cardiaque, l'utilisation de modèles animaux est indispensable pour l'évaluation de la fonction cardiovasculaire. En effet le système cardiovasculaire est régulé par des mécanismes physiologiques qui ne sont pas simulables dans toute leur complexité *in vitro*. Pour cela nous utilisons des modèles d'insuffisance cardiaque chez la

souris générée par des procédures chirurgicales. L'évolution de la pathologie peut être suivie par échocardiographie et permet ainsi de tester les hypothèses mécanistiques et thérapeutiques.

Ces procédures sont complexes et nécessitent un apprentissage approfondi par l'expérimentateur sur des animaux contrôlés avant de réaliser les expériences liées aux projets scientifiques dans les meilleures conditions et de respecter ainsi pour tous les projets scientifiques le principe des 3R. En l'absence de formation préalable, le risque est d'avoir trop de mortalité inutile pendant les projets scientifiques.

Il est estimé par les experts qui pratiquent couramment ces procédures qu'un expérimentateur doit s'entraîner sur un minimum de 50 souris pour chaque procédure pour arriver à une bonne pratique vis à vis de l'animal et une bonne reproductibilité des résultats ; cette reproductibilité étant garante d'une diminution du nombre d'animaux nécessaires aux études scientifiques.

Afin de minimiser le nombre d'animaux, cette formation utilisera des animaux issus de colonies transgéniques déjà présentes à l'animalerie et qui ne seront pas utilisés pour cause de génotype non utile (exemple : hétérozygote sans phénotype, ou sexe non étudié dans certaines études...). L'insuffisance cardiaque est induite en respectant au maximum les procédures de bien-être animal et en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'ils ne subissent aucun stress. Pour ce projet de formation, nous visons à former 6 personnes avec un minimum de 2 personnels statutaires pour pérenniser le savoir-faire au sein de l'unité sur les deux techniques. Un total de 600 souris est nécessaire pour le projet.

5771. Les infections bactériennes couplées à l'émergence de la résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique. Plusieurs types de bactéries, difficiles à traiter, sont responsables de ces infections: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecium*. Notre laboratoire travaille depuis plus de 15 ans sur la virulence des bactéries c'est à dire sur leur capacité à provoquer des infections plus ou moins graves. A la suite de ces nombreux travaux, nous avons découvert une nouvelle molécule, un petit peptide capable d'inhiber la croissance, *in vitro*, des souches de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecium*. Afin d'améliorer son efficacité contre les bactéries, ce peptide synthétisé naturellement par *Staphylococcus aureus* a été ensuite généré chimiquement pour lui apporter des modifications structurales. 4 nouveaux peptides ont ainsi été synthétisés. Tous ont une activité antibiotique contre les 4 souches citées précédemment. Nous avons pu, en effet, déterminer pour chacun d'eux une concentration minimale inhibant la croissance de ces 4 souches en condition de culture *in vitro*. Ces résultats très encourageants ont fait l'objet d'un brevet qui intéresse fortement les industries pharmaceutiques. En effet, la commercialisation d'une nouvelle molécule type antibiotique permettrait de faire une avancée majeure dans la résolution du problème de résistance aux antibiotiques. Le but de cette étude est donc de démontrer, *in vivo*, sur un modèle murin, l'efficacité de ces peptides lors d'une septicémie provoquée par ces 4 souches bactériennes. L'expérimentation consistera à injecter par la veine caudale de la souris une solution calibrée de bactéries diluées dans du sérum physiologique, et de provoquer ainsi une septicémie. Dans un second temps, une injection de peptides sera réalisée à 2 doses prédéterminées et à 2 temps différents une fois la septicémie provoquée (injection du peptide 1h ou 10h après celle des bactéries). Une courbe de survie pour chaque condition étudiée sera réalisée sur une durée de 14 jours. La comparaison entre un lot de souris "contrôle" (sans injection de peptides) et un lot "test" (avec injection de peptide) permettra de mesurer la capacité de ces nouvelles molécules à éradiquer une infection bactérienne.

Pour confirmer l'efficacité de ces peptides, nous avons besoin d'utiliser d'autres modèles animaux : une septicémie provoquée par injection en intrapéritonéale et un modèle d'abcès sous-cutané. L'expérimentation consistera à injecter soit par intrapéritonéale soit en sous cutané une solution calibrée de bactéries diluées dans du sérum physiologique et de provoquer ainsi une septicémie ou un abcès. Dans un second temps, une injection de peptides sera réalisée à 2 doses prédéterminées et à 2 temps différents en intraveineuse, par la veine caudale de la souris (injection du peptide 3h ou 15h après celle des bactéries). Une courbe de survie pour chaque condition étudiée sera réalisée sur une durée de 14 jours dans les mêmes conditions que précédemment.

Le modèle animal choisi est la souris, le laboratoire possède déjà l'expertise technique nécessaire à cette étude et un nombre de 1760 souris sera suffisant pour une étude comparative.

En ce qui concerne la règle des 3R :

- Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en gardant un effectif correct pour une étude statistique fiable.
- Raffiner : Les animaux seront élevés dans des conditions favorables à leur bien-être, dans des cages de taille appropriée pour des lots de 5 animaux. L'alimentation est contrôlée et les soins quotidiens sont apportés par du personnel qualifié. Pour chaque procédure, les animaux seront surveillés quotidiennement avec évaluation de leur aspect physique, de leur comportement, de leur température corporelle et de leur poids.
- Remplacer : Il n'existe actuellement aucune méthode alternative à l'expérimentation animale permettant d'étudier l'effet *in vivo* de nouvelles molécules thérapeutiques.

Ces données obtenues sur modèle murin sont essentielles pour la mise au point d'une ou plusieurs nouvelles molécules à action antibiotique sur plusieurs bactéries, responsables d'un nombre important d'infections chez l'Homme et qui s'avèrent très souvent mortelles.

5772. En cancérologie, il a été démontré et publié que plus de 45% des candidats médicaments testés favorablement pour leur efficacité chez les rongeurs, par les méthodes classiques, donnent des résultats décevants chez l'Homme, dès la phase I des essais cliniques.

Les entreprises du médicament se tournent vers notre expertise afin d'avoir accès à des modèles innovants de cancers permettant d'obtenir des données consolidées au-delà des données générées en interne ou obtenues sur d'autres modèles précliniques.

L'objectif de ce projet est de déterminer *in vivo* les propriétés antitumorales de 3 candidats médicaments afin d'identifier les traitements potentiellement efficaces en clinique dans le cancer de la prostate en particulier dans le cas de récurrence et de traitement hormonal. L'étude de ces candidats médicaments permettra de définir leur efficacité ainsi que les informations nécessaires pour choisir leur posologie en vue de leur utilisation future en clinique.

Ce projet se base sur l'utilisation d'un modèle de tumeur humaine de prostate xénogreffée sur souris ou PDX (Patient Derived tumor Xenografts). Les modèles de PDX développés au cours des dernières années sont les seuls actuellement permettant de reconstituer sur animal la complexité des tumeurs humaines. Les résultats obtenus sur ces modèles permettent ainsi une réelle extrapolation en médecine humaine.

Ce modèle particulier d'adénocarcinome de la prostate, variant hormono-indépendant, obtenu après la greffe sur souris mâles castrées d'un modèle initialement hormono-dépendant est un des modèles les plus prédictifs de l'action de nouvelles thérapies dans ce type particulier de pathologie.

Les phases de biologie moléculaire et cellulaire réalisées sur un ensemble de candidats médicaments ont permis de sélectionner 3 molécules prometteuses qui doivent aujourd'hui prouver leur efficacité dans un des modèles de PDX mise au point pour mimer au mieux la maladie chez l'homme. L'ensemble de ces étapes préalables ont permis une importante économie d'animaux, un gain de temps en terme d'expérimentation et une optimisation de l'ensemble de la stratégie de développement.

Ce projet s'étendant sur une durée de 94 jours nécessitera l'utilisation de 120 souris. Outre la réalisation de l'étude de l'efficacité de 3 molécules innovantes, le projet permettra d'établir les paramètres de pharmacocinétiques des molécules apportant ainsi des informations précieuses sur les voies d'administration et les posologies futures. Cette stratégie expérimentale permettra de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, d'optimiser au mieux l'utilisation de chacun d'eux et garantira une bonne robustesse des résultats.

L'ensemble du projet se déroulera dans des conditions d'hygiène rigoureuses afin de garantir un statut sanitaire optimal et prévenir des problèmes de santé. Les animaux sont hébergés en petits effectifs par cage. Les cages sont changées fréquemment. Dans chaque cage, les animaux reçoivent un enrichissement de milieu (*Neslets*). Leur état physique et leur comportement sont contrôlés quotidiennement. En cas d'apparition de signes cliniques, les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse seront appliquées : ajout d'enrichissement supplémentaire (bâtons de bois, Dome house) en cas de bagarre, supplémentation de l'alimentation en gel nutritif en cas de perte de poids. Les points limites seront strictement appliqués.

5773. *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 contagieuses 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.

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 impliquées 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.

La caractérisation de différentes protéines impliquées dans l'étape de colonisation est un élément important pour la compréhension de la physiopathologie des infections à *C. difficile* ; en outre, ces protéines représentent des candidats vaccinaux intéressants dans le cadre de la conception d'un vaccin par voie muqueuse, qui aurait l'avantage de ne pas lutter uniquement contre les signes cliniques de la maladie mais également contre l'étape de colonisation et qui aurait donc un impact sur la transmission de cette maladie (vaccin altruiste).

Pour identifier et caractériser ces protéines, de nombreuses études sont réalisées au préalable *in vitro*, mais l'utilisation de modèles animaux reste indispensable pour affirmer de manière claire leur rôle dans la virulence. Le modèle hamster, particulièrement sensible à l'infection par *C. difficile*, a été choisi car il reproduit les processus physiopathologiques conduisant à la colite chez l'homme. Les essais consistent à comparer la virulence de souches mutées pour les différentes protéines candidates par rapport à la souche sauvage dans ce modèle animal.

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...) visant à empêcher cette étape précoce de colonisation.

96 animaux, à raison de 8 hamsters par groupe, seront nécessaires au maximum afin de tester 9 mutants de *C. difficile* (3 groupes témoins seront nécessaires). Le nombre d'animaux sera respecté, tout en conservant une puissance statistique suffisante qui permettra de conclure sur ces expériences sans avoir besoin de les renouveler (cf. projet). L'exigence de réduction, raffinement, et remplacement des animaux sera respectée. La réduction au maximum du nombre d'animaux sera respectée, tout en conservant une puissance statistique suffisante qui permettra de conclure sur ces expériences sans avoir besoin de les renouveler (cf. projet). Concernant le 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. Concernant le remplacement, tous les mutants ont été ou seront testés préalablement *in vitro*. Seuls les mutants ayant été testés préalablement *in vitro* et ayant un fort potentiel d'impact pour leurs propriétés de virulence entreront dans ce protocole. Le recours à l'animal reste 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 vitro* ou *in silico* capable de reproduire la complexité du processus infectieux dans son intégralité.

5774. Le cancer du poumon ou cancer bronchique se développe le plus souvent à partir des cellules des bronches. On distingue deux grands types de cancers bronchiques : les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) et les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC). Ils représentent respectivement environ 80 % et 20 % de ces cancers.

Actuellement, trois types de traitements sont utilisés dans la prise en charge des cancers bronchiques : la chirurgie, la radiothérapie et des traitements médicaux (chimiothérapie et thérapies ciblées). Pour les cancers bronchiques la chimiothérapie associée ou non à une radiothérapie représente le traitement de choix.

