



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

Résumés non techniques des projets autorisés (41)

4101. Notre cerveau reçoit à chaque instant une multitude d'informations en provenance de nos cinq sens, que nous devons gérer en parallèle avec les buts et objectifs que nous poursuivons. Toutes ces informations, externes et internes, entrent en compétition. Parce que notre esprit ne peut appréhender que quelques éléments à la fois et qu'il a besoin de temps pour le faire, nous dépendons d'une fonction essentielle, l'attention. Elle est là pour sélectionner l'information pertinente pour la tâche à accomplir en excluant tout le reste. C'est elle qui nous permet de retrouver un ami dans une foule ou notre téléphone portable dans un sac ou dans la maison. Parce qu'elle préside à tous les instants de notre vie éveillée, c'est une fonction éminemment faillible. La plupart du temps ces défaillances sont seulement ennuyeuses. C'est le cas lorsque l'on ne voit pas le téléphone ou les clés placées juste sous notre nez. Dans d'autre cas, les défaillances de l'attention ont des conséquences graves comme en témoigne les accidents de la route liés au téléphone au volant par exemple. Comprendre comment le cerveau contrôle l'attention c'est donc comprendre une fonction qui est au cœur même de la vie de chacun d'entre nous. Ce savoir a de multiples applications pour la société et pour la santé. Pour la société, comprendre comment le cerveau fait attention est crucial pour optimiser l'éducation des enfants en âge scolaire ainsi que les performances des adultes dans le milieu du travail. Il est souvent exiger de nous, enfants ou adultes, de "faire attention" sans que jamais personne ne nous ait expliqué comme l'attention fonctionne, quels sont ses pouvoirs et ses limites. Pour la santé, comprendre l'attention est important pour améliorer la qualité de vie des patients souffrant de troubles pathologiques de l'attention. C'est le cas des patients hémi-négligents qu'une lésion cérébrale droite rend incapables de faire attention à la moitié gauche du monde et de leur corps, ou encore des enfants, adolescents et adultes atteints de TDAH (trouble déficitaire de l'attention avec ou sans hyperactivité) qui ont le plus grand mal à se concentrer assez longtemps sur une tâche pour la mener à bien. Depuis toujours, le singe macaque nous a appris beaucoup sur comment le cerveau fait attention de par sa grande proximité avec l'homme.

Quels sont les avantages potentiels du projet (en quoi la science peut progresser ou en quoi les humains ou les animaux peuvent bénéficier du projet) ?

Le présent projet étudie les modulations de l'attention par deux facteurs, l'un pharmacologique, l'autre social. Pour le facteur pharmacologique, l'objectif est de déterminer le mécanisme d'action de deux molécules (la noradrénaline et la dopamine). On les sait efficaces pour soulager les troubles d'attention du TDAH sans aujourd'hui comprendre comment elles agissent sur le cerveau pour générer cet effet. On sait que les étudiants en consomment illégalement pour améliorer leurs performances dans des cursus compétitifs, mais on ne sait quelles peuvent être les conséquences sur la santé de cette consommation. On ne sait pas non plus si elles pourraient soulager les troubles patients hémi-négligents pour lesquels nous n'avons aujourd'hui aucun traitement. Pour le facteur social, la psychologie sociale a établi que la simple présence des autres modifie notre attention. Il faut établir dans quel cas la présence des autres nous aide, et dans quel cas elle nous perturbe. Il faut aussi élucider les mécanismes par lesquels la simple présence des autres modifie le fonctionnement du cerveau.

Quelle(s) espèce(s) et nombre approximatif d'animaux est-il prévu d'utiliser ?

Le projet impliquera au maximum 12 macaques rhesus adultes des deux sexes.

Compte tenu de ce qui est fait aux animaux, quel sont les effets néfastes attendus sur les animaux, le degré prévu de sévérité, et le sort final des animaux.

Deux des trois procédures utilisées : l'entraînement des animaux par renforcement positif à effectuer des tâches attentionnelles et l'injection occasionnelle dans le muscle d'agents augmentant pour une heure ou deux la noradrénaline et/ou la dopamine sont des procédures non invasives de sévérité légère. La troisième procédure utilisée, la neuroimagerie est, elle, de sévérité soit légère, soit modérée, en fonction du dispositif utilisé pour minimiser les mouvements de la tête. Dans les deux cas, les animaux retrouvent leur état général normal et leur bien être habituel à la fin du projet et sont conservés.

Application des 3 Rs :

1. Remplacement (pourquoi les animaux doivent être utilisés et pourquoi des alternatives non animales ne peuvent pas être utilisées). Les grandes fonctions du cerveau, la perception, les mouvements, l'intelligence, l'attention, la mémoire, etc. ne peuvent pas être exprimés par des cellules, seulement par des hommes ou des animaux.

2. Réduction (comment l'utilisation du nombre minimum d'animaux est garantie). Le principe de réduction est garanti par des calculs statistiques qui déterminent, pour chaque procédure, combien d'animaux sont nécessaires pour assurer la validité scientifique des résultats. En général, l'imagerie du cerveau chez le singe requiert 3 à 5 sujets différents, alors que les tâches comportementales en requièrent 3 à 10.

3. Raffinement (justifier le choix de l'espèce, expliquer pourquoi le modèle animal utilisé est le plus raffiné au vu des objectifs scientifiques, décrire les mesures proposées pour minimiser l'impact sur le bien-être des animaux). Le singe est le seul modèle animal qui comme l'homme explore le monde principalement avec ses yeux. Il est donc le seul dont les bases cérébrales de l'attention sont, comme chez l'homme, étroitement liée au contrôle cérébral des mouvements des yeux. Pour assurer leur bien-être,

les animaux sont hébergés en groupes dans un milieu enrichi qui leur permet d'exprimer leurs deux activités naturelles principales : le fourrageage pour trouver de la nourriture et les interactions sociales avec leurs congénères.

4102. Ces études vont permettre de déceler d'éventuelles anomalies comportementales chez des souris issues de souches génétiquement modifiée. Cette approche va permettre d'étudier plus spécifiquement les fonctions d'un gène en observant les conséquences de sa désactivation et les dysfonctionnements au sein de l'organisme qui en découlent. Il s'agit de fonds génétiques dont le répertoire comportemental a été peu ou pas du tout caractérisé.

Comme un gène possède de multiples fonctions, chaque souche souris génétiquement modifiée doit être caractérisée au niveau comportemental en utilisant diverses catégories de tests. Ces tests vont permettre de déceler d'éventuels troubles d'ordre sensoriel, moteur, anxio-dépressif ou cognitif.

Les tests comportementaux utilisés font partis de procédures validées en tant que modèles d'évaluation des maladies spécifiquement liées à ces gènes. L'incidence des gènes étant observée sur l'animal vivant, il n'y a pas de remplacement possible.

En ce concerne la réduction, chaque étude de base comporte un groupe témoin et un groupe transgénique de 20 sujets chacun, avec un nombre de 360 souris sur cinq ans. Le groupe transgénique est constitué d'animaux issus de la même souche que les sujets non modifiés génétiquement. L'effectif au sein des groupes est déterminé dans le respect des règles statistiques en vigueur et de manière à obtenir une bonne reproductibilité des résultats. Il faut savoir que les niveaux de performances dans les tests comportementaux sont très variables d'une souche à l'autre. Il s'agit d'études longitudinales qui nécessiteront plusieurs mois, et les souris interviendront dans plusieurs procédures.

En ce qui concerne le raffinement, les animaux sont stabulés par 5/8 dans des grandes cages ayant une surface au sol de 1820 cm² avec du matériel d'enrichissement (petites maisons, nids en coton, laine de bois ou de papier). Le comportement social et alimentaire des souris est surveillé quotidiennement.

4103. Le cervelet joue un rôle fondamental dans la coordination motrice, le contrôle de l'équilibre et l'apprentissage moteur. Pour exercer son rôle, il reçoit et compare les informations provenant de l'organisme et il les utilise pour un réglage fin des mouvements. Un dysfonctionnement des réseaux cérébelleux conduit à des troubles moteurs telles que les ataxies ou à les dystonies.

L'objectif du projet est de comprendre comment les informations sensori-motrices sont traitées dans le cervelet. Du fait de la complexité des réseaux de neurones dans le cervelet et de l'implication de nombreux types cellulaires dans le traitement de l'information, ce projet ne peut se faire que sur un modèle animal.

Dans le cervelet, deux types de neurones -les cellules en grains et les cellules de Purkinje- jouent un rôle fondamental dans le traitement de l'information neuronale et dans les fonctions motrices contrôlées par le cervelet. Il a notamment été montré qu'une partie de l'apprentissage moteur s'établissait au niveau des synapses cellules en grain-cellules de Purkinje.

Notre but est d'essayer de décrypter les mécanismes moléculaires qui participent à la transmission du message nerveux (plus particulièrement la libération de neurotransmetteurs) entre les cellules en grain et les cellules de Purkinje. Pour cela, nous envisageons de perturber in vivo l'expression de gènes d'intérêts dans les cellules en grain afin d'invalider dans ces cellules l'expression de protéines participant à la libération des neurotransmetteurs. Nous en étudierons ensuite les conséquences sur le fonctionnement des réseaux de neurones dans le cervelet (approches électrophysiologiques in vitro et in vivo), sur l'apprentissage moteur ou sur le maintien de l'équilibre (tests sensori-moteurs sur animaux vigiles).

Nous estimons qu'au total 1100 souris, génétiquement modifiées ou non seront nécessaires pour accomplir ce projet d'une durée de 5 ans.

Ce nombre se justifie par notamment par :

- 1) la mise au point de nouvelles approches expérimentales
- 2) l'utilisation de plusieurs outils moléculaires
- 3) la nécessité de tester ces outils moléculaires par au moins 3 approches expérimentales différentes (électrophysiologie in vivo et in vitro, approches comportementales). Le nombre d'animaux nécessaires pour valider statistiquement les résultats varie en fonction du type d'expérience. Pour l'électrophysiologie in vivo et in vitro, nous utiliserons préférentiellement le test de student ou le test de Wilcoxon-Mann-Whitney nécessitant au minimum 50 animaux pour chaque outils moléculaire testé. Pour l'approche comportementale, nous utiliserons des ANOVA nécessitant des cohortes d'environ 100 animaux (50 animaux génétiquement modifiés versus 50 animaux contrôles).

Tout sera mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux utilisés : notre approche expérimentale visant à manipuler sélectivement des neurones d'intérêt nous permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaires. A terme, cette technique pourrait permettre de s'affranchir de certaines lignées de souris transgéniques (souris KO) et donc, encore une fois, de réduire le nombre d'animaux utilisés. Pour réduire le stress, les animaux seront maintenus en groupes sociaux dans un milieu enrichi. La souffrance sera minimisée par l'utilisation systématique d'anesthésiques et d'analgésiques lors de procédures expérimentales impliquant de la chirurgie.

4104. Les virus Influenza aviaires hautement pathogènes provoquent une mortalité très élevée chez les Galliformes (poulets par exemple), alors que la majorité des infections par les virus Influenza aviaires hautement pathogènes restent asymptomatiques chez les Palmipèdes (canards par exemple). Afin de limiter la diffusion de virus Influenza aviaires hautement pathogènes, de strictes mesures de police sanitaire sont mises en place lors de la détection de foyers de virus Influenza aviaires hautement pathogènes.