Cependant, le cancer du poumon est aujourd'hui la première cause de décès par cancer en France et dans le monde (survie globale de 14 % à 5 ans et 9 % à 10 ans). Aussi, la recherche s'oriente vers de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'évaluation de l'effet de nouvelles thérapeutiques nécessite le développement de procédures *in vitro*. Néanmoins, les cellules tumorales se comportent différemment *in vitro* et *in vivo* en termes de croissance, de dissémination, de résistance aux traitements, etc. Aussi, l'évaluation du bénéfice de nouvelles thérapeutiques requière le développement de modèles précliniques intégrant l'ensemble de la biologie d'un organisme vivant.

Dans ce contexte nous avons fait un premier projet (validé précédemment par le comité d'éthique) qui vise à mettre en place différents modèles tumoraux pertinents chez la souris et notamment de cancers du poumon.

Ce projet fait donc suite à ces travaux et vise à évaluer l'efficacité de nouveaux traitements thérapeutiques (protocole de radiothérapie innovant, chimiothérapie, etc..) dans les modèles de cancer du poumon préalablement établis et caractérisés, qu'ils soient à petites cellules ou non et implanté en sous cutanée ou en orthotopique (dans le poumon).

Ces modèles porteront sur l'implantation de cellules humaines dans des souris immunodéficientes (Nude, NOD-SCID, NSG) (xénogreffe).

Le suivi de la croissance tumorale sera réalisé par mesures physiques directes et par des méthodes non invasives (eg. Bioluminescence, IRM).

Ce projet nécessitera l'utilisation de 500 animaux.

Au regard de la règle des 3R

Remplacer : L'objectif de ce projet est d'évaluer *in vivo* l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques qui auront été préalablement validées *in vitro*.

Réduire : De nombreux laboratoires internationaux ont déjà développé des modèles tumoraux. Aussi, nous nous baserons sur leurs différents travaux afin de bénéficier de leur expérience. Par ailleurs, notre plus-value porte sur l'utilisation de cellules tumorales dites « primaires » (très proche de la maladie humaine) et également de modèles orthotopiques peu répandus.

Enfin, les lots utilisés seront de 7 souris, ce qui est suffisant pour avoir une bonne idée de d'un effet thérapeutique intéressant (tests statistiques) et qui est très souvent utilisé dans diverses publications scientifiques.

Raffiner : Pour limiter toute souffrance animale inutile, les cellules tumorales utilisées (testées *in vitro*) seront dans un premier temps implantées en sous-cutané afin de vérifier d'un premier effet thérapeutique du traitement testé. Cela préservera des injections orthotopiques bien évidemment invasives.

Les techniques de suivi non-invasif (Bioluminescence, IRM) et le suivi longitudinal qui en découle permettront également de faire un suivi cinétique non douloureux, de réduire le nombre d'animaux utilisés, et est tout à fait pertinent quant à la mise en place et à la caractérisation des modèles tumoraux.

5775. Dans ce projet nous allons étudier la faisabilité d'une approche de thérapie génique pour la glycogénose de type III (GDS III). GSD III est une maladie rare caractérisée par une dégénérescence progressive du foie et des muscles. La fréquence de la maladie est de 1/100000. GSD III est une maladie autosomale récessive due à l'absence de l'enzyme de débranchement du glycogène (GDE), enzyme clé dans la dégradation du glycogène.

La maladie se présente en deux phases : une phase juvénile et une phase adulte. Les malades présentent une hépatomégalie, une hypoglycémie, une hyperlipidémie et un retard de croissance. Chez l'enfant la GSDIII affecte principalement le foie. Sans un régime alimentaire approprié les conséquences sont fatales. Chez l'adulte, la maladie a un phénotype musculaire dégénératif plus marqué. Actuellement, il n'y a pas de traitement pour GSDIII mais un régime riche en glucides complexes et en protéines peut ralentir son évolution.

Néanmoins, il a été montré *in vitro* que l'ajout en excès de la protéine « Glucosidase Alpha Acid » (GAA) responsable de la glycogénolyse lysosomale permet de réduire significativement la concentration cellulaire de glycogène des cellules de patients atteints de GSDIII.

Le but de notre projet est de développer une approche de transfert de gène dans le modèle souris GSDIII permettant de produire une quantité plus importante de GAA. Cette approche vise aussi bien les enfants (phénotype métabolique) que les adultes (phénotype musculaire).

Afin de respecter la règle des trois R, tous nos virus médicament ont préalablement été testés *in vitro* et *in vivo* (Réduction et Remplacement) et seuls ceux ayant montré la plus importante expression et sécrétion de la protéine GAA seront utilisés dans le modèle GSDIII. Ceci nous a permis de sélectionner 1 vecteur thérapeutique candidat sur 36 potentiels. Toutefois la capacité de nos

virus à franchir les défenses immunitaires ne peut être démontrée complètement que dans un organisme physiologique "entier". Nous prévoyons donc de les tester chez le modèle animal qui mime le phénotype musculaire et métabolique de la maladie. Nous prévoyons ainsi de tester nos hypothèses thérapeutiques sur un modèle de souris (souris GDE-KO) présentant les mêmes déficiences observées dans les patients atteints de GSDIII.

La construction de la procédure a été faite pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, puisque au lieu des 36 conditions théoriques à tester, nécessitant 120 souris, nous testerons une seule condition qui nous permettra de limiter le nombre de souris à 75 souris (Réduction)

Le nombre d'animaux par groupe est estimé en fonction d'un test bilatéral standard de comparaison des moyennes afin d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible. Nous envisageons ainsi l'utilisation d'un total de 75 souris sur 3 ans.

Les prélèvements sanguins seront importants pour évaluer l'efficacité de notre vecteur et seront fait au niveau de la veine mandibulaire afin de raffiner le geste.

Nous espérons ainsi montrer au terme du projet une efficacité thérapeutique de notre candidat chez la souris permettant la preuve de concept de thérapie pour GSDIII grâce à l'apport en excès de la protéine GAA.

5776. Avec plus de 25 000 nouveaux cas par an en France, et environ 720 000 dans le monde, le cancer du sein est le cancer le plus répandu chez la femme (première cause de mortalité entre 35 et 55 ans), sachant qu'une femme sur 9 développera une tumeur du sein au cours de son existence. La sévérité du tableau épidémiologique justifie donc les efforts à faire en matière de prévention, de dépistage précoce et de recherche thérapeutique.

Les Ténascines sont des molécules de la matrice extracellulaire impliquées dans de nombreux cancers, dont la surexpression est associée à un faible facteur pronostique. Nous étudions dans notre laboratoire à l'aide de plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo*, une molécule spécifique appartenant à la famille des Ténascines : la Ténacine C (TNC).

La présente étude s'attachera à analyser l'impact de la TNC sur l'apparition et le développement des tumeurs de la glande mammaire, l'objectif étant de déterminer si cette molécule peut être une cible thérapeutique potentielle.

L'utilisation de lignées cellulaires en culture *in vitro* permet de proposer certaines hypothèses mais celles-ci doivent être validées dans un modèle *in vivo*, donc chez l'animal. De plus, les lignées cellulaires ne reflètent pas l'hétérogénéité (polyclonalité) présente dans les tumeurs. L'hétérogénéité tumorale est en effet l'un des mécanismes expliquant l'évolution et l'adaptation des cancers (la tumeur est composée de cellules dont le patrimoine génétique est différent, comme une mosaïque complexe formée de plusieurs clones).

Nous avons donc besoin d'un modèle animal pour mener des études les plus complètes possibles : environnement tumoral, réaction du système immunitaire, dissémination des métastases, mécanismes physiologiques impliqués, impact sur la survie, etc. Nous avons choisi le modèle murin car celui-ci est développé depuis de nombreuses années et possède de multiples avantages : nombreuses lignées génétiquement modifiées disponibles, facilité d'accès (utilisation et élevage pratiques, à moindre coût), modèle génétiquement proche de l'homme (plus de 90% d'homologie), etc.

Les modèles animaux génétiquement modifiés utilisés dans cette étude (développant spontanément des tumeurs mammaires), permettront d'une part d'analyser la progression tumorale observée chez l'homme dans le cancer du sein, et d'autre part d'étudier l'impact de la présence ou non de TNC sur le développement de telles tumeurs.

Remplacement: Le modèle animal est nécessaire car il n'existe pas de modèle pour reproduire *in vitro* l'ensemble des mécanismes impliqués dans cette étude.

Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire a été déterminé au minimum mais néanmoins suffisamment pour pouvoir réaliser une analyse statistique pertinente. L'algorithme de Lamorte est utilisé pour déterminer la taille de l'échantillon (outil de calcul de la taille des échantillons biologiques, Université de Boston). De ce fait 80 souris seront utilisées au total pour l'ensemble de cette étude.

Raffiner: Le protocole expérimental prend en compte un potentiel impact sur la souffrance animale et différents critères ont été établis pour justifier un arrêt de l'expérience en cours.

Des points limite ont notamment été établis pour éviter toute souffrance animale. Les souris sont maintenues en groupe de 3 minimum par cage pour maintenir une interaction entre individus. L'environnement d'élevage est enrichi à l'aide de carrés de cellulose pour la construction des nids et de tunnels en plastique rouge pour favoriser l'activité des souris. Les souris ont accès ad libitum à une nourriture de type normal (RM1, Dietex) et à de l'eau filtrée.

De plus, les souris seront surveillées quotidiennement jusqu'à la fin de l'expérimentation, pour détecter des signes éventuels de douleurs.

Si une souris présentait des symptômes traduisant l'apparition de douleurs, une injection en IP d'un analgésique sera effectuée une fois par jour (Metacam 2mg/ml solution injectable, à raison d'une injection en IP de 0.2mg/kg de souris) jusqu'à disparition des symptômes.

Les souris seront également pesées et leur état général évalué 3 fois par semaine. Les données issues de ce suivi individuel seront enregistrées dans un tableau spécifique définissant les points limites expérimentaux, et aussitôt analysées. Par conséquent, si un animal atteint à un moment donné de l'expérience, un de ces points limites définis, il sera immédiatement mis à mort.

5777. L'hypertension artérielle pulmonaire (maladie progressive grave qui touche les petits vaisseaux sanguins des poumons) et certaines malformations cardiaques congénitales se compliquent d'un mauvais fonctionnement (insuffisance) du ventricule droit (VD) qui souffre de façon chronique et prolongée d'un excès de charge en pression et/ou en volume. Cette insuffisance cardiaque droite, responsable du décès prématuré d'adultes encore jeunes, peut être associée à une insuffisance cardiaque gauche. S'il existe

un intérêt majeur à suivre la fonction du VD, l'évaluation de la fonction du ventricule gauche (VG) ne doit pas être négligée car sa dysfonction est reconnue comme un facteur de risque supplémentaire de mort subite.

Les techniques permettant d'évaluer cette fonction VG sont soit invasives, comportant un risque de complications important (cathétérisme cardiaque), soit difficile d'accès (IRM), soit dépendantes de l'expérience de l'opérateur (échocardiographie).

La cardiométrie électrique est une technique innovante, indolore, totalement non-invasive rapide à mettre en place, non contraignante permettant des mesures continues et reproductibles de la fonction cardiaque du VG. Si notre équipe a pu valider, chez l'enfant, certains paramètres caractéristiques de la fonction VG par cette technique (débit cardiaque, volume d'éjection, charge cardiaque), un autre paramètre donné par cet appareil : l'index de contractilité cardiaque, ne peut être validé qu'en comparaison à celui obtenu par une méthode invasive non applicable en clinique. La validation de cet index est très importante: il permettrait une évaluation plus précise de la fonction du VG et est décrit comme indépendant du volume de sang. Cependant, avant d'appliquer cette technique chez les patients et de pouvoir l'utiliser en surveillance et surtout en dépistage précoce d'une défaillance de la fonction VG de nos patients, il est crucial de comparer les valeurs obtenues par cardiométrie à celles obtenues par les techniques de référence sur des modèles animaux mimant les pathologies du cœur droit. En effet, il n'existe pas de méthode alternative permettant de reproduire les lésions cardiaques induites par surcharge chronique du ventricule droit.

Concernant les maladies cardiovasculaires, le porc constitue un modèle de choix en santé humaine de par ses caractéristiques et propriétés anatomiques et physiologiques cardio-vasculaires comparables à celles de l'homme. Ainsi le système sera d'abord validé sur des animaux sains, puis sur modèles pathologiques afin de démontrer son apport dans le dépistage précoce de défaillance du VG. Avant de débiter cette étude, notre système de mesure a été testé sur des modèles de rongeurs afin de vérifier sa sensibilité. Pour réduire le nombre d'animaux sacrifiés, les procédures non invasives (cardiométrie électrique, échographie cardiaque) ont été favorisées et tous les gestes invasifs seront réalisés par du personnel qualifié afin de les optimiser. Ainsi, pour la totalité du projet, nous utiliserons au maximum 25 animaux (7 sains et 18 modèles pathologiques).

Des anesthésiques et des analgésiques à usage vétérinaire seront utilisés pour réduire, supprimer et soulager l'inconfort, la douleur et l'angoisse des animaux tout au long de leur stabulation et pendant les différentes étapes du protocole expérimental.

Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs auront une nourriture adaptée et seront stabulés en groupe de deux dans des cages de 2m² (individus de poids <40kg) pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire leur stress. Leur environnement sera enrichi pour favoriser l'activité de foussement.

5778. L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare et très grave qui entraîne une insuffisance cardiaque droite nécessitant à terme une transplantation cœur-poumon. Cette pathologie est caractérisée en particulier par une multiplication des cellules formant la paroi des vaisseaux (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses vasculaires) ce qui diminue la lumière des vaisseaux et participe à l'hypertension pulmonaire. Les mécanismes impliqués dans ce remodelage artériel ne sont pas élucidés. Nous disposons ou pourrions disposer de plusieurs lignées de souris et de rats afin de disséquer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la prolifération des cellules vasculaires. Ces expériences *in vivo* sont indispensables pour prouver le rôle des facteurs que nous étudions dans le développement de la maladie. Certaines souris nous permettent de suivre certains types cellulaires qui sont détectable par un marqueur spécifique afin de déterminer leur implication dans le développement de la pathologie. D'autres lignées sont mutées sur des gènes dont on veut déterminer le rôle dans le développement de l'HTAP. En particulier, nous étudierons des rats porteurs d'une délétion génique reproduisant celle observée chez l'homme dans une forme particulière d'HTAP, la maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP). D'autres part, nous isolerons des cellules progénitrices et des cellules vasculaires de ces animaux afin d'effectuer des études *in vitro* sur leurs capacités de prolifération et de différenciation.

Nous allons étudier la prolifération des cellules vasculaires dans ces différentes lignées de souris et de rats grâce à des modèles expérimentaux d'HTAP. Environ 1330 souris et 899 rats sont prévus pour des procédures expérimentales de classe modérée ou sévère et pour une procédure d'élevage d'une lignée génétiquement modifiée pour laquelle nous attendons un phénotype dommageable (développement d'une MVOP). Nous utiliserons 8 à 12 animaux par groupe expérimental afin de permettre de bonnes analyses statistiques même si certains animaux meurent en cours d'expérimentation (lors de la prise de pression ou lors des procédures de classe sévères). Chaque groupe d'animaux correspond à une question scientifique précise et différente. En particulier, nous étudierons, *in vitro* puis *in vivo*, l'effet de certaines molécules pharmacologiques permettant de cibler certaines voies cellulaires afin de déterminer leur rôle dans le mécanisme de remodelage vasculaire au cours de l'HTAP. Les procédures expérimentales proposées sont nécessaires et ne peuvent être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

Dans nos protocoles et analyses, nous prendrons les mesures suivantes pour appliquer la règle des trois R :

1/ Le suivi de l'hypertension pulmonaire et de l'hypertrophie ventriculaire droite des rats sera réalisée par échocardiographie à différents temps sur le même animal. Dans la mesure du possible, le même groupe d'animaux contrôles sera utilisé pour comparer l'effet de différentes molécules pharmacologiques. Cela permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaires ainsi que de mesurer le cas échéant l'efficacité de molécules pharmacologiques testées avant euthanasie. Les poumons prélevés chez les animaux serviront pour les différentes analyses : histologiques, immunohistochimiques, biochimiques et pour les mesures d'expression des gènes

2/ Quel que soit le protocole, les molécules pharmacologiques données en traitement aux animaux sont sélectionnées soit selon leurs effets d'après la littérature soit par screening *in vitro* sur cellules isolées. Seule la molécule inhibitrice ou activatrice la plus puissante de la cible pharmacologique d'intérêt sera testée chez l'animal. L'étape de tests pharmacologiques *in vivo* chez le rat ou la souris est cependant indispensable pour prouver la réalité des liens *in vivo* entre les molécules visées et les phénomènes étudiés.

3/ Les cellules isolées à partir de certains animaux pourront dans certains cas être amplifiées et maintenues en culture et ainsi éviter le sacrifice de nouveaux animaux afin d'en préparer de nouveau.

Par la suite, nous vérifierons les résultats obtenus avec des animaux par l'analyse de coupes de poumons de patients atteints d'HTAP (poumons issus de greffe) ou de cellules obtenues à partir d'échantillons humains.

Les résultats attendus sont une meilleure compréhension des cellules et des voies de signalisation à l'origine de la prolifération des cellules vasculaires pulmonaires et nos résultats auront une forte valeur ajoutée sur le plan thérapeutique en raison de la possibilité d'identification de nouvelles cibles pour les médicaments de l'HTAP.

5779. Nos projets sont centrés sur la régulation de la régénération du foie. La régénération du foie est indispensable à la guérison après hépatite sévère ou après ablation chirurgicale d'une partie du foie. L'étude des mécanismes qui gouvernent la régénération permettra de progresser dans le traitement des maladies aiguës et chroniques du foie. Ce processus très complexe implique une multitude de voies de signalisation et d'interactions cellulaires. Nous nous intéressons en particulier à deux voies de signalisation impliquant des récepteurs membranaires. L'ensemble de nos travaux nécessite la mise en place de modèles expérimentaux *in vivo* et *in vitro* permettant d'étudier les différents facteurs régulant la prolifération hépatocytaire. Les modèles expérimentaux *in vivo* les plus utilisés dans notre équipe (comme dans la littérature) pour étudier la réparation du foie chez la souris, sont l'hépatectomie partielle (ablation d'une partie du foie), l'induction de l'équivalent d'une hépatite, et la ligature de la voie biliaire, sur une échelle de temps allant de quelques heures à 5 jours. Pour étudier la réparation chronique (développement de l'équivalent d'une cirrhose), sur une échelle de temps plus étirée (plusieurs semaines), nous réalisons également des ligatures de la voie biliaire et des traitements induisant l'équivalent d'une hépatite chronique. Nous disposons actuellement de plusieurs souches de souris génétiquement modifiées, déficientes pour les récepteurs membranaires que nous voulons étudier. Le déficit de ces récepteurs n'induit aucune anomalie spontanée ni souffrance chez les souris, mais nous étudions l'impact de ces récepteurs sur la régénération du foie dans nos différents modèles expérimentaux. Nous élevons aussi une souche de souris sauvages "contrôles". Ces souris sont indispensables à nos travaux, pour l'étude *in vivo* de la réparation du foie, ainsi que pour l'isolement des différentes cellules hépatiques ou extra-hépatiques et leur étude *in vitro*. Le caractère par définition intégré des processus que nous étudions ne permet pas le remplacement complet des modèles *in vivo* par des modèles *in vitro* qui ont cependant un caractère complémentaire indispensable à la compréhension fine des mécanismes de la régénération et de la réparation du foie. Les expériences *in vitro* sont pratiquées systématiquement à chaque fois qu'elles peuvent remplacer les expériences *in vivo*. Durant l'ensemble de nos études, nous nous efforçons de réduire le nombre d'animaux nécessaires et suffisants dans chaque groupe expérimental. Compte tenu de la variation « inter-animale » des réponses biologiques impliquées au cours des processus de régénération et de réparation du foie dans les modèles étudiés, un nombre optimal de 6 souris par groupe expérimental doit être, dans la plupart des cas, prévu. Notre recul ainsi que la littérature de notre domaine montrent que toute réduction de ce nombre produit des données dont l'analyse n'est pas solide. Nous optimisons l'étude des souris en cours et en fin d'expérimentation (multiples prélèvements d'organes et de fluides) de façon à ne pas répéter inutilement les expériences. Le raffinement de nos procédures consiste à : réaliser toutes nos expériences avec le souci permanent de limiter le plus possible la douleur ou l'inconfort des souris (notamment procédures d'anesthésie et d'euthanasie bien maîtrisées et antérieurement validées par le comité d'éthique, définition précise des points limites). Le nombre total de souris utilisées dans ce projet est estimé à environ 2000 sur cinq ans, réparties dans des protocoles utilisant les différentes procédures : hépatectomies partielles (480 souris), ligature de la voie biliaire (240 souris), induction d'une hépatite (420 souris), mesure de la sécrétion biliaire (100 souris), isolement de cellules (50 souris), greffes de moelle (420 souris), administrations de traitements (220 souris). Environ 100 souris sont maintenues en zone de reproduction.

5780. La Maladie de Parkinson est caractérisée par la perte de neurones dopaminergiques entraînant l'expression de symptômes moteurs dont la triade bien connue : akinésie, rigidité et tremblement. Le traitement à la L-DOPA, le précurseur naturel de la dopamine, permet de compenser la perte de dopamine et de contrecarrer l'expression de ces symptômes moteurs parkinsoniens. Cependant, ce traitement pharmacologique induit à long terme des mouvements anormaux involontaires très invalidants pour les patients. Parallèlement, la maladie progresse et d'autres systèmes de neurotransmission dégèrent, comme entre autres, le système sérotoninergique. La lésion de ce système sérotoninergique pourrait expliquer le développement d'autres symptômes, de nature psychiatrique, comme la dépression, l'apathie et l'anxiété, qui sont fréquemment observées en association chez certains patients. Une composante sérotoninergique pourrait aussi être impliquée dans les troubles du contrôle des impulsions (induits par traitement dopaminergique). C'est dans ce contexte de recherche que s'inscrit le présent projet.