Les infections par les virus Influenza aviaires hautement pathogènes sont à l'origine de pertes économiques majeures et représentent également un risque pour la santé publique lorsque ces virus ont un potentiel zoonotique. L'émergence de virus H5 hautement pathogènes en France en décembre 2015 en est la malheureuse illustration. L'extension de l'épizootie en France démontre également qu'il est capital de mieux comprendre quels sont les facteurs influençant l'émergence de virus Influenza aviaires hautement pathogènes et leur transmissibilité afin de mieux les prévenir, les surveiller et les contrôler.

Le but de ce projet est de réaliser des infections expérimentales chez le canard (*Anas platyrhynchos*) et chez le poulet (*Gallus gallus*) afin de déterminer le pouvoir pathogène et la capacité de transmission de différentes souches de virus Influenza aviaires hautement pathogènes circulant en France depuis décembre 2015. A ce jour, l'identification des sous-types de virus circulant en France n'est que partiellement réalisée par le Laboratoire national de référence pour l'Influenza aviaire et nous choisirons les souches virales que nous utiliserons dans les infections expérimentales sur la base d'analyses de séquences virales et d'analyses épidémiologiques en cours.

Nous infecterons les canards et les poulets avec trois souches virales différentes et nous utiliserons pour cela au total 84 canards et 87 poulets.

Le nombre d'animaux utilisés est au plus bas, suivant la règle des 3R, tout en s'assurant que nous aurons suffisamment de répliques pour que nos données soient valables statistiquement. Des analyses en culture cellulaire sont réalisées au préalable afin de ne recourir aux infections expérimentales uniquement lorsque cela est strictement nécessaire pour le projet.

Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, les mesures suivantes sont appliquées :

- Respect des normes d'hébergement (taille des cages, densité etc.) spécifiées dans la directive 2010 63 UE ;
- Application de conditions d'ambiance en accord avec l'âge et l'espèce (température, éclairage, hygrométrie) ;
- Fourniture d'eau et d'aliment (adapté aux besoins d'entretien des oiseaux) sans restriction ;
- Manipulation des oiseaux dans des isolateurs prévus à cet effet par du personnel qualifié ;
- Mise en place d'un suivi clinique rapproché par le vétérinaire responsable de l'essai et de points limites prédéfinis.

4105. Le virus de l'hépatite E (VHE) appartient à la famille des Hepeviridae au genre Orthohepevirus. Il s'agit d'un virus à ARN simple brin de polarité positive d'environ 7.2kb. Le VHE est la cause d'épidémies d'origine hydrique dans les pays en développement. Dans les pays industrialisés, il est responsable d'hépatites aiguës sporadiques, d'hépatites chroniques chez l'immunodéprimé, et de manifestations extrahépatiques notamment neurologiques et rénales. De nombreux éléments concernant le cycle viral et la physiopathologie de l'infection restent mal connus.

Depuis plusieurs années, de nombreuses études ont mis en évidence le potentiel zoonotique du VHE. Par ailleurs, des études précédentes ont montré que le porc, principal réservoir du VHE et les primates pouvaient être utilisés comme modèles animaux. Néanmoins, le coût de ces animaux reste très élevé, ils sont difficilement manipulables et nécessitent une logistique importante, ce qui limite leur utilisation. Il apparaît donc essentiel de développer un modèle expérimental à partir de petits animaux afin d'étudier la physiopathologie de l'infection à VHE. L'isolement de nouvelles souches VHE de lapin partageant des similarités nucléotidiques avec des souches humaines suggère que le lapin pourrait servir de modèle animal pour l'infection au VHE.

Une première expérience réalisée en 2014 sur une période de 3 mois a montré la possibilité d'infecter le lapin par des souches VHE humaines génotype 3 et par des souches VHE de lapin. Fait intéressant, l'infection par des souches VHE de lapin a conduit à une virémie persistante chez 1/3 des animaux, sans développement de signes cliniques.

Dans cette nouvelle étude, nous souhaitons confirmer que l'infection du lapin par des souches VHE de lapin peut conduire à une infection chronique grâce à un suivi de 6 mois. Nous souhaitons également confirmer le caractère résolutif des infections par des souches humaines de VHE.

Pour ce faire, nous disposons de trois souches virales différentes, une souche VHE lapin et deux souches VHE humaines avec deux signatures génétiques différentes.

Quatre lots de huit lapins seront constitués, 1 lot servira de contrôle sans infection, les 3 autres lots seront infectés respectivement avec une souche de VHE de lapin et deux souches humaines de VHE, par voie intraveineuse. Après infection et durant 24 semaines, nous procéderons à un suivi virologique, sérologique et pathologique de l'infection. Pour ce faire les lapins, hébergés en cage individuelle, seront sous surveillance quotidienne, et toute altération visible de leur état de santé conduira à une prise en charge adaptée immédiate. De plus, les prélèvements sanguins seront réalisés dans des conditions visant à limiter toute angoisse ou douleur (aiguille fine, petits volumes, dans un local dédié).

4106. Le développement des techniques de reconstruction laryngo-trachéale permet à l'heure actuelle de prendre en charge pratiquement toutes les lésions obstructives des voies respiratoires supérieures. La seule limite réside dans la prise en charge des obstructions par atteinte de la mobilité des articulations des cordes vocales. Ces lésions exposent à un handicap important, conduisant selon la position résiduelle des cordes vocales, soit à une insuffisance respiratoire chronique, soit à une altération de la voix associée à des difficultés alimentaires avec fausses routes exposant au développement rapide d'une bronchopneumopathie chronique. Ce problème concerne particulièrement l'ORL pédiatrique puisque les ankyloses crico-aryténoïdiennes sont des complications habituelles des intubations chroniques, particulièrement chez l'ancien prématuré.

Le but de cette étude pilote est d'évaluer la faisabilité et la fonctionnalité d'un concept technique original de transplantation hétérologue d'un complexe associant la corde vocale ainsi que son articulation vocale et sa musculature sur un modèle porcin. Ainsi, les résultats attendus sont la réhabilitation d'une fonction laryngée complète, ce que ne permet pas d'obtenir actuellement la transplantation laryngée complète.

Le modèle porcin (mini-porc) est choisi car l'anatomie, les dimensions et la physiologie sont proche de celles de l'homme. La nécessité de maintenir la musculature laryngée chez le donneur et le receveur ne permettra pas de réaliser une transplantation croisée et nécessitera le sacrifice du donneur.

On estime que 5 succès permettront de valider le concept technique et attendons un taux d'échec à 50%. Le nombre total d'animaux nécessaires est donc de 20 (10 donneurs et 10 receveurs). Dans le cadre de l'objectif de Réduction, l'étude pilote sera arrêtée après 5 succès, ou en l'absence de résultats probants après la 6e transplantation.

Le recours à des porcs provenant du même élevage permet l'utilisation d'un traitement immunosuppresseur simple par Cyclosporine A pendant 12 jours, ne nécessitant pas de conditions d'isolement particulières.

L'intervention réalisée sous anesthésie générale nécessitera le recours à une trachéotomie temporaire, associée à une alimentation par sonde naso-gastrique durant la phase de cicatrisation.

Les animaux, hébergés en box individuels, bénéficient d'un traitement antalgique post-opératoire systématique ainsi que d'une surveillance clinique journalière afin de dépister tout signe de souffrance. Ils bénéficient d'un enrichissement par ballons de couleur.

L'évaluation des résultats est réalisée par une fibroscopie hebdomadaire ainsi que par un recueil électromyographique mensuel, réalisés sous anesthésie générale.

A 4 mois postopératoires, les animaux sont sacrifiés pour la réalisation d'une étude anatomo-pathologique évaluant la cicatrisation des zones de jonctions cartilagineuses et musculaires ainsi que des réactions de rejet.

4107. Dans ce projet nous étudierons de quelle façon le cerveau apprend à combiner les informations multisensorielles qui proviennent d'une même source. Un exemple d'intégration multisensorielle est la compréhension de la parole qui est optimisée par la vision simultanée des lèvres de la personne qui parle. Nous utiliserons comme modèle expérimental le rat. Nous étudierons en particulier des interactions entre les sons et les odeurs, deux sens très performants chez les rongeurs. Les animaux seront entraînés à avoir un comportement différent selon la stimulation proposée, et les rythmes cérébraux (semblables à des électroencéphalogrammes) seront enregistrés au cours de l'apprentissage.

Notre étude s'intéresse à des processus cognitifs et à des mécanismes de communication entre plusieurs aires cérébrales ; elle ne peut pas être réalisée sur des cultures de cellules. Il n'est actuellement pas possible de remplacer ce type de protocoles par des modèles "in silico", toutefois, notre projet inclut une partie de modélisation à partir des données obtenues in vivo. Sur les 3 années du projet, nous utiliserons un total de 60 rats pour les enregistrements en chronique et le comportement. L'avantage des enregistrements en chronique pendant l'apprentissage est de réduire le nombre total d'animaux étudiés puisque chaque animal est son propre témoin. Dans un souci de raffinement, nous veillerons en continu au bien-être des animaux par l'utilisation d'analgésie et d'anesthésie lors des procédures opératoires, et par un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement. Les points limites se basent sur au moins une des observations suivantes : une perte maximale de 15-18% par rapport à leur poids normal pour leur âge, hyperréactivité lors de la manipulation, comportement de prostration, vocalisations sonores spontanées ou lors de la manipulation, signes d'absence de toilettage (poil hirsute, pelage sale), troubles de la locomotion. L'ensemble des mesures bioéthiques sont détaillées dans les deux protocoles du projet.

4108. La formation sur le primate non humain est nécessaire dans le cadre de l'utilisation de cet animal à des fins scientifiques. En effet, avant d'exécuter ces techniques sur des études de toxicologie dans le cadre du développement pré-clinique des molécules, les techniciens se forment sur un petit groupe d'animaux. Lorsque la formation du personnel est adéquate, l'expérimentation qui en découle est de meilleure qualité, et permet de réduire au minimum l'inconfort de l'animal en expérimentation. La formation sur animal s'effectue en utilisant le minimum possible d'animaux pour permettre d'obtenir la compétence nécessaire pour répéter ces techniques sur un plus grand échantillon. Généralement, des animaux de stock sont utilisés, ou bien, la formation peut se faire sur des animaux déjà en étude, dans le but d'éviter l'utilisation de nouveaux animaux. Des vidéos peuvent être tournées afin de limiter l'utilisation d'animaux, ou des méthodes de remplacement, comme l'utilisation de tissus de remplacement, de modèles non-vivant ou d'animaux euthanasiés, sont utilisés en priorité. Toute formation est sous la supervision d'un formateur ou d'un vétérinaire. Toutes ces techniques sont décrites dans des procédures spécifiques (SOP), et sont en accord avec les normes éthiques et les documents réglementaires. De plus, elles sont revues par le comité d'éthique. Il est attendu d'utiliser au maximum 100 animaux sur la durée du projet.

Dans l'industrie pré-clinique, il est aussi essentiel de renouveler les techniques utilisées, ou d'en développer des nouvelles afin soit d'améliorer celles existantes ou soit de développer une nouvelle technique selon un besoin particulier d'un client, ou suite à l'évolution de la recherche médicale (nouveau type de traitement, nouvelle cible/technique chirurgicale). Il est donc nécessaire d'utiliser des animaux dans le cadre du développement de ces techniques. Généralement, peu d'animaux sont utilisés. Les techniques sont développées soit par un expert technique ou un vétérinaire. L'animal doit être en bonne condition, et des soins adéquats (par exemple : analgésie, antibiothérapie) lui sont prodigués au cours de la procédure. Avant de procéder au développement de la technique sur l'animal, la priorité sera donnée à l'utilisation d'un modèle non vivant ou sur des animaux morts. Selon la procédure, une anesthésie pourra être réalisée.