L'utilisation de la neurotoxine MPTP a permis de reproduire la perte des neurones dopaminergiques chez le primate non-humain. Grâce à ce modèle, l'implication du système dopaminergique dans la production des symptômes moteurs de la maladie a été étudiée et cela a permis de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour contrecarrer les symptômes moteurs de la maladie. En utilisant une autre neurotoxine, la MDMA (connue sous le nom d'Ecstasy), un nouveau modèle primate de la maladie de Parkinson a été développé, présentant une lésion dopaminergique (induite par le MPTP) et une lésion sérotoninergique (induite par la MDMA). L'utilisation de ce nouveau modèle animal permet d'étudier i) l'implication relative de ces deux systèmes dans l'expression des symptômes moteurs et non-moteurs de la maladie ainsi que ii) l'impact de la lésion de ces deux systèmes sur la capacité thérapeutique d'agents pharmacologiques ciblant l'un ou l'autre.

Les objectifs principaux de ce présent projet sont : 1) de déterminer l'impact d'une lésion sérotoninergique seule (induite par la MDMA) sur l'apparition de symptômes non-moteurs ; 2) de déterminer l'influence d'une lésion sérotoninergique en amont d'une lésion dopaminergique sur le profil de symptômes moteurs et non-moteurs en comparant le groupe d'animaux doublement lésés (MDMA/MPTP) avec un groupe d'animaux ayant seulement une lésion dopaminergique (MPTP) ; 3) de déterminer l'impact de

chacune de ces lésions sur la capacité d'agents dopaminergique et sérotoninergique à induire ou traiter les symptômes parkinsoniens. Pour répondre à ces 3 questions, deux groupes de 4 *Macaca fascicularis* seront nécessaires. Ils seront entraînés à réaliser une tâche comportementale permettant de mettre en évidence des symptômes moteurs et non-moteurs. Les effets lésionnels des deux neurotoxines seront identifiés par imagerie par tomographie à émission de positrons (TEP) avec des ligands spécifiques. Les sites et effets des agents pharmacologiques seront identifiés par TEP et par microinjection.

Ce projet a été élaboré pour répondre à des questions scientifiques fondamentales portant sur i) le rôle de la sérotonine et de la dopamine dans le cerveau, ii) la compréhension de la maladie de Parkinson et de ces symptômes neuropsychiatriques associés, iii) les traitements pharmacologiques potentiels.

Ce projet respecte les règles de pratiques expérimentales et adopte une stratégie de recherche respectueuse de la règle des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement) préconisée pour une recherche sur l'animal à des fins scientifiques. Le primate non-humain est irremplaçable de par sa proximité anatomo-fonctionnelle avec l'homme. Il est aussi le modèle animal sur lequel ont été utilisées précédemment les neurotoxines (MPTP et MDMA). Enfin, la MDMA produit actif de l'Ecstasy, n'induit un effet lésionnel sélectif du système sérotoninergique que chez les primates (humain et non-humain). Le modèle rongeur ne peut donc pas remplacer le modèle primate non-humain dans cette étude qui a aussi comme objectif de déterminer l'impact comportementale d'une lésion à la MDMA. Le raffinement de nos conditions d'hébergement, de nos soins et de nos approches d'investigations nous permet de réduire le nombre d'animaux et de veiller à leur bien-être durant toute la phase expérimentale.

5781. Le peptidoglycane (PG) est un composant majeur de la paroi bactérienne. Cette macromolécule est unique et essentielle aux bactéries. Les organismes supérieurs incluant les mammifères détectent le PG et, par conséquent, la présence des bactéries, grâce à des récepteurs de l'immunité innée. Dès la naissance d'un individu, la flore commensale établit une symbiose avec son hôte. Cette symbiose nécessite une communication entre l'hôte et sa flore commensale. Récemment, nous avons montré que le PG de la flore commensale constitue un de ces messagers permettant la communication entre les deux parties. Le PG influence la physiologie de l'hôte, comme la maturation du système immunitaire de l'intestin, l'activation de cellules immunitaires circulantes comme les neutrophiles, ou le sommeil. Les récepteurs du PG sont présents dans tous les tissus de l'organisme et, par conséquent, les effets du PG sur la physiologie de l'hôte peuvent largement dépasser ceux décrits jusqu'à présent. Pour pouvoir étudier de nouveaux effets inconnus du PG sur la physiologie de l'hôte, il est important de savoir quels tissus et cellules sont susceptibles d'être en contact avec le PG. L'objectif de ce projet de recherche fondamentale est d'étudier comment le PG relargué par la flore commensale se dissémine et agit localement et dans des organes distants pour induire des effets biologiques. En particulier, nous voulons i) déterminer la pharmacodynamique du PG dans un hôte après assimilation par le tractus gastro-intestinal, ii) identifier les voies d'absorption au niveau intestinal et de dissémination dans d'autres organes distants, iii) trouver des moyens simples de détection du PG en circulation ou dans les tissus par spectrométrie de masse.

Ce projet de 5 ans utilisera au maximum 1900 souris, modèle adapté à l'étude des réponses immunitaires du système digestif et permettant une imagerie de l'animal en entier, et pour lequel des outils génétiques et des lignées déficientes pour des gènes du système immunitaire sont disponibles

Ce projet entraînera des souffrances légères à modérées, ou pas de souffrance puisque la plupart des expériences se dérouleront sur souris anesthésiées, et sans réveil.

Pour l'étude de pharmacodynamique, le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur notre expérience de la conception d'études de ce type. Ainsi, le nombre de souris sera réduit au strict minimum. De plus nous maximiserons le nombre d'expériences différentes sur une même souris en réduisant le nombre de souris au strict minimum.

Le nombre de souris à utiliser a été calculé avec l'objectif de réduire le nombre d'animaux autant que possible tout en minimisant le « bruit de fond » inhérent à la recherche biologique *in vivo*. Ce nombre tient compte du nombre nécessaire de contrôles. Il tient également compte de la nécessité de reproduire les résultats, afin de pouvoir identifier et exclure des artefacts expérimentaux et ainsi éviter des erreurs d'interprétation.

5782. L'activité de reproduction dépend d'un axe fonctionnel qui inclut les neurones à gonadolibérine (GnRH) localisés dans l'hypothalamus, les cellules gonadotropes de l'hypophyse qui sécrètent des gonadotropines (LH et FSH) et les gonades qui sécrètent les hormones sexuelles (oestradiol chez les femelles et testostérone chez les mâles). En amont de cet axe, il existe une population de neurones hypothalamiques produisant un peptide (RFRP3) qui a la capacité de réguler l'activité des neurones à GnRH et la sécrétion de LH. Des expériences de pharmacologie *in vivo* ont montré que l'injection intracérébrale d'un RFRP-3 synthétique est capable de réguler la sécrétion de LH chez le hamster avec des effets différents selon le sexe. L'objectif de cette étude est de réaliser une stimulation directe des neurones à RFRP3 afin de mieux déterminer à la fois le rôle physiologique de ce neuropeptide dans le contrôle central de l'activité de reproduction et d'évaluer s'il existe des différences d'effet entre les mâles et les femelles. Les résultats de ces études permettront de proposer des traitements adaptés dans les cas de troubles de la reproduction liés à une altération de l'activité des neurones à GnRH.

Le projet sera conduit sur des souris C57 génétiquement modifiées exprimant certains gènes spécifiquement dans les neurones à RFRP. Le projet comporte 5 procédures expérimentales dont 1) la validation du modèle animal, 2) la stimulation lumineuse des neurones à RFRP *in vivo*, 3) le prélèvement sanguin pour la mesure de LH, 4) l'ovariectomie avec/sans remplacement d'estradiol pour évaluer l'effet rétroactif des hormones sexuelles sur l'effet du RFRP3, et 5) l'injection sous cutanée d'antagonistes des récepteurs au RFRP3 pour connaître les cibles pharmacologiques du RFRP3 libéré lors de la stimulation lumineuse des neurones. L'ensemble du projet nécessitera 600 animaux, dont 350 femelles et 250 mâles.

Une attention particulière sera portée aux aspects éthiques de la recherche sur animal en respectant la règle des 3 R. En termes de remplacement, nous ne pouvons pas travailler sur des cellules isolées car l'axe reproducteur met en jeu différents organes (hypothalamus, hypophyse, gonades). En terme de réduction, nous utiliserons le nombre minimum de souris permettant une analyse statistique suffisante par condition expérimentale (10 souris par groupe, test ANOVA) tout en tenant compte des différences individuelles. De plus, dans la mesure du possible, nous réaliserons plusieurs expériences *in vivo* sur les mêmes souris pour en limiter le nombre. En termes de raffinement, l'environnement des souris sera enrichi avec un nid et un barreau à ronger. Par ailleurs, bien que ce projet nécessite une approche invasive, le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux tout au long de l'expérience (habituation à l'expérimentateur, anesthésiques, analgésiques, suivi du score de douleur).

5783. Ce projet s'inscrit dans un contexte international de recherches sur les maladies neuromusculaires et la mise en place de l'atrophie qui en découle. La perte de masse musculaire est aussi rencontrée dans de nombreuses pathologies telles que le SIDA, le diabète ou le cancer ainsi que les troubles musculosquelettiques (ou TMS), qui regroupent de nombreuses pathologies des muscles, tendons et nerfs. Les TMS sont les maladies professionnelles les plus courantes en France et dans les pays développés. Leurs conséquences sur la santé sont mesurables en termes d'augmentation de morbidité : vieillissement prématuré, altération de la qualité de vie. Nos travaux présentent donc un intérêt sur le plan économique, aussi bien en termes de santé publique que de vieillissement de la population.

L'un de nos objectifs est de déterminer les modifications de l'activité électromyographique (EMG) lors de dysfonctionnements nerveux et/ou musculaires consécutifs à une pathologie ou une modification environnementale. Nous proposons de mettre au point une approche expérimentale d'enregistrement de l'EMG par télémétrie chez la souris. Cette technique permet de laisser l'animal totalement libre de ses mouvements, puisqu'il n'est relié à aucun système d'enregistrement. De ce fait, cette approche expérimentale est également beaucoup moins stressante et inconfortable pour les animaux que les méthodes d'enregistrement classiques de type filaire.

La technique de télémétrie consiste à implanter sous anesthésie générale des électrodes d'enregistrement extrêmement fines dans un muscle de la patte postérieure (le muscle soleus) ainsi qu'un émetteur en sous-cutané. Nous avons opté pour l'émetteur le plus léger soit 1.6 gr (5x10x20mm). Après réveil et suivi post opératoire, les animaux mènent une vie normale sans contraintes particulières (pas de connexion avec des systèmes d'enregistrement). L'activité EMG est recueillie par les électrodes, le signal est transmis par l'émetteur à un récepteur situé à proximité de la cage d'hébergement des animaux. La durée maximale d'émission de l'émetteur est de plusieurs mois, ce qui permet de réduire considérablement le nombre d'animaux impliqués dans l'étude. Le stress des animaux est également très réduit puisque ceux-ci ne sont pas soumis à des manipulations répétées, contrairement à ce qui se produit lors d'un enregistrement de type filaire.

Nous tablons sur 4 campagnes de 4 semaines avec 5 souris mâles par campagne ce qui représente un total de 20 souris. Ce nombre a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de résultats satisfaisants (différences statistiquement observables). Dans tous les cas, l'ensemble des procédures expérimentales seront réalisées en limitant au maximum toute douleur et/ou stress pour les animaux.

5784. Un rôle important dans la genèse de l'obésité est joué par des hormones produites par des cellules présentes au niveau du système digestif ayant pour fonction le contrôle de la sensation de « faim » et de la motilité Gastro-intestinale. La modulation de la motilité gastrique pour traiter l'obésité, par des techniques endoscopiques, pourrait avoir un impact majeur sur la prise en charge du patient souffrant d'obésité morbide.

Le but du projet GAMMA 2.0 est de tester deux modalités de modulation de la motilité gastrique :

1. L'interférence sur le pacemaker naturel de l'estomac utilisant des dispositifs « vibratoires » pouvant être placés de manière mini-invasive au niveau de la paroi gastrique. Le rationnel de cette approche repose sur les expériences publiées concernant la stimulation électrique.

2. La rigidification de l'estomac par introduction de dispositifs spécifiques dans un tunnel créé dans la paroi gastrique à travers une technique d'endoscopie interventionnelle.

Remplacement: Pour tester l'hypothèse que la modulation de la motilité gastrique par stimulus mécanique soit efficace dans la réduction de la production de ghréline et de la prise alimentaire, le recours à l'animal est nécessaire. Le porc est le modèle de choix, car son anatomie viscérale est très proche de celle de l'homme permettant d'utiliser les mêmes techniques de chirurgie et/ou d'endoscopie et les mêmes instruments d'usage courants chez l'homme. De plus, s'agissant d'animaux omnivores ils ont un set hormonal similaire à celui des humains.

Réduction: le nombre total d'animaux à inclure dans le projet GAMMA est de 98. Le projet sera décliné en 3 phases ou Working Packages (WP).

1. WP1 (Etude biochimique et de survie): Il n'y a pas de données dans la littérature sur l'effet de la vibration sur la motilité gastrique permettant un calcul de l'échantillon a priori. Sur la base des études effectuées sur la stimulation électrique, et considérant comme endpoint la réduction de l'hormone de la faim « ghréline », 72 animaux seront inclus et séparés en 3 groupes différents (implant actif, implant non-actif et sham-operated).

2. WP2 (Validation animale) Dans le WP2, 16 porcs seront utilisés pour obtenir la validation finale du dispositif.

3. WP3 (Implantation endoscopique) : 10 porcs seront utilisés pour vérifier la faisabilité de l'implantation à l'aide d'un endoscope flexible du dispositif

Raffinement: les animaux recevront un protocole de soins post-opératoires comprenant une évaluation clinique quotidienne, des antidouleurs et des anti-inflammatoires et un régime standardisé. Des critères d'arrêt anticipé de l'expérimentation en cas de survenue d'une complication ont été identifiés.

5785. L'utilisation de certains additifs technologiques visant à améliorer la qualité des aliments en nutrition animale est aujourd'hui courante. Il est cependant nécessaire de vérifier que ces additifs n'ont pas d'effet négatif sur la santé, les performances et le métabolisme des animaux. C'est pourquoi des études de tolérance sont demandées dans les dossiers de demande d'autorisation d'utilisation de ces additifs. De plus, ces autorisations d'utilisation sont valables pour une période donnée, et, s'ils souhaitent prolonger les autorisations d'utilisation, les fournisseurs d'additifs doivent revalider l'innocuité des produits.

Cette étude rentre dans ce cadre, et consiste à réaliser une nouvelle étude de tolérance pour un additif (agent anti agglomérant) dont l'autorisation d'utilisation expire fin 2017.

Ce type d'étude de tolérance est aujourd'hui très cadré et standardisée, via des recommandations publiées par l'EFSA, en termes de types d'animaux à utiliser (l'étude de tolérance doit être réalisée sur des animaux concernés par l'utilisation de l'additif), de durée d'essai (42 jours minimum), de caractéristiques des traitements expérimentaux (3 traitements minimum), et de types de paramètres à mesurer (performances zootechniques et paramètres sanguins).

L'étude est donc réalisée en suivant ces recommandations. 3 lots de 8 taurillons (entre 10 et 15 mois d'âge) sont mis en essai: un lot contrôle sans additif, un lot recevant l'additif à la dose autorisée et recommandée, et un lot recevant l'additif à double dose. Les animaux sont suivis individuellement sur la croissance, la consommation d'aliment, les événements sanitaires, et le suivi de paramètres sanguins (via 3 prises de sang, au démarrage, au milieu et à la fin de l'essai), pendant 42 jours. Cet effectif a été défini comme l'effectif minimal permettant d'identifier comme significatives des baisses de performances signe d'intoxication potentielle. Les animaux sont logés en case collective (8 animaux par case), favorisant les comportements sociaux entre les animaux. Les cases sont sur litière paillée, avec un paillage renouvelé tous les jours, assurant une litière sèche et un confort de couchage. L'alimentation des animaux (individualisée via des auges peseuses) est surveillée quotidiennement, ainsi que leur comportement (présence à l'auge, ingestion, bonne rumination, absence de troubles de locomotion...). Les animaux ont un accès à volonté à un abreuvoir ainsi qu'à de la paille fraîche mise à disposition dans un râtelier, favorisant le comportement naturel de rumination.

Si un animal se blesse ou est malade pendant l'essai, une décision est rapidement prise avec un vétérinaire. Des points limites pour atténuer la douleur ou la souffrance éventuelle des animaux sont définis et appliqués strictement.

A la fin de l'essai, les animaux du lot témoin, ainsi que ceux du lot ayant reçu l'additif à la dose autorisée partiront dans le circuit commercial. Les 8 animaux qui auront reçu l'additif à double dose seront euthanasiés et ne partiront pas dans le circuit de commercialisation, sauf si le fournisseur obtient une autorisation de commercialisation par la DGCCRF, après avis de l'ANSES.

5786. La transplantation fait actuellement face à différents problèmes: manque d'organes avec des listes croissantes de patients en attente de greffe dont certains meurent avant de se voir proposer un organe. Le rejet à plus ou moins long terme du greffon constitue également un problème. Enfin certains immunosuppresseurs, empêchant le rejet d'organe présentent des effets secondaires importants à long terme. Différents modèles de recherche chez le primate-non-humain (PNH) peuvent mimer parfaitement des situations cliniques connues chez l'homme et permettent ainsi de tester différents protocoles thérapeutiques innovants en conditions précliniques.

Les inhibiteurs de calcineurine (CNI), molécules immunosuppressives, montrent actuellement une amélioration de la survie du greffon à 1 an, mais cette amélioration n'est plus vraie à 5 ans post-greffe. Cette différence de survie est principalement due à la néphrotoxicité des CNI utilisés à forte dose et également à l'apparition des anticorps anti-donneurs (préjudiciables au devenir du greffon) lorsque que les CNI sont utilisés à faible dose. De plus, la plupart des traitements utilisant des CNI sont associés au développement d'effets secondaires chez les patients transplantés tels que l'hypertension, l'hyperlipidémie, l'intolérance au glucose et la néphrotoxicité. C'est pourquoi, le projet développé ici s'inscrit dans une stratégie de réduction ou de remplacement des CNI par une molécule innovante en transplantation d'organe.

La molécule que nous souhaitons tester dans le modèle de transplantation rénale chez le primate, est un inhibiteur de Phosphatidylinositol-4-Kinase (PI4Ki). Cette molécule a préalablement été testée dans différents tests fonctionnels *in vitro*, montrant une inhibition des diverses réponses immunes. L'inhibiteur de PI4K a également été testé dans 2 modèles murins différents, montrant une prolongation de la survie du greffon cardiaque ainsi que de la greffe de peau. Des études d'immunisation chez le PNH ont également montré que cette molécule inhibait la réponse immune primaire empêchant la production d'anticorps. Dans ce projet, nous souhaitons tester de façon préclinique, en nous appuyant sur nos précédents résultats, cette molécule comme immunosuppresseur dans un modèle de transplantation rénale chez le PNH, dans une hypothèse 1) de réduction et/ou 2) de remplacement du traitement néphrotoxique (inhibiteur de calcineurine). Dans ce but, la molécule innovante sera utilisée à différentes doses, en combinaison avec 2 immunosuppresseurs différents actuellement utilisés chez les patients transplantés rénaux : un inhibiteur de calcineurine (IS) (bithérapie) et une molécule antiproliférative (IS) + une molécule anti-inflammatoire (corticoïde) (tri-thérapie), selon des temps de traitement différents et selon une organisation de travail en 3 phases.

Le nombre maximum d'animaux utilisés au cours de cette étude sera de 32 (donneurs et receveurs d'organes compris). Dans un souci de respect de la règle des 3R, les reins d'un même et seul donneur seront greffés simultanément à deux receveurs différents. Les principes de raffinement et de remplacement contribueront à réduire le nombre d'animaux utilisés tout au long du protocole. C'est-à-dire que les phases 1b, 2 et 3 du protocole ne seront réalisées que si les résultats obtenus au cours de la phase 1a sont conformes aux hypothèses de travail. Les groupes contrôles réalisés dans ce projet, ne seront pas refaits ultérieurement servant ainsi de contrôles historiques pour d'autres études en transplantation de rein, dans cette espèce, réalisées dans notre centre.

De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur des animaux, toutes les procédures de ce projet seront réalisées sous anesthésie générale et un traitement analgésique sera donné à chacun de façon adaptée en fonction de la procédure. La fréquence d'observation des animaux est doublée lors des expérimentations et consiste en des examens cliniques de l'animal notés sous forme de score clinique selon une échelle préétablie, permettant une prise en charge individuelle et adaptée. Les animaux seront hébergés avant protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental, les individus traités seront hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères.

5787. - Contexte : Les pathologies métaboliques (obésité, diabète de type 2, stéatose hépatique ou maladie du « foie gras » et leurs complications vasculaires (athérosclérose) sont la première cause de mortalité dans les pays industrialisés et sont en augmentation constante dans les pays en voie de développement. Ils représentent donc un enjeu majeur de santé publique et la compréhension fine des mécanismes cellulaires et moléculaires qui ont lieu au sein de l'organisme est indispensable pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques puis mettre au point de nouveaux médicaments.

Alors qu'il a très longtemps été considéré que ces maladies étaient seulement dues à des dérèglements du métabolisme des glucides (« sucres ») et des lipides (« graisses »), il est aujourd'hui admis que les cellules du système immunitaire (qui circulent dans le sang) sont présentes dans pratiquement tous les organes du corps, en particulier dans certains tissus spécialisés comme la rate et les ganglions) et l'inflammation jouent un rôle très important dans le déclenchement et la persistance de ces maladies.

De manière assez inattendue – mais logique à l'aune de ces découvertes récentes-, parmi les facteurs aggravant les pathologies, on trouve des maladies associées au système immunitaire comme l'asthme allergique, affectant principalement les poumons, et des maladies fréquentes de la peau comme la dermatite atopique et le psoriasis.

Aussi, comme, les cellules immunes sont donc des acteurs centraux à la fois des pathologies métaboliques et des pathologies inflammatoires de la peau et des poumons, élucider leur rôle précis dans ces deux groupes de pathologies et dans leurs interactions pourrait permettre, à terme, de traiter l'un et l'autre type d'affections.

But: Ce projet vise donc à d'étudier la contribution des cellules immunes dans les deux types de pathologies et dans l'aggravation de l'une par l'autre. Il s'agira notamment de déterminer comment certains facteurs régulent le développement et la fonction des cellules immunes dans le contexte de ces maladies. Ces facteurs sont d'une part certains récepteurs nucléaires (il s'agit de récepteurs à des dérivés de lipides qui, lorsqu'ils fixent ceux-ci, interagissent avec l'ADN dans le noyau de chaque cellule pour réguler leur fonction) et certains récepteurs membranaires (présents à la surface des cellules et sensibles aux molécules qui circulent dans les fluides corporels que sont le sang et la lymphe ou sont situées à la surface des cellules voisines.).