Lors de ces deux types de procédure, du sérum physiologique sera administré principalement, en association s'il y a lieu, avec les produits nécessaires à l'anesthésie, l'analgésie ou l'antibiothérapie. Les animaux sont hébergés (sauf cas dûment justifié) dans des cages conformes à l'arrêté du 9 décembre 2014 modifiant l'arrêté du 1er février 2013 avec enrichissement. Les animaux identifiés pour les formations et le développement de techniques sont observés tous les jours afin de s'assurer de leur bien-être et de leur bonne condition. Les paramètres suivants sont contrôlés régulièrement afin d'évaluer l'état de santé des animaux : poids corporel,

consommation de nourriture et d'eau, température corporelle, signes cliniques, (liste non exhaustive). Toute anomalie est signalée au vétérinaire. Il lui incombe la décision de donner les traitements nécessaires ou d'euthanasier les animaux au vu des signes observés. Un animal pourra être ré-utilisé au maximum pour 3 études, ensuite, son devenir sera soit l'euthanasie soit le placement.

[Autorisation abrogée]

4109. L'alimentation a un impact direct sur la santé du consommateur et plus particulièrement sur le développement de maladies cardiovasculaires qui représentent la première cause de mortalité dans le monde. Des composants naturels présents dans certains aliments ont un impact positif sur la santé et suscitent un intérêt scientifique et commercial important. A ce titre, les protéines laitières présentent non seulement un rôle nutritif important en terme d'apport en macronutriments, mais elles sont aussi la principale source de peptides bioactifs qui sont porteurs d'activités biologiques telles que des activités antihypertensives, antioxydantes, ou encore hypocholestérolémiantes. L'enrichissement du bol alimentaire par ces composants bioactifs permettrait d'obtenir des aliments dits fonctionnels qui, au-delà de leur rôle nutritionnel, pourraient maintenir et promouvoir, dans le cadre d'une alimentation équilibrée, le capital-santé et le bien-être humains en permettant de réduire, entre autres, le risque cardiovasculaire. Alors que de nombreuses études scientifiques, effectuées avec des modèles cellulaires ou enzymatiques, ont montré un effet positif de ces molécules, l'évaluation in vivo de ces effets sur la santé, de leur biodisponibilité, ainsi que la compréhension de leur mode d'action reste limitée. Dans l'idée de pouvoir commercialiser ces peptides sous forme d'aliments fonctionnels pour l'Homme, des études chez l'animal sont nécessaires. L'objectif principal du projet PEP_SM est donc d'évaluer l'impact de ces molécules issues des protéines de lait sur la réduction du risque cardiovasculaire, de manière préventive, dans un modèle animal murin.

Ce travail sera réalisé sur une durée de 12 semaines et inclura 58 souris mâles C57BL/6JRj âgées de 3 mois. Les animaux seront répartis en 4 groupes de 12 souris selon les régimes alimentaires et les traitements : un régime standard, dans lequel les graisses ne représenteront que 10% de l'apport calorique quotidien (groupes 1 et 2), ou un régime riche en graisses représentant 60% de l'apport calorique quotidien (groupes 3 et 4) ; quel que soit le type de régime, celui-ci sera en accès libre. Les groupes 2 et 4 recevront les molécules bioactives à tester ; afin d'éviter la procédure de gavage inductrice de stress, ces molécules seront mélangées à une matrice appétitive et mises à disposition des animaux à heure fixe. Dix souris supplémentaires seront prévues pour les mises au point techniques (adaptation à la matrice alimentaire et prélèvements sanguins).

Les animaux seront hébergés individuellement sur toute la durée de l'expérience, afin d'éviter la mise en place d'une hiérarchie de dominance dans la cage (éviter qu'une souris empêche ses congénères d'accéder à la nourriture), de garantir la bonne prise de la matrice de traitement et de quantifier la prise de nourriture et d'eau. Le milieu sera enrichi (papier carré végétal pour se constituer un nid et briquettes de bois à ronger). Les cages transparentes seront placées les unes à côté des autres sur portoir, afin que les animaux puissent se voir. De plus, ils pourront communiquer via leurs émissions de vocalisations ultra-soniques, les couvercles des cages étant constitués par des grilles. Ainsi, bien que placés individuellement dans leur cage, ils ne seront pas isolés au sens strict du terme.

L'évaluation de l'impact des molécules bioactives, sur le développement du risque cardiovasculaire lié au régime alimentaire riche en graisse, sera réalisée grâce au suivi pondéral des animaux, au suivi des prises alimentaires et hydriques. De plus, l'évolution dans le temps de paramètres biochimiques, pertinents dans ce registre d'étude, sera analysée sur un échantillon de sang prélevé par voie mandibulaire, à raison d'un prélèvement tous les 15 jours, soit 7 prélèvements au cours de l'ensemble de la période expérimentale. A l'issue du dernier prélèvement, les animaux seront mis à mort et plusieurs tissus (foie, cerveaux, cœur) seront prélevés afin d'évaluer et de caractériser l'effet des peptides sur ces organes cibles.

Ce type d'étude ne peut être réalisé que sur des animaux vivants, seul niveau d'organisation permettant d'évaluer le bénéfice réel de ces composants alimentaires sur la prévention du risque cardiovasculaire lié à l'état nutritionnel (Remplacement). Le choix de 12 souris par groupe constitue le nombre minimum nécessaire à l'évaluation de l'efficacité de ces produits (Réduire) tout en évitant le recours à un nombre excessif d'animaux (Raffinement). Enfin, le stress et le mal-être sont des facteurs connus pour promouvoir le risque cardiovasculaire ; le bien-être des animaux sera donc contrôlé quotidiennement et l'inconfort évité au maximum au cours de l'expérimentation, de manière à garantir la qualité des résultats (Raffinement). En cas de signes prolongés de douleur ou de détérioration de leur état général, les animaux seront mis à mort selon une méthode en conformité avec les recommandations éthiques.

4110. La leucémie aigue myéloblastique (LAM) est un cancer du sang touchant essentiellement le sujet âgé (>60ans). Cette pathologie apparaît lorsque des cellules sanguines présentes dans la moelle osseuse subissent des changements et cessent de se comporter normalement. Ces cellules, appelées leucémiques, se multiplient peu à peu et envahissent les cellules sanguines normales qui sont alors incapables d'accomplir leurs tâches. En France, l'incidence de la LAM par an est superposable à celle observée en Europe avec des taux de 3.9 sur 100 000 chez l'homme et de 3.35 sur 100 000 chez la femme. En 2012, la pathologie a concerné 3500 personnes, un nombre qui correspond à une augmentation de 1.5% par an depuis 1980. Ces affections restent de très mauvais pronostic : 35 à 40% des personnes de moins de 60 ans survivent plus de 5 ans, et moins de 10 à 15% des adultes de plus de 60 ans survivent longtemps.

L'objectif de cette demande est d'étudier le rôle de la synténine dans l'établissement et la progression de la LAM. La synténine est une protéine intracellulaire qui établit des liaisons multiples avec un grand nombre de partenaires membranaires et cytoplasmiques qu'elle relie aux cascades de signalisation de la cellule. Dans le contexte du cancer, un niveau d'expression anormalement élevé de la synténine dans les cellules cancéreuses est corrélé à l'invasion tumorale. Nos études ont montré que cette molécule est aussi impliquée dans une nouvelle voie de communication intercellulaire, pouvant potentiellement amplifier les voies de signalisation

utilisées par les cellules cancéreuses pour communiquer entre elles-mêmes ou avec les cellules normales de l'hôte pour promouvoir la tumorigenèse.

Au sein du microenvironnement tumoral, il est admis que le caractère invasif d'un cancer primitif est non seulement déterminé par les cellules tumorales, mais surtout par leurs interactions avec l'environnement extracellulaire (cellules de stroma et immunitaires) qui modulent leurs capacités de croissance. La dérégulation des voies de communication est une caractéristique des cellules néoplasiques et un excès de synténine peut entretenir les cercles vicieux de signalisation de ces cellules au sein de la niche tumorale.

Dans ce contexte, en utilisant des souris déficientes ou non pour l'expression de la synténine, nous avons pour objectifs d'évaluer:

1- Le rôle de la synténine au sein de la niche leucémique, sa fonction dans le nichage de la leucémie dans la moelle osseuse, ainsi que sa progression et sa dissémination vers les différents organes.

2- Le rôle de la synténine dans la réponse immunitaire au cours de la progression leucémique.

Le modèle LAM murin utilisé sera la FLB1, une LAM qui présente des caractéristiques similaires à la pathologie telle qu'elle se développe chez l'humain. Ce modèle déjà caractérisé et décrit dans la littérature permettra d'évaluer l'implication de la synténine dans la leucémogénèse tout en tenant compte de la complexité tissulaire et la maintenance du microenvironnement qui est d'une importance cruciale pour la croissance et la dissémination tumorale.

Dans la présente demande d'autorisation, nous planifions l'utilisation d'une lignée de souris déficientes pour la synténine (C57BL/6 Synt KO), que nous avons déjà créée au laboratoire, pour établir le modèle leucémique spécifié. Ce modèle est particulièrement adapté aux besoins de raffinement et de réduction. En effet, les cellules FLB1 ont été développées dans des souris C57BL/6 CD45.1, alors que la lignée Synt KO a été développée sur le fond génétique C57BL/6 CD45.2. Le marqueur CD45.1 nous permettra donc de détecter très précocement les signes de développements leucémiques grâce au suivi régulier des formules sanguines ; et ainsi de mettre fin aux procédures expérimentales avant que des dommages sévères ne prennent lieu dans les différents organes des animaux.

De plus, comme c'est un modèle LAM approprié pour répondre aux deux objectifs mentionnés, nous utiliserons les même souris Synt KO et Synt WT, dans un souci de réduction, au cours d'une même procédure afin d'étudier la progression de la leucémie ainsi que l'implication de la synténine dans la réponse immunitaire anti-leucémique.

Nous utiliserons la méthode des 3 R pour réduire à son minimum le nombre d'animaux et, chaque fois que cela sera possible, le modèle in vivo sera remplacé par des modèles in vitro. Dans un souci de raffinement et de réduction, le suivi du développement leucémique se fera par des mesures cinétiques utilisant un procédé peu invasif (prélèvement sanguin sous anesthésie), à savoir la technique de cytométrie de flux. Afin de réduire le stress et d'améliorer le cadre de vie des animaux au cours des procédures nécessaires pour répondre à nos objectifs, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux, par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton), et par le maintien des animaux en groupes de 4 à 6 afin d'éviter le stress de l'isolement. Par ailleurs, l'ensemble des procédures de transplantation et de prise d'échantillons sanguins sera réalisé sous anesthésie gazeuse (Vetflurane 3%).

Dans ce contexte, le nombre minimum mais nécessaire de souris a été calculé afin de couvrir les différentes études qui permettront d'investiguer le rôle de la synténine au sein de la niche leucémique, et de fournir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, ce projet utilisera 340 souris.

4111. Le GPR88 est un récepteur pharmacologique découvert récemment. Par génie génétique, son ablation chez la souris engendre notamment hyperactivité et impacte ses capacités d'apprentissage. Des études récentes suggèrent que le GPR 88 pourrait être un acteur important dans les mécanismes conduisant des pathologies cérébrales telles que la schizophrénie ou la maladie de Parkinson. Ainsi, l'étude du modèle murin de suppression d'expression de GPR88 (KO) va aider à comprendre la fonction de GPR88 et ainsi à déterminer s'il peut constituer une cible pharmacologique intéressante.

Nous nous intéresserons aux conséquences neurochimiques et comportementales de l'absence de ce récepteur. Ceci dans des conditions basales mais aussi dans le contexte d'une modélisation d'une pathologie. Dans notre cas, la pathologie dépressive.

Nous modéliserons cette pathologie grâce à l'application chronique de corticostérone dans l'eau de boisson (modèle CORT). Ceci induit une dérégulation de la sécrétion de cette hormone par la glande surrénale, comme chez bon nombre de patients déprimés. Les souris ainsi traitées présentent des comportements de types anxio-dépressifs bien caractérisés par le laboratoire.

Dans un premier temps, notre étude vise à élucider les caractéristiques neurochimiques des souris KO. La technique de microdialyse intracérébrale permettra d'évaluer les profils de sécrétion des principaux neurotransmetteurs (dopamine, sérotonine, glutamate, gaba, et noradrénaline) dans deux structure cérébrales clés dans la dépression : le noyau Accumbens et le cortex médian préfrontal. Cette technique repose sur l'implantation intracérébrale d'une membrane semi perméable qui est perfusée avec un liquide isoosmotique avec le milieu extracellulaire. Sans échange de liquide, cette technique permet de collecter des échantillons chargés en neurotransmetteurs, reflets de la neurotransmission, sans manipulation des animaux. Pour mettre en lumière le rôle de GRP-88, un inhibiteur de recapture du glutamate sera appliqué localement pour augmenter l'activité électrique des neurones. Le GPR88 a en effet été décrit pour impacter les propriétés électriques neuronales.

Dans un second temps, le comportement de type anxio-dépressif des souris sera évalué par différents tests comportementaux, non-invasifs chez des souris sauvages ou KO traitées ou non à la corticostérone.

Pour l'ensemble de ce projet, 160 animaux seront utilisés. L'utilisation d'animaux vivants est nécessaire, il est en effet impossible actuellement de modéliser in vitro ou in silico les troubles de l'humeur. Nos expériences utiliseront sur deux techniques: la microdialyse et les tests comportementaux. Ces techniques présentent l'avantage de générer une quantité de données importante pour chaque animal : la microdialyse permet d'utiliser chaque animal comme son propre témoin et chaque souris effectuée

plusieurs tests comportementaux. Enfin, le nombre d'animaux par groupe expérimental a été réduit au minimum qui permette de s'assurer de la validité scientifique des données obtenues. Anesthésiques et d'analgésiques sont utilisés dès que nécessaire.

Les cerveaux des animaux seront examinés post mortem afin de valider la localisation des sondes de microdialyse.

Globalement, ce travail permettra de déterminer si GPR88 peut être une cible pharmacologique d'intérêt pour la mise au point de thérapies innovante dans le traitement de la dépression.

4112. L'insuffisance cardiaque (IC) correspond à une incapacité du muscle cardiaque à assurer un débit cardiaque suffisant pour couvrir les besoins énergétique de l'organisme. Elle constitue une cause majeure de morbidité et de mortalité dans les pays occidentaux. La mortalité survient en raison de la défaillance cardiaque (IC terminale) et de troubles du rythme cardiaque (mort subite). Parmi les mécanismes impliqués dans le développement et les complications de l'insuffisance cardiaque, le système nerveux qui contrôle l'activité du cœur, et plus spécifiquement la voie Beta-adrénergique (B-AR) joue un rôle crucial. Le blocage de la voie B-AR par des molécules chimiques constitue ainsi une approche thérapeutique majeure de cette pathologie. Chez les sujets sains, la voie B-AR est activée de façon transitoire, par exemple à la suite d'un effort physique. Cette activation augmente la production d'une substance appelée "Adénosine Monophosphate cyclique (AMPc)" à l'intérieur des cellules cardiaques. L'AMPc est ensuite dégradée de façon contrôlée par des enzymes appelées "Phosphodiésterases (PDE)".

A l'inverse, chez les patients insuffisants cardiaques, l'activation de la voie B-AR est chronique conduisant à une augmentation chronique d'AMPc responsable de perturbations des fonctions cellulaires cardiaques et aggravant à long terme la maladie. De plus, après cette activation transitoire de la voie B-AR, il existe une phase appelée "récupération" correspondant au retour progressif aux paramètres cardiaques de base.

L'objectif général du projet est de caractériser in vivo le rôle des phosphodiésterases dans la récupération cardiaque après une stimulation Beta-adrénergique. L'utilisation d'animaux est indispensable pour évaluer cette hypothèse. Cette récupération cardiaque sera évaluée chez le rat sain et dans une situation pathologique (modèle d'insuffisance cardiaque induite par ligature chirurgicale de la principale artère de l'organisme naissant du cœur, l'aorte). L'utilisation animale se justifie par l'impossibilité de simuler in vitro la mise en place de l'insuffisance cardiaque. Ce modèle d'IC induite est classique et le respect des procédures anesthésiques et analgésiques veilleront au bien être de l'animal tout en limitant sa souffrance. Les fonctions cardiovasculaires sont étudiées par des méthodes multiples simples non invasives (électrocardiogramme et échocardiographie), ce qui permettra de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux seront mis à mort en fin d'expérimentation et les tissus prélevés seront partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés (des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés).

Un total de 144 rats sera utilisé pour le projet.

4113. Les affections cardiaques sont aujourd'hui une des causes les plus fréquentes de décès et d'invalidité dans le monde occidental. Dans le souci de comprendre comment la régénération cardiaque pourrait être induite chez l'homme, nous avons choisi d'étudier ce phénomène chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*) dont le cœur peut régénérer. Nos précédentes études ont montré que, lors de la régénération cardiaque chez le poisson, les nouveaux cardiomyocytes sont produits grâce à la prolifération de cardiomyocytes différenciés préexistants.

Notre principal objectif est d'élargir la liste relativement restreinte de gènes connus pour être impliqués dans la régénération cardiaque chez le poisson et de caractériser des gènes-candidats qui pourraient être ultérieurement manipulés chez les mammifères.

Notre approche consiste, d'une part, à tester 20 lignées de poissons transgéniques exprimant de façon conditionnelle des formes activées ou dominantes-négatives de gènes ayant été préalablement identifiés comme ayant un rôle potentiel au cours de la régénération cardiaque et d'autre part de tester des inhibiteurs chimiques ciblant un certain nombre de ces gènes.

A l'âge adulte (4 mois) ces poissons subiront une amputation cardiaque (résection de 20% du ventricule). Dans le cas d'un traitement chimique, les injections débiteront une semaine après amputation. Selon les cas, les poissons seront sacrifiés 7, 14 et/ou 30 jours après amputation et les cœurs prélevés. Ces cœurs seront soit fixés et sectionnés afin d'évaluer le degré de capacité régénérative et d'effectuer des marquages de prolifération des cardiomyocytes, soit utilisés pour comparer les profils d'expression afin d'élargir notre connaissance sur les voies de signalisation activées lors de la régénération cardiaque.

Une fois que nous aurons validé l'implication d'un ou plusieurs gènes au cours de la régénération cardiaque chez le poisson, nous envisageons de tester le pouvoir prolifératif de ces gènes sur des cardiomyocytes de mammifères en culture. Pour ce faire, nous mettrons en culture des cardiomyocytes de souriceaux nouveau-nés et étudierons leur capacité de prolifération après inhibition ou activation des gènes identifiés chez le poisson.

Cette démarche nécessite l'utilisation de 2175 poissons et s'inscrit en conformité de la règle des "3R" pour maximiser l'utilisation des animaux des lignées en élevage et ne pas sacrifier inutilement des animaux générés dans l'animalerie. De plus, nous prêterons une attention toute particulière aux comportements suivants : comportement de nage, taux de ventilation et prise d'aliments qui peuvent refléter un comportement anormal pouvant témoigner d'une réponse à la douleur. Si le poisson nage à la surface de l'eau (recherche d'oxygène), ce comportement doit être interprété comme un signal de détresse / d'inconfort. L'expérience sera alors immédiatement arrêtée et le poisson sera euthanasié."

4114. Les dysferlinopathies, telles que la myopathie de Miyoshi et la dystrophie musculaire des ceintures (LGMD) de type 2B, sont des dystrophies musculaires récessives dues à des mutations du gène codant la dysferline, protéine du muscle squelettique

impliquée dans la réparation membranaire. Au niveau clinique, elles sont caractérisées par une faiblesse musculaire et une augmentation du niveau de créatine kinase sérique entraînant une perte de masse musculaire. Le but de ce projet de recherche a pour but de développer une nouvelle stratégie d'ingénierie ciblée du génome afin de restaurer une synthèse tronquée (mais fonctionnelle) de la protéine dysferline chez des souris déficientes en dysferline afin d'améliorer leur phénotype musculaire.

2. Description du projet

L'étude sera réalisée sur des souris déficientes en dysferline avec pour objectif une évaluation des bénéfices de la restauration (tronquée) de la protéine dysferline par une approche d'ingénierie ciblée du génome à l'aide d'injection intramusculaire ou d'injection systémique. Pour cela, nous observerons le niveau d'expression protéique de la dysferline ainsi que la correction du phénotype dystrophique : amélioration de la force musculaire, diminution du niveau inflammatoire musculaire, amélioration de la réparation membranaire.

Le choix et le déroulement de nos expériences ont été déterminés afin de correspondre au concept des 3R (réduire, raffiner et remplacer) dans le but de réduire au maximum le nombre d'animaux à utiliser, tout en obtenant des résultats significatifs. Pour cela, 48 animaux seront utilisés. Pour contribuer au bien-être de nos animaux durant cette étude, les souris seront hébergées collectivement (mâles et femelles séparées en dehors des périodes d'accouplement) et le milieu est enrichi par la présence de petite maisonnette en papier que les souris peuvent ronger et dépiauter. Les animaux seront logés dans une pièce thermorégulée (19-22 °C) avec un cycle 12h de lumière / 12h d'obscurité. Deux à trois fois par semaine, un contrôle de l'eau de boisson, de nourriture et de l'état clinique des souris sera réalisé. Le changement des litières aura lieu une fois par semaine. De plus, nous avons déterminé des points limites à ne pas franchir pour respecter le bien-être de l'animal : un contrôle régulier de l'état clinique de nos animaux sera réalisé et selon la sévérité des signes cliniques critiques fixés, au jugé du manipulateur, l'animal sera soit soulagé par administration de produits analgésiques, soit mise à mort selon la réglementation.

Afin de pouvoir tester l'impact d'une restauration (tronquée) de la synthèse de la dysferline sur le phénotype musculaire (amélioration de la force musculaire, diminution de l'inflammation), il nous est indispensable d'avoir recours à un modèle animal.