- Recours à l'expérimentation animale : Les pathologies métaboliques et/ou immunes impliquent de nombreux organes du corps et de nombreux types cellulaires circulant entre ces organes. Comme il est impossible de reproduire la complexité de ces interactions *in vitro*, l'expérimentation animale *in vivo* est indispensable pour reproduire de manière aussi réaliste que possible ces pathologies. En raison du grand nombre de lignées génétiquement modifiées disponibles et de la facilité relative avec laquelle il est possible d'en créer de nouvelles, la souris a été choisie comme modèle d'étude. Un nombre maximal de 25680 animaux sera utilisé pour ce projet. - Respect de la législation (Règle des 3 R). Le nombre d'animaux qui sera utilisé au cours de ce projet a été réduit au minimum en agissant à plusieurs niveaux.

Remplacement : S'il est impossible de remplacer l'expérimentation *in vivo* pour étudier les pathologies dans toute leur complexité, certains mécanismes cellulaires et moléculaires seront étudiés *in vitro*.

Réduction : L'utilisation de conditions les plus standardisées possibles (conditions d'hébergement, âge et sexe des animaux, groupes contrôles appariés, horaires de réalisation des expériences...) et l'entraînement et la dextérité du personnel impliqué dans l'expérimentation permettent de diminuer la variabilité individuelle des réponses des animaux et par voie de conséquence le nombre d'animaux nécessaires par groupe pour obtenir des résultats significatifs. De plus, un maximum d'organes est prélevé sur chaque animal afin d'obtenir un maximum de paramètres pour chaque expérience et ainsi éviter la répétition d'expériences pour l'obtention d'organes non initialement ciblés.

Raffinement : L'hébergement dans des conditions sanitaires optimales (exemptes d'organismes -opportunistes et- pathogènes spécifiques), l'enrichissement de l'environnement dans les cages (abris et « jeux »), le maintien des interactions sociales, l'utilisation de techniques non invasives, des produits anesthésiques et analgésiques optimaux, et la dextérité du personnel contribuent à réduire le stress durant toute la vie des animaux y compris durant l'expérimentation. Une surveillance quotidienne est également pratiquée.

5788. Problème majeur de santé publique avec 357 768 nouveaux cas estimés en 2010, les cancers sont devenus la première cause de mortalité en France et dans le monde (13% des décès). Pour comprendre le fonctionnement complexe de la cellule cancéreuse et faire ainsi progresser la prévention, le diagnostic et le traitement des cancers, il est indispensable de disposer de modèles intégrés animaux proches de l'Homme, permettant d'évaluer *in vivo* l'interaction de ces cellules avec leur environnement. Les souris représentent ainsi un modèle de choix pour les études menées en cancérologie.

Les cancers sont caractérisés par des altérations portant sur de nombreux gènes. Après une première étape d'analyse *in vitro*, le recours à la souris génétiquement modifiée permet de comprendre le rôle de ces gènes au niveau d'un organisme entier. Notre projet consiste à développer de nouvelles lignées murines pour permettre aux chercheurs d'avoir les outils les plus adaptés à leurs études. Bien évidemment, les lignées ne sont créées que si elles présentent un intérêt biologique potentiel et si elles n'existent pas par ailleurs dans d'autres établissements de recherche. Notre expertise nous permet d'avoir d'excellents résultats et donc de minimiser le nombre d'animaux nécessaires.

Nous prévoyons pour l'année à venir d'utiliser 1402 souris.

Dans un souci de raffinement, toutes les mesures seront prises pour éviter le stress et la douleur des animaux. Ainsi, les gestes techniques sont assurés par du personnel qualifié, avec un recours à l'analgésie lors des procédures chirurgicales.

5789. Les maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer, sont dues à la perte accélérée de cellules nerveuses, les neurones, et de leurs connections, les synapses, dans les régions cérébrales comme l'hippocampe et le cortex. La neurotoxicité des peptides bêta-amyloïde, alpha-synucléine et Tau est impliquée dans la perte synaptique et neuronale de ces maladies. Ces protéines s'agrègent dans certaines parties du cerveau des patients touchés par ces maladies, ce qui engendre la mort des neurones. La prévalence actuelle de ces pathologies ne peut qu'augmenter puisqu'aucune solution thérapeutique réellement efficace n'a encore été validée pour préserver ou restaurer la perte des neurones.

Pour ce projet, nous voudrions faire la preuve d'efficacité de candidats médicaments (petites molécules, peptides, anticorps, ingrédients alimentaires) en utilisant une plateforme d'analyse préclinique *in vivo* (souris) visant à évaluer leur effet protecteur, empêchant l'agrégation des peptides neurotoxiques.

Afin d'optimiser l'efficacité des criblages de molécules, de réduire les risques d'échec des expérimentations chez l'animal et de diminuer le nombre d'animaux impliqués dans les études précliniques (réduction), les candidats médicaments potentiels auront été évalués préalablement sur des cultures de cellules nerveuses. - Seuls les composés ayant montré une efficacité neuroprotectrice *in vitro* sont alors testés *in vivo* (ce qui permet de réduire considérablement le nombre d'animaux impliqués dans les tests *in vivo*, si le test *in vitro* précédent n'était pas effectué).

L'étude *in vitro* des effets des candidats médicaments sur l'agrégation n'est pas possible car le phénomène d'agrégation et de propagation de ces agrégats dans certaines zones du cerveau nécessitent le cerveau entier.

Les phases précoces de ces maladies neurodégénératives sont modélisées chez la souris (C57Bl/6J, lignée de souris classiquement utilisée en neurobiologie) grâce à une injection intracérébrale unique, effectuée dans des conditions aseptiques et sous anesthésie générale, de peptide neurotoxique. Les animaux sont traités par un anti-inflammatoire ayant aussi des propriétés analgésiques, avant et après la chirurgie stéréotaxique (raffinement) afin de minimiser la douleur. Ainsi, après leur réveil, suivant la chirurgie, les animaux ne sont pas dissociables d'une souris normale n'ayant pas subi de chirurgie (raffinement). Les animaux exposés à ces peptides développent des agrégats, 30 jours après l'injection cérébrale, caractéristiques des phases précoces des maladies neurodégénératives.

Dans le cas où une altération de l'état général de l'animal, ou qu'une inflammation due à l'injection intracérébrale ou aux candidats médicaments soit notée, l'animal sera mis à mort immédiatement. Tous les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude. Notre modèle nous permet d'obtenir des réponses rapides et très solides quant aux effets neuro-protecteurs de candidats médicaments pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives. Ce projet de cinq ans nécessite 900 souris pour l'étude de 150 composés en 5 ans.

Les avantages des modèles développés (par rapport aux modèles de souris transgéniques classiquement utilisés pour ce genre de développement) sont divers : optimisation du nombre de composés à tester chez l'animal (réduction du nombre de composés potentiellement inactifs et donc d'animaux), optimisation du nombre d'animaux par groupe expérimentaux (réduction) tout en permettant d'obtenir un effet statistique. Les enjeux socio-économiques du projet sont évidents tant le développement de pathologies neurodégénératives liées à l'âge impacte les sociétés occidentales. La découverte et la validation de thérapie(s) pour la MA est un des enjeux majeurs pour la communauté scientifique (publique et privée).

5790. Problème majeur de santé publique avec 357 768 nouveaux cas estimés en 2010, les cancers sont devenus la première cause de mortalité en France et dans le monde (13% des décès). Pour comprendre le fonctionnement complexe de la cellule cancéreuse et faire ainsi progresser la prévention, le diagnostic et le traitement des cancers, il est indispensable de disposer de modèles intégrés animaux proche de l'Homme, permettant d'évaluer *in vivo* l'interaction de ces cellules avec leur environnement. Les souris représentent ainsi un modèle de choix pour les études menées en cancérologie.

Les cancers sont caractérisés par des altérations portant sur de nombreux gènes. Après une première étape d'analyse *in vitro*, le recours à la souris génétiquement modifiée permet de comprendre le rôle de ces gènes au niveau d'un organisme entier. Notre projet consiste à développer de nouvelles lignées murines pour permettre aux chercheurs d'avoir les outils les plus adaptés à leurs études. Bien évidemment, les lignées ne sont créées que si elles présentent un intérêt biologique potentiel et si elles n'existent pas par ailleurs dans d'autres établissements de recherche. Notre expertise nous permet d'avoir d'excellents résultats et donc de minimiser le nombre d'animaux nécessaires.

Nous prévoyons pour l'année à venir d'utiliser 2407 souris.

Dans un souci de raffinement, toutes les mesures seront prises pour éviter le stress et la douleur des animaux. Ainsi, les gestes techniques sont assurés par du personnel qualifié, avec un recours à l'analgésie lors des procédures chirurgicales.

5791. La mise au point d'un traitement pour le diabète est cruciale pour ralentir la progression de la maladie et ainsi éviter les complications. Chez le patient atteint du diabète d'origine génétique, la production d'insuline est normale dans l'enfance, mais celle-ci réduit avec l'âge par un mécanisme inconnu malgré 25 ans de recherche sur le sujet. Le diabète de type 2 lui, se caractérise par une réduction de sécrétion d'insuline, une augmentation de sécrétion de glucagon et de production de glucose. Il a été découvert récemment, que les cellules pancréatiques (alpha) possèdent des gènes nécessaires à une sécrétion normale de l'hormone glucagon (SGTL2 et HNF4).

Nous proposons, dans ce projet, d'étudier des souris dont le gène HNF4 est supprimé en montrant que celle-ci ont un taux de glucagon sanguin supérieur.

Ensuite, nous testerons l'effet de molécules qui semblerait avoir un effet important, sur ces mêmes animaux.

Au total, 180 animaux seront nécessaires pour finaliser ce projet.

Afin de respecter les "3R", nous réduirons au maximum le nombre d'animaux afin que cela soit significativement probant. En parallèle, des études menées sur des cellules en culture permettront d'obtenir certaines réponses, toutefois le recours à l'animal sera nécessaire pour connaître les effets physiologiques.

Enfin, en matière de raffinement, les animaux seront hébergés dans des conditions idéales (respect des rythmes circadiens, nourriture, eau ad libitum) et techniques par du personnel formé et compétent.

5792. Nous proposons une formation des personnels amenés à appliquer des procédures expérimentales aux animaux, ouverte aux techniciens des laboratoires publics et privés dans le cadre de la formation continue, ainsi qu'à des étudiants en cursus initial de licence professionnelle.

Ce type de formation réglementaire à l'expérimentation animale doit permettre l'acquisition de compétences théoriques et pratiques permettant la manipulation d'animaux dans le respect de leur bien-être.

Conformément à l'agrément de cette formation par le Ministère de l'Agriculture, il s'agira d'enseigner aux étudiants de bonnes pratiques pour la réalisation des méthodes de préhension, de contention, d'injections, de prélèvement sanguin et d'anesthésie chez le rat et la souris de laboratoire. L'apprentissage de techniques d'élevage, telle que la réalisation de frottis vaginaux, vient compléter ces compétences. Tous ces actes sont de sévérité légère pour l'animal.

Pour répondre à cet objectif, les travaux pratiques que nous souhaitons réaliser permettent une familiarisation progressive des techniciens avec l'animal de laboratoire. Ils sont réalisés en effectif réduit, sous la tutelle d'enseignants expérimentés portant grande attention au bien-être de l'animal. Des enseignements plus théoriques d'éthique, d'éthologie, de physiologie du stress et de la nociception viennent compléter ces connaissances afin que les étudiants soient en mesure d'adapter leur pratique au comportement de l'animal qu'ils manipulent.