4115. La formation sur les animaux de laboratoires est nécessaire dans le cadre de l'utilisation de cet animal à des fins scientifiques. En effet, avant d'exécuter ces techniques sur des études de toxicologie dans le cadre du développement pré-clinique des molécules, les techniciens se forment sur un petit groupe d'animaux. Lorsque la formation du personnel est adéquate, l'expérimentation qui en découle est de meilleure qualité, et permet de réduire au minimum l'inconfort de l'animal en expérimentation. La formation sur animal s'effectue en utilisant le minimum possible d'animaux pour permettre d'obtenir la compétence nécessaire pour répéter ces techniques sur un plus grand échantillon. Généralement, des animaux de stock sont utilisés, ou bien, la formation peut se faire sur des animaux déjà en étude, dans le but d'éviter l'utilisation de nouveaux animaux. Des vidéos peuvent être tournées afin de limiter l'utilisation d'animaux, ou des méthodes de remplacement, comme l'utilisation de tissus de remplacement, de modèles non-vivant ou d'animaux euthanasiés, sont utilisés en priorité. Toute formation est sous la supervision d'un formateur ou d'un vétérinaire. Toutes ces techniques sont décrites dans des procédures spécifiques (SOP), et sont en accord avec les normes éthiques et les documents réglementaires. De plus, elles sont revues par le comité d'éthique.

Dans l'industrie pré-clinique, il est aussi essentiel de renouveler les techniques utilisées, ou d'en développer des nouvelles afin soit d'améliorer celles existantes ou soit de développer une nouvelle technique selon un besoin particulier d'un client, ou suite à l'évolution de la recherche médicale (nouveau type de traitement, nouvelle cible/technique chirurgicale). Il est donc nécessaire d'utiliser des animaux dans le cadre du développement de ces techniques. Généralement, peu d'animaux sont utilisés. Les techniques sont développées soit avec un expert technique ou un vétérinaire. L'animal doit être en bonne condition, et des soins adéquats (par exemple : analgésie, antibiothérapie) lui sont prodigués au cours de la procédure. Avant de procéder au développement de la technique sur l'animal, la priorité sera donnée à l'utilisation d'un modèle non vivant ou sur des animaux morts. Selon la procédure, une anesthésie pourra être réalisée.

Lors de ces deux types de procédure, du sérum physiologique est généralement administré, en combinaison, si nécessaire, des produits associés à l'anesthésie, l'analgésie ou l'antibiothérapie. Les animaux sont hébergés (sauf cas dûment justifié) dans des cages conformes à l'arrêté du 9 décembre 2014 modifiant l'arrêté du 1er février 2013 avec enrichissement. Les animaux identifiés pour les formations et le développement de techniques sont observés tous les jours afin de s'assurer de leur bien-être et de leur bonne condition. Les paramètres suivants sont contrôlés régulièrement afin d'évaluer l'état de santé des animaux : poids corporel, consommation de nourriture et d'eau, température corporelle, signes cliniques, (liste non exhaustive). Toute anomalie est signalée au vétérinaire. Il lui incombe la décision de donner les traitements nécessaires ou d'euthanasier les animaux au vu des signes observés. Un animal pourra être ré-utilisé au maximum pour 4 procédures, ensuite, son devenir sera soit l'euthanasie soit le placement. Il est prévu d'utiliser un maximum de 2575 animaux dans ce projet.

4116. Le cancer est la deuxième cause de décès dans les pays développés après les maladies cardiovasculaires. Les traitements conventionnels de nombreux cancers tels que la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie ont démontré des limites d'efficacité, nécessitant un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les virus oncolytiques sont une nouvelle classe d'agents thérapeutiques pouvant être une alternative au traitement des cancers. Par définition, un virus oncolytique est un virus qui démontre une réplication et une lyse spécifique des cellules tumorales avec une faible, voire aucune cytotoxicité sur les tissus dits « sains ».

La perspective de ce projet est d'évaluer l'efficacité et l'innocuité (absence de toxicité) de ces nouveaux vecteurs pour traiter des pathologies. Au préalable, ces vecteurs ont montré des capacités à lyser et détruire des cellules tumorales in vitro. Il s'agit donc maintenant de les tester in vivo.

La dose létale médiane (DL50) de ces virus (injectée par voie systémique) doit être déterminée pour ce projet : il s'agit de la dose à laquelle 50% des souris ne survivent pas à l'injection du virus,

Les effets secondaires dus à l'injection des virus seront surveillés et des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique moribond des animaux seront mis en place pour limiter le stress et la souffrance des animaux.

Du fait de l'absence de système in vitro comportant tous les éléments cellulaires pouvant interférer avec la réplication virale, et permettant de mimer leurs interactions et leur mode d'action, l'emploi de modèle animal est incontournable.

Le nombre d'animaux par groupe expérimental est de 5 animaux. Cet effectif permet d'obtenir des résultats significatifs. 20 virus seront testés à 8 doses différentes chez des souris immunocompétentes et immunodéficientes portant le nombre total d'animaux utilisés à 1800 sur toute la durée du projet. Chaque expérience sera réalisée qu'une seule fois.

Une fois la DL50 déterminée, ces virus seront injectés dans des souris porteuses de tumeurs murines ou humaines (implantées soit en souris immunocompétentes, soit en souris immunodéficientes) afin de déterminer in vivo l'activité thérapeutique anti-tumorale de nouvelles générations de virus oncolytiques. Cette partie du projet a déjà été évaluée par le comité éthique.

Ce projet a déjà été approuvé par le Comité d'Ethique de Transgene (Illkich-Graffenstaden) et par le ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche.

Ce projet est à nouveau déposé suite à un changement d'établissement utilisateur.

4117. Dans le système olfactif des mammifères, les neurones sensoriels qui captent les odeurs dans le nez convergent vers le bulbe olfactif dans des structures anatomiques appelées glomérules à l'intérieur desquels ils transmettent l'information sensorielle aux neurones principaux du bulbe olfactif qui propagent l'information aux différentes régions corticales impliquées dans la perception des odeurs. Dans le bulbe olfactif les interneurons inhibiteurs sont largement plus nombreux que les neurones principaux excitateurs, ce qui suggère que l'inhibition joue un rôle crucial dans le traitement des odeurs. Parmi ces interneurons, il existe une grande diversité de cellules périglomérulaires (PG) entourant chaque glomérule. L'implication fonctionnelle de cette diversité n'étant pas connue, l'objectif de nos recherches est de comprendre le rôle de chaque type de cellule PG au cours du traitement central des odeurs. Le projet présenté ici a pour but d'identifier et de manipuler l'activité de populations spécifiques de cellules PG. Pour cela nous induirons par transfection virale ou électroporation l'expression de molécules fluorescentes et/ou photo-activables dans des populations spécifiques de neurones PG. Les propriétés fonctionnelles des cellules PG ainsi marquées et leur influence sur les cellules principales du bulbe olfactif pourront alors être examinées par des enregistrements électrophysiologiques couplés aux techniques d'optogénétique sur des tranches aiguës de bulbe ou, in vivo, sur l'animal anesthésié. Nous estimons qu'au total 540 souris seront nécessaires pour accomplir ce projet d'une durée de 4 ans. Tout sera mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux utilisés ainsi que leur stress ou souffrance. Avant leur utilisation, les souris seront hébergées en cage collective. Les expériences d'injection virale dans le cerveau seront réalisées sous anesthésie générale. Après réveil, les souris seront isolées dans une cage enrichie pour éviter les agressions des congénères. Les expériences d'enregistrement électrophysiologiques in vivo seront également réalisées sous anesthésie générale. La transgénèse par électroporation sera réalisée sur des animaux nouveaux nés anesthésiés par hypothermie et repris en charge par leur mère après leur réveil. Notre approche expérimentale visant à marquer et manipuler sélectivement des neurones d'intérêt nous permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaires. Elle remplace une approche à l'aveugle qui, en absence de marquage spécifique, diminue la probabilité d'enregistrer un sous-type de neurone spécifique et donc nécessite d'utiliser davantage d'animaux.

4118. Dans la mesure où les usages du Bisphénol A en lien avec l'alimentation sont en passe d'être interdits par les autorités sanitaires, il paraît judicieux d'évaluer l'impact des molécules qui lui sont substituées. Parmi celles-ci, le bisphénol S (BPS) est maintenant communément utilisé et retrouvé dans un nombre important de produits de consommation courante. Il n'existe à notre connaissance aucune méthode qui permet d'évaluer à la fois la quantité de BPS et celle du BPS glucuronide (BPS-Gluc) issu de la transformation du BPS par l'organisme. Ce dernier n'étant pas disponible chez les fournisseurs de molécules, il faut en purifier à partir d'urine de brebis traitée par voie orale au BPS. En effet, le BPS après ingestion est transformé par le foie en BPS-Gluc et pour être éliminé par voie urinaire. Le but de ce projet est dans un premier temps, de collecter des urines de brebis après administration de BPS en quantité suffisante pour purifier le BPS-Gluc résultant. De plus une étude du devenir du BPS in vivo, chez le rat, animal de référence en toxicologie, permettra de valider la méthode permettant la caractérisation du BPS dans l'organisme. Ce projet est basé sur l'anatomie et la physiologie globales du système de détoxification des mammifères. Ce niveau d'organisation ne peut se retrouver qu'in vivo. Deux brebis seront utilisées pour cette étude ; ce nombre est suffisant pour obtenir le volume d'urine nécessaire à l'extraction du BPSg. Elles seront logées dans l'étable de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, avec libre accès au pâturage en dehors des temps de prélèvements d'urines, pendant lesquels elles sont placées en animalerie conventionnelle, leur assurant les conditions optimales d'hébergement et de bien-être et nourries de foin de prairie ad-libitum. Quinze rats seront ensuite utilisés, un nombre suffisant par rapport aux objectifs de l'étude qui ne peut se réaliser qu'in vivo eut égard à la complexité des mécanismes pharmacocinétiques mis en œuvre par l'organisme pour absorber puis métaboliser le BPSg. Ils seront hébergés en animalerie conventionnelle, dans un environnement contrôlé (lumière, température, hygrométrie) et seront régulièrement surveillés par le personnel, leur assurant ainsi les meilleures conditions de vie pour garantir leur bien-être et leur bon état de santé.

4119. Les étudiants d'école vétérinaire reçoivent un enseignement de physiologie digestive.

La séance de TP concernée par cette saisine a pour but d'illustrer l'enseignement théorique sur une espèce domestique, le chien. (16 séances par an de septembre à décembre).

Ce TP est plus particulièrement destiné à faire comprendre la motricité de l'estomac et de l'intestin grêle.

Deux chiens reçoivent du glucose par voie orale

- un chien reçoit des croquettes justes avant l'administration de glucose
- un chien est laissé à jeun (excepté le glucose administré)

Les étudiants comparent ensuite les courbes de glycémie en fonction du repas et discutent de l'ouverture du pylore permettant le transit et l'absorption du glucose.

Cinq chiens par an seront utilisés pour ce TP programmé pour 5 ans. Une telle étude à visée pédagogique, pour la formation des futurs vétérinaires, ne peut se concevoir que chez l'animal vivant et en parfaite santé. Les mêmes chiens pourront être utilisés plusieurs années, si le vétérinaire référent donne son accord. Les chiens sont hébergés par deux dans des locaux adaptés présentant les meilleures conditions standardisées et enrichies (jouets...), avec un souci constant de la part des personnels d'assurer leurs conditions de vie, de santé et de bien-être.

4120. La sclérodémie est une maladie auto-immune rare mais particulièrement invalidante, elle se caractérise par un durcissement de la peau.

On compte au nombre de 700 000 le nombre de malades aux Etats-Unis et entre 5000 à 7000 en France.

La prévalence de la maladie varie selon les études entre 1 cas sur 1300 personnes à 1 cas sur 5000, elle touche essentiellement les femmes (3 cas sur 4) et se déclare généralement entre 40 et 50 ans mais elle peut se retrouver à tous les âges y compris chez l'enfant, dans toutes les populations sans distinction de race ni prédisposition génétique particulière.