Le choix des rongeurs s'explique par l'utilisation majoritaire de ces modèles animaux en expérimentation, les techniciens en formation étant essentiellement amenés à manipuler ces espèces dans leur entreprise.

A raison d'une session de formation par an, pour un maximum de 28 apprenants, nous aurons recours à l'utilisation maximale de 150 souris et de 150 rats pour cinq années de formation. Ceci correspond à un animal de chaque espèce par étudiant, ce qui nous semble nécessaire à un bon apprentissage. Un animal surnuméraire est également prévu pour les démonstrations réalisées par l'enseignant. Cependant, afin de limiter la manipulation de ces animaux et d'en restreindre l'effectif, des supports vidéos se substitueront à certaines démonstrations. De plus, les actes pratiqués étant de sévérité légère, ces animaux ne seront pas euthanasiés mais seront réutilisés pour d'autres formations se déroulant au sein de notre établissement, dans le cadre de projets autorisés, ce qui va dans le sens d'une réduction du nombre d'animaux manipulés.

5793. Le mélanome est une tumeur issue de la transformation maligne de mélanocytes, cellules responsables de la synthèse des pigments photo-protecteurs contre les UV. Nous nous intéressons dans ce projet à 2 types de mélanomes : les mélanomes cutanés et les mélanomes oculaires.

Les mélanomes cutanés sont des tumeurs malignes qui se développent à partir des mélanocytes de la peau. Ces tumeurs extrêmement agressives peuvent être traitées de façon relativement simple par exérèse chirurgicale lorsqu'elles sont prises en charge précocement. Cependant, leur haut potentiel métastatique provoque l'apparition fréquente de métastases ayant pour conséquence un pronostic vital très négatif. Les mélanomes oculaires sont issus de la transformation maligne des mélanocytes de l'œil et représentent la tumeur oculaire la plus répandue chez l'adulte. La majorité de ces mélanomes ont pour origine l'uvéa (95% des cas), que ce soit l'uvéa postérieure (90% de la choroïde, 5% du corps ciliaire) ou antérieure (5% provenant de l'iris). Si la tumeur primaire peut être traitée par énucléation ou irradiation, il a été mis en évidence que des micro-métastases se propageaient via la circulation sanguine plusieurs années avant le diagnostic. Ces métastases sont fortement résistantes aux traitements par chimiothérapie ainsi qu'à la radiothérapie. L'absence de traitement efficace pour ces tumeurs entraîne une mortalité à 90% dans les 6 mois qui suivent la découverte des métastases.

Ce projet vise à tester et évaluer l'efficacité de thérapies personnalisées dans le cadre des mélanomes cutanés et oculaires. La mise en culture de cellules dérivées de tumeurs est indispensable pour l'étude du fonctionnement de ces cellules cancéreuses ainsi que l'évaluation de l'efficacité de nouvelles thérapies. Cependant la mise en culture de ces cellules présente un taux d'échec relativement important et de plus les effets observés *in vitro* sont également éloignés du contexte physiologique. Pour améliorer cela et pouvoir proposer des traitements personnalisés pertinents, nous désirons mettre en place un modèle de souris avatars ou PDX (Patient-Derived Xenograft). Le principe des souris « avatars » repose sur la réalisation d'une xénogreffe de cellules issues des biopsies de patients dans des souris immuno-déficientes, ici les souris NSG. Les cellules greffées vont ensuite proliférer et former une tumeur au sein de l'animal. Ces tumeurs sont prélevées, dissociées à nouveau puis réinjectées dans plusieurs souris permettant ainsi de tester différents traitements sur des souris portant une tumeur ayant la même origine. Ces souris peuvent donc être utilisées afin de tester l'efficacité de différentes drogues sur les tumeurs de manière personnalisée et dans un contexte *in vivo* plus relevant que les tests réalisés sur des modèles de culture cellulaire *in vitro*. Les souris seront surveillées au cours des phases de croissance tumorale ainsi que des phases de traitement afin de prendre en compte leur bien-être ainsi que leur éventuelle souffrance. Suite à la greffe des cellules en localisation sous-cutanée au niveau du flanc, les cellules forment une tumeur localisée sous la peau qui ne forme pas de métastases limitant ainsi les dommages subis par l'animal. Dans ce modèle de souris NSG et avec ce type de cellules tumorales le

taux de réussite de prise tumorale avoisine les 100% et permet ainsi de limiter le nombre de souris utilisées. En ce qui concerne le remplacement, les traitements évalués *in vivo* seront préalablement choisis en fonction de tests *in vitro* réalisés au préalable ainsi que sur le profil mutationnel des tumeurs étudiées. Dans le cadre de la réduction du nombre d'animaux utilisés, ces analyses préalables à l'expérimentation sur l'animal permettent de mieux cibler les traitements à évaluer *in vivo* et ainsi réduire le nombre d'animaux utilisés au cours de ce projet. Ce nombre est évalué à 3900 souris pour une durée de 5 ans. En termes de raffinement, les souris seront observées quotidiennement par les animaliers et de façon exhaustive deux fois par semaine par les demandeurs du projet afin de prendre en charge tout signe de douleur, de stress ou d'inconfort.

L'objectif de ce projet est de proposer des alternatives aux patients en échec thérapeutique dans le cadre du mélanome cutané ainsi que des nouveaux traitements dans le cadre du mélanome oculaire.

5794. Les infections vaginales (vaginites/vaginoses) sont des infections très courantes puisqu'on estime que plus de 75 % des femmes auront au moins un épisode dans leur vie. Ces infections sont caractérisées par un déséquilibre de la flore vaginale qui est, en situation normale, dominée par des lactobacilles. Les infections peuvent être asymptomatiques et se caractérisent, entre autres, par des sécrétions vaginales à pH>4,5. Les femmes ayant une vaginose bactérienne ont un risque accru de contracter des maladies sexuellement transmissibles et surtout d'avoir des complications, en cas de grossesse, comme une infection intra-utérine et d'accoucher avant terme. Parmi les bactéries mises en cause dans la vaginose, *Gardnerella vaginalis* semble être la plus fréquemment impliquée.

Nous souhaitons tester si une modification du mucus peut favoriser la colonisation par un lactobacille et prévenir la colonisation utérine par une bactérie pathogène et la mise bas avant terme chez des souris.

Cette étude sera réalisée avec des modèles de souris (souris transgénique, colonisation bactérienne) qui reproduisent ce qui est observé chez la femme. La mise en évidence des interrelations entre flore bactérienne, mucus vaginal et utérin et effets sur des naissances avant terme ne peuvent être étudiés que sur un modèle intégré donc *in vivo*. Aucune alternative *in vitro* n'existe à ce jour. Le nombre de souris à utiliser sera réduit au minimum mais ce nombre doit être suffisant pour garder la puissance d'analyse. Les procédures utilisées sont non-invasives et seront réalisées par des personnels formés et autorisés. Les souris seront hébergées dans une animalerie agréée et contrôlée (exempt d'organismes et pathogènes spécifiques avec une surveillance quotidienne voire biquotidienne). Les souris sont hébergées par 4-5 souris par cage, dans un environnement enrichi (jeux). Le nombre total de souris sera au maximum de 432. Toute expérimentation sera réalisée sur souris anesthésiée quand nécessaire.

5795. L'autisme est un trouble précoce du développement qui s'accompagne généralement de déficits cognitifs altérant les apprentissages et l'intégration sociale. Si à l'heure actuelle l'autisme ne se guérit pas, différents médicaments peuvent aider à réduire les comportements répétitifs, l'hyperactivité, l'agressivité, les troubles de la mémoire ou du comportement social.

Au sein de notre laboratoire, nous travaillons sur un gène de susceptibilité lié à l'autisme : le gène SHANK3. Ainsi des mutations du gène SHANK3 entraînent des troubles du comportement social et des déficits cognitifs qui rappellent les traits caractéristiques de l'autisme. Nous nous proposons donc d'étudier le rôle de Shank3 dans la mise en place du comportement social et des réseaux neuronaux de l'hippocampe. Nous utiliserons une lignée de souris mutante : la lignée « Shank3flox/flox » dont le gène SHANK3 est muté. Pour ce projet, nous réaliserons des chirurgies stéréotaxiques afin d'invalider le gène SHANK3 chez ces animaux, qui seront ensuite transférés dans un autre établissement utilisateur pour une étude d'électrophysiologie *in vivo*.

Notre projet repose sur une approche intégrée nécessitant le fonctionnement du cerveau dans son intégrité ce qui reste encore impossible à modéliser. Par conséquent, nous pensons qu'il n'existe pas de remplacement disponible à notre modèle expérimental qui permettrait d'atteindre les objectifs scientifiques du travail proposé.

Pour supprimer l'angoisse, la détresse ou la douleur subie par les animaux au cours de l'expérience, les animaux sont élevés en cage collective enrichie, observés quotidiennement et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place. Suite à la procédure de chirurgie stéréotaxique, les animaux seront transférés dans un autre établissement pour subir une procédure d'électrophysiologie *in vivo*. Nous considérons qu'un nombre minimum de 50 animaux est nécessaire pour chaque condition expérimentale. Notre projet portera donc sur 2 lots de souris et nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 100 souris.

5796. La consommation de viande rouge et de charcuteries est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. Les données épidémiologiques ont été consolidées par des études du laboratoire à l'aide de modèles animaux. Les mécanismes mis en jeu impliquent l'oxydation des graisses alimentaires par le fer contenu dans la viande rouge. Une des hypothèses implique la modification de la paroi du côlon par les composés toxiques issus de l'oxydation des graisses alimentaires comme le 4-hydroxynonéal pouvant aboutir à une inflammation du côlon et à une modification de la perméabilité intestinale. Le but de ce protocole est d'évaluer *in vivo* - car c'est le seul moyen de tenir compte de la multiplicité et la diversité des voies métaboliques et physiologiques impliquées - l'impact d'une administration par voie orale de 4-hydroxynonéal sur l'inflammation et la perméabilité intestinale. 3 lots de 12 rats seront utilisés. Ce nombre d'animaux a été étudié de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés tout en étant suffisant pour avoir des analyses statistiquement fiables. Les animaux sont hébergés en animalerie dans un environnement rigoureusement contrôlé, avec une surveillance et des soins quotidiens par du personnel qualifié, de façon à leur assurer les meilleures conditions de bien-être et de santé.

5797. La population mondiale âgée de 60 ans et plus a doublée depuis 1980 et devrait atteindre deux milliards d'ici 2050. Malheureusement, cette augmentation de la longévité ne semble pas forcément s'associer à un vieillissement dit « réussi » ou en bonne santé. De ce fait, l'allongement de cette durée de vie peut être associé à une qualité de vie altérée, à la fragilité, la dépendance, et l'institutionnalisation des séniors avec un coût de santé publique augmenté. Un des facteurs fortement corrélé à la perte de mobilité, de la fragilité et de la dépendance des seniors est la sarcopénie i.e perte de masse et de fonction musculaire. On sait aujourd'hui que la sarcopénie, est le résultat d'un défaut de régulation du métabolisme des acides aminés (synthèse et dégradation des protéines musculaires) dont l'origine est multifactorielle : l'inflammation à bas bruit, la lipotoxicité (obésité, régimes western) ou l'insulino-résistance couplés ou non à la malnutrition, la sédentarité ou un état catabolique/pathologique. De plus, les séniors perdent la capacité de récupérer les masses musculaires perdues lors d'un incident de vie (alitement, infections, immobilisation...). Les dérèglements métaboliques constatés chez les sujets âgés sont la plupart du temps corrélés avec la présence d'une inflammation à bas bruit et appelée « inflammaging ». Parmi les causes de l'« inflammaging », un défaut de séquestration des composés bactériens présents dans l'intestin et le colon des individus est suspecté, ainsi que l'entrée dans la circulation systémique de ces composés provoquant une inflammation généralisée de faible intensité. En parallèle, il a également été montré une dérive dans la composition phylogénétique du microbiote chez les sujets âgés, associée au développement de désordres métaboliques comme l'insulino-résistance, à une plus grande sensibilité à des pathologies digestives comme une augmentation de la perméabilité intestinale et le syndrome du côlon irritable.

Dans ce projet, nous souhaitons étudier l'impact d'une stratégie nutritionnelle basée sur l'effet bénéfique potentiel de souches probiotiques lactiques « *Streptococcus thermophilus* » sélectionnées pour leurs propriétés anti-inflammatoires *in vitro*. Pour cela, nous allons induire chez des animaux adultes et âgés une altération du microbiote intestinal et une inflammation intestinale chronique avec du Dextran Sulfate de Sodium (DSS). Nous avons déjà montré qu'un tel traitement génère une inflammation intestinale et systémique associée à une perte de masse musculaire chez l'adulte. Les animaux seront étudiés pendant la période d'inflammation mais aussi pendant la période de récupération post inflammatoire conjointement ou pas avec l'ingestion des probiotiques. Nous évaluerons l'impact des probiotiques sur l'inflammation intestinale et systémique, sur la masse musculaire, l'insulino-résistance et sur les capacités de l'animal à récupérer après l'épisode inflammatoire. A notre connaissance, aucune étude de l'impact de l'inflammation intestinale chronique n'a été réalisée chez l'âge ni sur les capacités de récupération post inflammatoire intestinale chez l'adulte et l'âge.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Nous ne pouvons pas remplacer cette expérimentation animale par une expérimentation *in vitro* ou *ex vivo* mais nous avons réduit le nombre d'animaux en optimisant le nombre d'animaux par lots. Nous mettrons en œuvre des méthodes permettant de limiter au maximum la douleur et la souffrance de nos animaux, en utilisant des cages adaptées, une anesthésie avant sacrifice et en surveillant quotidiennement les animaux afin de prendre rapidement des décisions de soins ou d'exclusion d'animaux en souffrance. Le projet prévoit la mise en place d'une intervention nutritionnelle chez le rat adulte (n=108) et âgé (n=105). Une étude pilote sur rats âgés (n=20) sera mise en place car aucune donnée bibliographique n'est encore disponible. Ceci nous permettra d'ajuster les doses de DSS et d'évaluer le comportement des animaux sous ce type de protocole qui n'a pas encore été réalisé sur cette tranche d'âge.

In fine, l'étude proposée permettra de fournir des résultats scientifiques sur l'intérêt potentiel de certains probiotiques dans le maintien et la récupération musculaire des personnes âgées ou malades.

5798. Les études de pharmacocinétique (PK) chez l'animal sont nécessaires et demandées par les autorités de santé afin de pouvoir réaliser des études cliniques avec un maximum de sécurité. Elles permettent de déterminer les doses, la fréquence des administrations et de calculer la marge de sécurité. Elles permettent également d'identifier et de caractériser les potentiels produits dérivés associés (métabolites) et leur impact sur le sujet traité.

Les agences réglementaires internationales (European Medicine Evaluation Agency : EMEA et Food drug Administration : FDA) imposent d'étudier la pharmacocinétique chez l'animal vivant entier (une espèce de rongeur et une espèce non-rongeur), afin de relier une activité pharmacologique ou une toxicité à des paramètres tels qu'une exposition plasmatique (ou sanguine) du produit d'intérêt (futur médicament).

Les espèces animales sont celles utilisées dans les études de Pharmacologie de Sécurité ou de Toxicologie réalisées pour prédire les données *in vivo*.

Ce projet est mené dans le respect de la règle des 3Rs.

Des méthodes alternatives *in vitro*, *ex vivo* ou *in silico* qui étudient un aspect de l'absorption, du métabolisme ou de l'élimination sont également mises en œuvre. Cependant, ces méthodes n'étudient pas les mécanismes dans leur globalité et le recours à l'animal entier reste incontournable.

Les études PK sont conduites chez le rat (et/ou la souris) et chez le chien (et/ou le primate non humain : PNH) à des doses pharmacologiques non toxiques, en respectant les recommandations éthiques internes spécifiques à chaque espèce et relatives aux modalités d'hébergement, d'enrichissement du milieu, d'expérimentation et visant à prévenir toute douleur ou détresse de l'animal. Une réduction du nombre d'animaux utilisé dans ce projet est obtenue grâce au support en biostatistique apporté pour optimiser les effectifs en fonction des design d'étude, à la diminution des volumes sanguins prélevés liée à l'optimisation des méthodes de dosages et à la réutilisation potentielle de non rongeurs dans les études.

Espèces animales	Nombre maximum d'animaux utilisés sur 5 ans
Souris	23 100
Rat	18 045
Lapin	420

5799. Les infections par le protozoaire *Cryptosporidium parvum* ont une très forte prévalence à travers le monde, conduisent à des pertes économiques importantes chez les ruminants et affectent aussi la santé humaine. Ce parasite se développe dans les cellules intestinales des animaux et provoque des diarrhées pouvant conduire dans certains cas à la mort. Devant l'absence de vaccin (en santé humaine ou vétérinaire) et de traitement totalement efficace, il est nécessaire de rechercher de nouveaux moyens de contrôle. L'établissement de la transgénèse, technique permettant la modification du génome, chez *C. parvum*, est un prérequis pour le développement de souches parasitaires avirulentes et pour la validation de nouvelles cibles thérapeutiques. Les essais de modification génétique par transfection chez *C. parvum* se sont longtemps révélés infructueux mais une équipe américaine est enfin parvenue à valider une technique de transgénèse pour ce parasite en 2015. Cette méthode requiert une étape de sélection *in vivo* (en modèle murin) juste après la transfection pour permettre aux parasites recombinants d'effectuer la fin de leur cycle de développement. De plus, seul le stade parasitaire 'sporozoïte' peut être transfecté par cette technique. Or, les sporozoïtes libres sont fragiles et ne peuvent pas être inoculés par voie orale, ce qui impose de réinjecter ces parasites transfectés directement dans l'intestin de souris immunodéficientes à l'aide d'une technique simple de chirurgie.

Ce projet a pour objectifs de (i) valider la méthode d'inoculation des parasites transfectés par chirurgie abdominale à l'aide de vétérinaires référents, (ii) de former le personnel de l'équipe amené à réaliser ces expérimentations et de permettre la construction de souches parasitaires de *C. parvum* recombinantes dans le cadre d'un projet de recherche déjà financé, (iii) de maintenir ces souches parasitaires générées par multiplication *in vivo*. Ce programme de recherche permettra de générer des souches recombinantes pour de multiples applications (vaccination, recherche de facteurs de virulence, impact de la réponse immunitaire adaptative, suivi du parasite dans les tissus infectés).

Le projet est demandé pour une période de 3 ans. La validation de la méthode sera facilitée par la visite d'une chercheuse de l'équipe dans le laboratoire ayant mis au point la technologie en Janvier 2017 pour suivre la mise en œuvre complète d'une expérimentation (de la transfection à la ré-inoculation aux souris). Vingt souris immunodéficientes (IFN γ -/-) seront utilisées par an pour la chirurgie (soit 60 souris), ainsi que 240 souris au total pour la multiplication des souches générées, soit 300 souris au total sur les 3 ans du projet.

Remplacement : la chirurgie pour inoculer les sporozoïtes est indispensable pour conserver ces formes fragiles qui ne survivraient pas au passage dans l'estomac après une inoculation par voie orale. Tous les essais d'alternatives à la chirurgie testés dans le laboratoire américain sont restés infructueux (inoculation par voie orale ou rectale, inoculation sur la membrane d'œufs embryonnés, etc.).

Réduction : Le fait que toutes les étapes de la technique aient été préalablement mises au point et optimisées dans un laboratoire américain nous aidera à utiliser le nombre minimal d'animaux pour sa mise en place au sein de notre établissement, d'autant que l'un de nos chercheurs a fait un séjour dans ce laboratoire américain en janvier 2017 pour apprendre et suivre la procédure dans son intégralité.

Raffinement : Les souris seront groupées par nombre de 4 par cage avant et après chirurgie avec un enrichissement du milieu (feuilles de sopalain dans les cages). Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie générale suivie d'un traitement analgésique approprié à la technique et à l'espèce.

5800. La Stéatose Hépatique Non Alcoolique (NASH) est une pathologie inflammatoire, susceptible d'évoluer vers la fibrose et la cirrhose. La cirrhose peut se compliquer de carcinome hépatocellulaire, qui représente 90% des cancers primitifs du foie. Les principaux facteurs de risque de développer une stéatose hépatite non alcoolique incluent le surpoids (indice de masse corporelle supérieure à 25kg/m²), l'augmentation du périmètre abdominal, l'intolérance au glucose et les anomalies des triglycérides.

Ce processus d'inflammation hépatique est complexe. Il met en jeu notamment des cellules clefs, les macrophages. Il a été montré que notre gène d'intérêt est surexprimé dans cette pathologie inflammatoire. L'expérimentation *in vitro* ne permet pas de répondre à toutes les questions. Seule l'expérimentation animale permet d'étudier le rôle des macrophages en conditions physiologiques et physiopathologiques et d'observer les effets de l'invalidation de notre gène d'intérêt dans son ensemble.

Dans un premier temps nous traiterons toutes les souris pour invalider spécifiquement notre gène d'intérêt dans le foie et les cellules hématopoïétiques. Ensuite les souris subiront différentes procédures pour induire une réponse inflammatoire qui nous permettra alors de procéder à plusieurs études sur les macrophages, le foie, tout en réalisant des dosages sanguins.

Le nombre de souris utilisées sera de 192. Nous utiliserons deux lignées de souris génétiquement modifiées : une lignée qui servira de contrôle et l'autre dans laquelle l'invalidation spécifique de notre gène d'intérêt dans le foie et les cellules hématopoïétiques sera effective. Nous cherchons ainsi à valider *in vivo* l'implication de notre gène d'intérêt dans le processus d'inflammation et mieux comprendre interaction sur les macrophages.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre de souris utilisées sera réduit au minimum : analyses de paramètre multiples pour chaque souris et utilisation de tests statistique adaptés. Pour s'assurer du « bien-être » des souris, elles bénéficieront de coton et de « maisons » en carton afin de les occuper et afin qu'elles puissent se construire un « nid ». Nous ne pourrions pas injecter d'antalgique ou d'anti-inflammatoire qui risquent d'interférer avec nos résultats sur la réponse inflammatoire, toutefois les souris seront sous surveillance journalière avec des phases de très haute surveillance. Des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipés de l'animal si nécessaire.

A terme les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes qui mènent à la surexpression de notre gène d'intérêt observée notamment dans le foie de patients atteints de Stéatose Hépatique Non Alcoolique (NASH) Ce travail

devrait permettre de démontrer si notre molécule d'intérêt représente une piste de recherche thérapeutique pour le traitement de pathologies associées à une stéatose hépatique ainsi que pour le traitement de pathologies inflammatoires.