La sclérodémie peut se manifester exceptionnellement chez l'enfant et touche a priori toutes les populations bien qu'elle soit fréquente chez les personnes exposées à certains produits chimiques industriels.

Elle se traduit par des dysfonctionnements des cellules endothéliales, des lymphocytes et des fibroblastes. Une production excessive de collagène par les fibroblastes conduit à une vasculopathie et à l'apparition d'une fibrose.

L'accumulation de collagène provoque un épaississement de la matrice extra-cellulaire de la peau, évolue vers une fibrose des petits vaisseaux et aboutit à une ischémie de ceux-ci.

La maladie touche ensuite les poumons, le cœur, les reins ou encore le tractus gastro-intestinal, le pronostic vital est alors en jeu, car il n'existe aucun traitement à ce jour.

La sclérodémie conduit à une mortalité de 30 % des malades à l'issue de 5 ans d'évolution de la maladie.

En plus du fait que la maladie soit liée à un désordre à la fois auto-immune, vasculaire et fibrotique, l'hétérogénéité de la maladie rend son approche très difficile. Aucun modèle ne reproduit fidèlement la maladie humaine, il y a cependant certains modèles animaux qui s'en approchent par leurs caractéristiques.

Ils ont une grande utilité pour évaluer l'efficacité de molécules dans le cadre du développement d'un traitement de la pathologie.

Parmi ces modèles, nous nous proposons d'étudier le modèle d'induction par la bléomycine.

La bléomycine est un traitement anti-cancéreux, produit par la bactérie *Streptomyces verticillus* qui agit comme antibiotique par inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN.

L'administration de bléomycine par voie sous-cutanée entraîne une inflammation avec une forte accumulation de monocyte au site d'injection.

Dans un souci permanent du bien-être animal et afin de minimiser l'emploi des animaux de laboratoire, l'évaluation des molécules sera réalisée en priorité dans des modèles in vitro.

Les molécules ayant prouvé un potentiel thérapeutique dans ces études feront alors l'objet d'une évaluation chez l'animal.

2880 souris seront utilisées sur cinq années afin d'évaluer le potentiel thérapeutique des composés. Par ailleurs, l'hébergement des animaux pendant la phase d'acclimatation et pendant l'expérimentation sera faite avec enrichissement du milieu afin d'améliorer leur bien-être.

4121. Les pathologies vestibulaires sont caractérisées par des épisodes imprévisibles de vertiges accompagnés de déséquilibres oculomoteurs et posturaux. Ces crises de vertige sont souvent accompagnées d'étourdissements et de nausées. Les pathologies vestibulaires chroniques sont très invalidantes et conduisent à un isolement psychologique et social. La prévalence des vertiges en clinique est très importante, de l'ordre de 20 à 30%, et augmente avec l'âge. Les vertiges vestibulaires peuvent être liés à des atteintes du système nerveux périphérique et notamment des organes de l'oreille interne, ou à une atteinte au niveau du nerf VIII ou des structures centrales. Dans tous les cas, des mécanismes cellulaires compensatoires sont mis en jeu afin de résoudre les symptômes comportementaux qui suivent l'apparition de la pathologie. Ce phénomène appelé compensation vestibulaire constitue le thème central du présent projet.

Le but de ce projet est de tester des modèles animaux représentatifs des troubles vestibulaires rencontrés chez l'homme en caractérisant comment une affection de l'oreille interne conduit à des troubles oculomoteurs et posturaux, puis en décrivant les atteintes neurales associées au niveau périphérique et central. Les mécanismes de compensation vestibulaire doivent également être caractérisés en liaison avec les différents critères de gravité observés à l'échelle comportementale.

Ce projet nécessitera 220 souris sur une durée de 3 ans. Nous utilisons un modèle d'injection au niveau de l'oreille interne qui produit chez la souris des sensations de vertiges. Des traitements antibiotiques, anti-inflammatoires et analgésiques seront administrés en post-opératoire. Des mesures comportementales permettent de suivre la compensation, elles sont équivalentes à ce qui est pratiqué en clinique afin d'évaluer un trouble vestibulaire, et consistent en des mesures non-invasives du mouvement des

yeux. Les tests de comportement vestibulaire seront réalisés sur les mêmes animaux qui seront ensuite utilisés en post-mortem pour des analyses à l'échelle cellulaire/ moléculaire, ce qui permet de réduire significativement le nombre de souris. Les tests réalisés in vitro consistent en des expériences d'immuno-histochimie ou d'électrophysiologie qui visent à comprendre le fonctionnement des neurones qui traitent les informations vestibulaires afin de permettre le développement de nouvelles thérapies pharmacologiques. Il n'est pas possible de multiplier ces neurones en culture pour remplacer le modèle in vivo. Les données recueillies seront utilisées pour établir une grille de corrélation entre l'étiologie et la symptomatologie des troubles vestibulaires en collaboration avec d'autres équipes nationales.

4122. La fibrose hépatique est la conséquence de mécanismes, de réparation tissulaire et de réactions inflammatoires, chroniques et non résolus. Elle est caractérisée par une augmentation du dépôt de protéines matricielles qui désorganisent l'architecture des organes touchés. La fibrose hépatique est une résultante commune aux pathologies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine virale (hépatite C), parasitaire, biliaire, auto-immune ou consécutive à une stéatohépatite alcoolique ou non alcoolique (NASH). La progression de la fibrose hépatique conduit à terme à la cirrhose, source de morbidité et de mortalité élevées.

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

Actuellement, aucun des modèles de rongeurs disponibles, ne reproduit fidèlement la physiopathologie humaine de la fibrose. Son induction pouvant être réalisée par voie chimique, alimentaire, infectieuse ou génétique. Les procédures expérimentales présentées ici font partie d'un large programme d'évaluation de nouvelles molécules ayant pour objectif de combattre les maladies autoimmunes par une voie originale. Parmi toutes les pathologies auxquelles nous nous intéressons, certaines produiront une atteinte hépatique, liée au développement de la fibrose à l'origine de certaines formes de cirrhose ou d'hépatocarcinomes. Nous focaliserons donc ici nos travaux sur la composante Fibrose qui est associée à ces pathologies, quel qu'en soit son origine, le processus inflammatoire qui l'initie peut être combattu. L'évaluation de l'efficacité de nos produits sur le paramètre fibrose sera réalisée dans un modèle de rongeurs chez qui ce trouble est induit par l'association d'un régime et d'un agent chimique, les variantes des procédures expérimentales proposées permettront de mieux cerner les propriétés préventives ou protectrices des produits ou au contraire de mettre en avant une activité dite curative.

L'évaluation de molécules d'intérêt pour le traitement de la fibrose hépatique sera réalisée au cours de la durée de 5 ans couverte par ce projet avec 2825 souris et 2825 rats.

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

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

4123. Face à l'augmentation inquiétante de l'obésité et de maladies associées comme le diabète de type 2 dans le monde, les chirurgies bariatriques sont de plus en plus utilisées. En plus de leur efficacité dans le traitement de l'obésité, ces chirurgies permettent de guérir le diabète de type 2, avant toute perte de poids. Après un By-Pass gastrique, les patients présentent une diminution des sensations de faim et une perte d'appétence pour les produits gras, qui contribuent à la perte de poids. Cependant les mécanismes moléculaires qui entraînent ces modifications bénéfiques du métabolisme et du comportement alimentaire restent largement mal connus. En situation physiologique, la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique sont déterminées par un dialogue constant entre le système nerveux central et les organes périphériques, en particulier l'intestin. De nombreuses études suggèrent que la biodisponibilité des acides biliaires pourrait jouer un rôle bénéfique dans le maintien de l'homéostasie énergétique. Après une chirurgie bariatrique comme le by-pass gastrique Roux-en-Y ou la gastrectomie longitudinale, une augmentation des acides biliaires circulants a été observée. De plus, il a été montré qu'une simple modification du trajet de la bile, directement délivrée dans l'intestin distal, permet de reproduire les effets bénéfiques du by-pass chez le rat. En plus des effets périphériques, les acides biliaires pourraient agir rapidement au niveau central via leurs récepteurs localisés dans le système nerveux central.

Le but du projet est de valider les gestes techniques et de raffiner la reprise de la phase digestive pour réaliser un by-pass gastrique chez la souris. Cette technique sera utilisée ensuite afin de déterminer le rôle du système de détection des acides biliaires au niveau central par liaison à leurs récepteurs localisés dans l'hypothalamus (région du cerveau) sur les effets bénéfiques de la chirurgie bariatrique.

Ce projet a été élaboré en accord avec les 3R :

Dans ce cadre, l'étude ne peut être réalisée que chez l'animal pour conserver l'intégration centrale (au niveau du cerveau) du signal métabolique engendré par la chirurgie bariatrique. Une chirurgie de type By-Pass Gastrique Roux-en-Y humain mais sans réduction de la taille de l'estomac a été mise au point chez la souris. Cette procédure nécessite la maîtrise de gestes techniques de microchirurgie réalisés par des personnes expérimentées et entraînées (nécessité de réaliser la chirurgie régulièrement). Pour cela, cette étude pilote permettra de valider l'ensemble des gestes et techniques mis en œuvre pour effectuer cette chirurgie invasive par deux personnes expérimentées en microchirurgie digestive chez la souris.

Le nombre de souris qui subiront cette chirurgie a été calculée au plus juste pour assurer une bonne réalisation de la technique chez des souris obèses. Nous utiliserons des souris de réforme de l'animalerie dont le génotype n'est pas utilisable pour d'autres projets. Un lot de 30 animaux subira la chirurgie pour acquérir les gestes techniques mais sera mis à mort avant le réveil de l'animal. Un lot de 30 animaux subira la chirurgie et tous les soins post-opératoires jusqu'à la reprise d'une alimentation solide pour raffiner la période de reprise alimentaire après le By-Pass gastrique. Pour conserver la maîtrise des gestes de chirurgie, deux animaux/mois seront opérés sans réveil (30 animaux sur 15 mois). Au total, un maximum de 90 souris subira la chirurgie sur une période de 2 ans, incluant un entraînement à la chirurgie By-pass tous les mois.

La chirurgie de type By-pass nécessite une prise en charge importante de l'animal avant (période d'adaptation), pendant et après l'opération (au minimum 10 jours) pour limiter le stress et la douleur. Un mélange d'analgésiques sera injecté à la souris avant l'anesthésie et 5 jours après la chirurgie. Un analgésique local sera appliqué avant l'ouverture de l'abdomen ainsi qu'au moment de la suture de la paroi abdominale. La chirurgie sera réalisée dans des conditions d'asepsie contrôlées pour limiter toute infection. Lors de l'intervention et à son réveil, la température de l'animal sera maintenue à 37°C. La reprise de l'alimentation sera très progressive et contrôlée pour limiter tout risque de fissure gastrique ou toute occlusion. Une grille de suivi du comportement de l'animal et de ses paramètres physiologiques (respiration, température, prises alimentaire et hydrique) permettra de repérer tout signe de souffrance ou mal-être. L'atteinte d'un point limite (décrit dans la grille de score) entraînera la mise à mort de l'animal selon les méthodes autorisées par la législation.

En conclusion, ces expériences permettront de valider les gestes et les soins post opératoires du by-pass gastrique chez la souris dans le but d'étudier ensuite les mécanismes moléculaires qui pourraient expliquer les effets bénéfiques du by-pass gastrique sur la perte de poids et sur le métabolisme en général (amélioration de la sensibilité à l'insuline...).

4124. Les besoins en calcium des vaches laitières augmentent de façon très importante en début de lactation du fait de la forte teneur en calcium du lait. Pour couvrir ces besoins, les vaches doivent mobiliser leurs réserves osseuses. Cette mobilisation perdure pendant les premiers mois de lactation et elle est suivie pendant la fin de lactation/gestation par une phase de reconstitution de l'os. L'ampleur de ces cycles de mobilisation/reconstitution osseuse est difficile à quantifier et peu connue. Pourtant, une meilleure connaissance de l'effet de l'alimentation minérale sur l'amplitude de ces cycles est nécessaire pour ajuster au mieux les apports d'aliment minéral des vaches afin de limiter les rejets de phosphore dans l'environnement tout en veillant à ce que les vaches puissent effectivement reconstituer leur squelette entre les lactations. Dans ce contexte, un enjeu scientifique est de disposer de méthodes permettant de quantifier indirectement les cycles de mobilisation/reconstitution osseuse et nécessitant le moins d'interventions possibles sur les animaux. Une question scientifique est aussi de déterminer en quoi la dynamique d'alimentation minérale des vaches laitières au cours de la lactation peut jouer sur l'amplitude de ces cycles.

Ainsi les objectifs des essais du projet seront de déterminer :

- 1) si le suivi de la teneur en calcium du lait au cours de la lactation reflète les variations des cycles de mobilisation/reconstitution osseuse des vaches,
- 2) si une modification de l'alimentation minérale en début de lactation peut modifier l'amplitude de la mobilisation osseuse en début de lactation et/ou les rejets fécaux de calcium et de phosphore,
- 3) si des différences éventuelles d'amplitude de mobilisation osseuse en début de lactation se traduisent par des différences en terme de reconstitution osseuse en fin de lactation,
- 4) si le choix de la source minérale de calcium peut, au même titre que la teneur en calcium de la ration, contribuer à des différences de rétention osseuse et de rejets de calcium et de phosphore.

Pour répondre à ces objectifs deux essais seront réalisés. Ils impliqueront au total 19 vaches. Le premier essai impliquera 15 vaches laitières. Il visera à quantifier l'effet de deux régimes alimentaires expérimentaux visant à créer une mobilisation osseuse accrue en début de lactation par rapport à un régime témoin classique en élevage laitier. Les deux régimes expérimentaux consisteront en une diminution de la teneur en calcium de la ration pendant 8 semaines, accompagnée ou non d'une augmentation de la teneur en chlore et d'une diminution de la teneur en sodium. Les teneurs en calcium, sodium et chlore de ces rations resteront néanmoins dans des gammes permettant une adaptation physiologique des animaux sans développement de pathologies. Le second essai impliquera 4 vaches laitières et consistera à quantifier l'effet de 4 sources de calcium sur le métabolisme phosphocalcique de ces animaux. Sur les deux essais, des prises de sang seront réalisées afin de mesurer les teneurs sanguines en certains biomarqueurs du métabolisme osseux. Des bilans de calcium et de phosphore ingérés et excrétés seront également réalisés par collecte totale des quantités de fèces et d'urine excrétées sur des périodes de quelques jours. Les quantités ingérées, les productions laitières et la composition des laits seront également suivies.

Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour étudier l'effet de l'alimentation minérale sur l'amplitude des cycles de mobilisation/ reconstitution osseuse et le métabolisme calcique des vaches.

Réduire : Le schéma expérimental totalement randomisé avec co-variables dans l'essai 1, et en carré latin de l'essai 2, ainsi que le traitement statistique des données permettront de répondre aux objectifs scientifiques tout en limitant le nombre d'animaux à 19 dans ce projet.

Raffiner : La conduite d'élevage sera respectueuse du bien-être des animaux. Un suivi régulier du comportement des animaux sera mis en place pour détecter le plus rapidement possible tout signe de souffrance ou de douleur. Des points limites adaptés ont été définis afin d'éviter au maximum toute forme de souffrance des animaux.

4125. L'épidémie d'infection au virus Zika a, après plusieurs épisodes isolés, pris une ampleur importante en particulier en Amérique du Sud et Centrale. Elle pourrait s'étendre à d'autres zones. Cette épidémie a été associée à un nombre accru de naissances d'enfants ayant un petit cerveau (microcéphalie). Cette atteinte traduit un développement cérébral anormal pouvant être accompagné de graves déficits moteurs, cognitifs et psychologiques quand ces enfants ne meurent pas prématurément.

Le but de cette étude est de déterminer les mécanismes d'infection au cours de la grossesse (in utero) du fœtus par le virus Zika, l'apparition de lésions cérébrales et/ou d'une microcéphalie chez le nouveau-né infecté et d'identifier des biomarqueurs de ces lésions.

Cette étude doit se faire sur un modèle pertinent d'infection au virus Zika pendant la grossesse. Aujourd'hui, l'accès aux tissus humains est très limité, et aucun dispositif in vitro ou in silico ne peut modéliser la complexité du cerveau humain en développement ni les relations in utero entre la mère et le fœtus. Le recours aux animaux est donc indispensable. L'utilisation dans ce projet de primates non humains (PNH) se justifie ici par la proximité des caractéristiques anatomiques, physiologiques et immunologiques, notamment au cours de la gestation entre le PNH et l'Homme. En effet la longue durée de gestation, la structure du placenta (le tissu qui nourrit le fœtus à partir du sang de la mère) et le développement cérébral long du fœtus ainsi que sa maturité à la naissance sont similaires, ce qui n'est pas le cas chez les rongeurs ou d'autres mammifères.

Le projet comprend 40 animaux (mères et fœtus) nés et élevés dans des structures agréées. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire afin d'obtenir des données statistiquement suffisantes pour caractériser les lésions induites et identifier des marqueurs précoces des atteintes cérébrales. Après injection de particules virales, des échantillons de sang maternel, sang fœtal et liquide amniotique peuvent facilement être obtenus en série à partir d'un même animal, ce qui permet également de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour veiller au bien-être animal et éviter toute souffrance lors des interventions. Des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus entraînant une souffrance chez un animal. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté immédiatement afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

4126. Les compétences concernant les gestes techniques qui sont pratiqués lors de procédures expérimentales sur animaux vivants doivent être acquises et validées.

Pour la validation de certains gestes techniques, ce projet prévoit de le faire sur animaux vivants anesthésiés. Il s'agira donc de travaux pratiques.

Pour ces travaux pratiques, il s'agira de manipulations directes des animaux par les personnes formées, pour validation. Cette formation contribue au raffinement puisqu'elle permettra par la suite que seules des personnes ayant les compétences techniques validées concernant les techniques les plus raffinées et à l'état de l'art puissent réaliser les gestes. Le nombre strictement minimum sera utilisé par étudiant. Des validations sur des techniques non invasives seront aussi faites de façon à garantir des mesures efficaces et pertinentes (examens cliniques, pesées, contention et identification). Ceci contribuera à la réduction et au raffinement pour les procédures expérimentales futures à mettre en œuvre par des personnels aux compétences validées.

Malgré la possibilité d'utilisation jusqu'à un certain point d'animaux de laboratoire artificiels, ou d'autres techniques sans utilisation d'animaux vivants, il demeure nécessaire pour la validation de certains gestes techniques d'utiliser des animaux vivants. Pour les utilisations décrites dans ce projet, la validation des gestes ne peut pas se faire autrement que sur animaux vivants anesthésiés.

Les travaux pratiques seront mis en place pour des acquisitions de compétences dans les domaines suivants : démonstration de l'anesthésie gazeuse chez les rongeurs (nécessaire pour les procédures suivantes), et techniques de manipulation, contention, administration de médicaments (intrapéritonéale, intra-veineuse intra-musculaire et sous-cutanée), prélèvement de sang à la veine sub-mandibulaire (méthode raffinée). Les mêmes animaux seront utilisés pour les acquisitions de compétences concernant les méthodes non invasives (contention, examen clinique, manipulations) et soit pour les administrations, soit pour les prélèvements. Ceci est un facteur de réduction. De plus, les animaux utilisés seront pris en priorité parmi des animaux issus d'élevages internes à l'établissement, jamais inclus dans des procédures expérimentales, sans phénotype dommageable, mais ne présentant pas un génotype utilisable par les chercheurs (et qui donc ne seraient normalement pas utilisés).

Pour ce projet, un total d'au maximum 1500 souris sera nécessaire du fait du nombre de personnels à former chaque année dans notre centre. Grâce aux livrets de compétence, la validation des gestes techniques sera valable après le départ des personnels de notre centre, car elle sera effectuée par la personne responsable des formations et compétences et attestée dans les livrets individuels des personnels formés, pour ces gestes concernés.

4127. Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause mondiale de morbidité et mortalité résultant de complications coronariennes (angor et infarctus du myocarde) et carotidiennes (accidents vasculaires cérébraux (AVC) et ischémiques transitoires (AIT)). Ces patients présentent des signes cliniques faisant suite à la rupture d'une plaque d'athérosclérose vulnérable ou à un phénomène d'embolisation menant à l'occlusion d'artères. La rupture de ces plaques d'athérosclérose vulnérables provoque la formation d'un thrombus (caillot de sang) qui obstrue potentiellement la lumière du vaisseau, entraînant l'ischémie

(diminution ou absence d'apport sanguin à un organe) myocardique et l'infarctus du myocarde ou bien l'embolisation à distance d'artères cérébrales menant à l'AIT ou l'AVC (qui représente la première cause de handicap chez l'adulte).

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

Ces plaques d'athérosclérose vulnérables à la rupture sont caractérisées par un nombre élevé de leucocytes et de cellules phagocytaires ainsi que par une accumulation de lipoprotéines (lipides et protéines). Ces caractéristiques permettent d'envisager des techniques d'imagerie moléculaire ciblant ces marqueurs de la plaque instable qui permettraient d'évaluer plus précisément les niveaux d'inflammation dans les lésions athéromateuses que l'imagerie conventionnelle (ultrasons en particulier).

Dans ce projet, nous souhaitons développer de nouveaux candidats radiopharmaceutiques spécifiques de ces plaques d'athérosclérose vulnérables en ciblant un biomarqueur de la pathologie : la phospholipase A2 associée aux lipoprotéines (Lp-PLA2). La Lp-PLA2 est une enzyme circulante produite par les cellules inflammatoires impliquées dans l'athérogenèse et principalement transportée par les LDL (low-density lipoproteins). La Lp-PLA2 dégrade rapidement les phospholipides à la surface des LDL oxydées, conduisant à la formation de produits inflammatoires et cytotoxiques favorisant la rupture des plaques vulnérables.

Précédemment, des ligands fluorés ont été développés afin d'inhiber la Lp-PLA2. Au vu des excellents résultats d'affinité de ces inhibiteurs obtenus in vitro vis à vis de l'enzyme, ces molécules fluorées seraient de très bons candidats pour l'imagerie TEP (Tomographie par Emissions de Positons) par radiomarquage au fluor-18. Grâce à des analogues radioactifs de ces molécules, l'imagerie des stades précédant la rupture de plaque d'athérosclérose vulnérable pourra être possible en ciblant le Lp-PLA2 accumulée dans le cœur nécrotique de la plaque.

Ainsi notre équipe de chimistes et radiochimistes a développé 6 analogues radioactifs de ces antagonistes de la Lp-PLA2 et pouvant ainsi être injectés chez l'animal pour une fixation sur l'enzyme à des fins diagnostiques de l'instabilité des plaques d'athérosclérose.

Chaque molécule radiomarquée sera testée in vitro au préalable pour évaluer l'affinité avec la Lp-PLA2 en utilisant des LDL : la Lp-PLA2 est connue pour se fixer sur les phospholipides des LDL en vue de les dégrader. Cependant, pour répondre à notre objectif, nous sommes obligés de réaliser des expérimentations sur les animaux pour savoir si nos radiotraceurs se dirigent sur les bonnes cibles lors du processus physiopathologique de l'inflammation présente sur des plaques vulnérables.

Le présent document décrit la partie in vivo de ce projet : nous souhaitons tester les 6 ligands radioactifs de la Lp-PLA2 sur deux modèles de souris. Un premier modèle inflammatoire permettra de tester l'affinité de chacune des molécules radioactives avec la Lp-PLA2 présente à la surface des cellules inflammatoires. Celui-ci sera réalisé par l'induction de cellules tumorales B16 (mélanome murin) dans des souris C57BL6. Nous utiliserons un total de 30 souris pour cette partie, réparties en 6 lots (3 lots induites et 3 lots contrôles). Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons choisi de tester 2 molécules par lot de 5 souris. Nous imagerons le même animal maximum 2 jours par semaine afin qu'il récupère de l'anesthésie.

Un second modèle murin utilisera des souris transgéniques dépourvues du gène de l'Apolipoprotéine E, appelées KO ApoE. Celles-ci développent des plaques d'athérome dont le phénotype devient inflammatoire lorsqu'elles reçoivent un régime riche en cholestérol. Un total de 30 souris sera utilisé, avec une répartition similaire au premier modèle. Pour réduire le nombre d'animaux nous avons choisi de tester 2 molécules par lot de 5 souris. Nous imagerons le même animal maximum 2 jours par semaine afin qu'il récupère de l'anesthésie.

Pour ce projet nous utiliserons donc 60 souris. Il s'agit d'un nombre réduit et minimum pour avoir des résultats exploitables statistiquement. Il s'agit d'une utilisation d'un marqueur pour du diagnostic et non du thérapeutique, ce qui nous permet d'avoir un nombre réduit d'animaux (5 par condition).

Les deux modèles utilisés n'induisent pas de souffrances. Les tailles des tumeurs seront mesurées quotidiennement pour s'assurer qu'elles ne génèrent pas de tension ou de douleur sur l'animal. Les plaques d'athéromes ne sont pas ressenties par les souris, le régime riche en cholestérol n'engendre pas de baisse d'activité car il n'y a pas de prise de poids. Elles seront surveillées tout au long du régime, en cas d'abattement marqué persistant, nous choisirons d'exclure l'animal de l'étude et d'arrêter le régime. La procédure d'imagerie n'induit pas de souffrance, les souris sont anesthésiées tout au long des acquisitions et les produits injectés seront testés in vitro pour s'assurer de leur innocuité.

4128. L'agalactie contagieuse de la brebis est une maladie infectieuse due à *Mycoplasma agalactiae* qui sévit, de façon enzootique, en France (Pays Basque) et, plus largement, dans les pays du pourtour méditerranéen (Portugal, Espagne, Italie, Grèce, ...) où elle provoque des pertes économiques importantes essentiellement dues à l'arrêt de la production de lait (agalactie) et, dans une moindre mesure, à des boiteries et des kératoconjunctivites.

Le projet présenté, intitulé "Tropisme tissulaire des mycoplasmes de ruminants : à la recherche de facteurs chromosomiques impliqués dans la dissémination et la colonisation", s'inscrit dans un programme d'élucidation des mécanismes du pouvoir pathogène de *M. agalactiae* et de recherche de méthodes de lutte. La durée totale du projet est de 2 ans, celle de la phase animale étant d'1,5 mois.

Afin de comprendre la diffusion et la colonisation de l'organisme hôte par *M. agalactiae*, en l'absence de modèle d'étude in vitro, un mélange de différentes souches de *M. agalactiae* sera inoculé simultanément à six brebis suitées en lactation (nombre minimum pour tenir compte de la variabilité de la réponse individuelle lors d'infections par *M. agalactiae*). La rapidité de l'excrétion mammaire de *M. agalactiae* sera suivie durant 1 mois grâce à des prélèvements de lait quotidiens. Le génome des souches isolées sera comparé et mis en relation avec la rapidité de diffusion et d'excrétion pour tenter d'identifier le ou les gènes associés au

tropisme mammaire. Des prélèvements de sang (5mL par animal) seront également réalisés sur les brebis avant inoculation puis une fois par semaine jusqu'à la fin du suivi afin de caractériser la séroconversion.

Les animaux seront élevés en box, sur caillebotis, et feront l'objet d'un suivi clinique quotidien par un vétérinaire assisté d'un personnel technique expérimenté. En cas d'apparition de signes aigus (arthrite, kératoconjonctivite), un traitement anti-inflammatoire et analgésique sera mis en œuvre.

A la fin de l'expérimentation, tous les animaux seront euthanasiés et feront l'objet de prélèvements d'organes afin d'y caractériser la diffusion des différentes souches de *M. agalactiae*.

4129. La voie de signalisation purinergique, principalement les actions de l'ATP et de ses dérivés extracellulaires, est la voie de communication intercellulaire la plus répandue dans l'organisme avec au moins un récepteur purinergique exprimé à la surface de chaque cellule. Dans le système nerveux en particulier, l'ATP libéré par les neurones et les cellules gliales contribue à de nombreuses fonctions physiologiques telles que la neurotransmission, la neuromodulation et la communication neurone-glie. De par leur implication dans une multitude de neuropathologies, l'ATP et ses récepteurs ionotropiques P2X sont désormais une cible thérapeutique pour les traitements de la douleur ou les maladies neurodégénératives. L'objectif est de mieux comprendre les mécanismes de régulation moléculaire des récepteurs de l'ATP et le rôle de la signalisation purinergique dans le contrôle de l'activité synaptique du système nerveux. Ces travaux contribueront à mieux comprendre la fonction de la signalisation purinergique dans la formation du système nerveux mais aussi leur implication dans le cerveau adulte normal et dans de nombreuses maladies neurodégénératives. Pour caractériser les propriétés des récepteurs P2X de l'ATP et leur effet sur d'autres récepteurs à des neurotransmetteurs, nous exprimerons ces différents récepteurs *in vitro* dans des ovocytes de xénopes (*Xenopus laevis*) qui ont une formidable capacité d'expression hétérologue et qui sont dépourvus à leur surface de récepteurs endogènes. Nous devons pour cela prélever des ovocytes sur des femelles xénopes. Dans le respect de la règle des 3R, 1) afin de réduire le nombre d'animaux, nous n'effectuerons qu'un seul prélèvement hebdomadaire qui servira à l'ensemble des expériences planifiées. Au total sur la durée de 5 ans du projet, nous utiliserons 60 xénopes femelles adultes. 2) Nous prendrons en compte la douleur provoquée aux femelles pour le prélèvement des ovocytes.

4130. Les capacités des mammifères aquatiques à goûter et/ou sentir sont encore méconnues alors même que nous savons que la perception des stimuli chimiques est impliquée, chez les mammifères terrestres, dans un vaste panel de fonctions biologiques. Notre projet consiste donc à étudier, pour la première fois de manière approfondie, cette perception chimique chez différents groupes de mammifères vivant dans l'eau (ex : dauphins, baleines, phoques, lamantins, loutres...).

Nos objectifs sont i) de caractériser l'utilisation de la communication chimique par ces animaux, ii) de comparer les adaptations évolutives de ces systèmes sensoriels en fonction du degré de retour à la vie aquatique (i.e. vie exclusivement ou partiellement aquatique) et iii) de mettre en application les données collectées dans un but de conservation de ces espèces menacées et de préservation de la biodiversité des milieux aquatiques. Pour ce faire, nous proposons une approche pluridisciplinaire originale permettant d'intégrer les 3 niveaux d'exploration de la communication chimique : 1) le volet chimique correspond à l'analyse des molécules émises et potentiellement impliquées, 2) le volet anatomique repose sur l'étude des organes récepteurs et des structures cérébrales permettant de percevoir ces signaux chimiques (exploitation d'échantillons recueillis sur des animaux morts échoués) et enfin 3) le volet comportemental propose d'étudier les fonctions biologiques de cette forme de communication notamment dans l'alimentation et la vie sociale de ces espèces (expériences en captivité et en milieu naturel). Outre l'aspect fondamental et novateur des connaissances ainsi obtenues, ce projet pourrait permettre d'identifier des molécules répulsives utilisables dans un cadre de sauvegarde des mammifères marins afin, par exemple, de les maintenir à distance de zones dangereuses (filets de pêche, trafic maritime intense...) tout en améliorant la cohabitation avec les activités économiques humaines (pêche et pisciculture notamment). Les exigences de remplacements, réduction et raffinement ont été prises en compte, sachant que les modèles d'étude sont des espèces sauvages. Les expériences concerneront au maximum 50 individus d'espèces de mammifères marins (au maximum 20 par espèces).

4131. Le Lipolysis Stimulated lipoprotein Receptor (LSR) est un récepteur qui a été pour la première fois décrit en 1992. Il est impliqué dans diverses fonctions biologiques, en particulier, il est responsable de la distribution des lipides entre le foie et les tissus périphériques. Il a été montré que l'inactivation d'un allèle du gène LSR (LSR +/-), phénotype non dommageable, entraîne une augmentation des triglycérides et du taux de cholestérol plasmatique. La complète inactivation de ce gène chez la souris est létale au niveau embryonnaire.

Nous disposons d'une lignée murine de fond génétique C57Bl6 qui est hétérozygote pour ce récepteur.

Nous souhaitons conserver cette lignée au sein de notre laboratoire. Pour cela, chaque année, 5 souris hétérozygotes seront accouplées avec 5 souris C57Bl6 homozygotes (LSR +/+) provenant de notre fournisseur, soit 50 souris utilisées lors de ce protocole de conservation de lignée. De par notre expérience, seules des souris mâles hétérozygotes seront accouplées avec des souris femelle homozygotes (Réduction). L'accouplement se fera dans un box dédié, les cages seront enrichies avec un igloo et du coton pour la nidification (Raffinement). Dès que la gestation aura été observée, le mâle sera séparé de la femelle. Les femelles seront particulièrement observées jusqu'à leur mise-bas. Les petits seront ensuite sexés, sevrés, identifiés et génotypés à leur 21ème jour. Ils sont identifiés à l'aide d'une puce injectée en sous cutané sur le dos. Cette injection est réalisée sous anesthésie gazeuse, le prélèvement d'un fragment d'oreille au punch à biopsie (1mm de diamètre) est également réalisé lors de cette anesthésie. Un protocole de génotypage sera réalisé à partir de ce fragment car le génotype LSR +/- ne confère aucun phénotype

visible. Les animaux ne subiront que cette procédure légère. Tout au long de leur vie, les animaux seront plusieurs, dans des cages adaptées et leur milieu sera enrichi une semaine avec un igloo et la semaine suivante avec un tunnel, afin qu'ils ne s'acclimatent pas à l'enrichissement, ce qui le rendrait inutile.

Cette lignée n'est pas commerciale et la cryoconservation n'est pour l'instant pas maîtrisée au sein de notre laboratoire (Remplacement).

Les souris sont maintenues dans un cycle jour-nuit de 12 heures à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et une hygrométrie de $55 \pm 20\%$. Elles disposeront de nourriture et d'eau ad libitum. Un contrôle visuel des souris sera réalisé tous les jours. Une souris subira les soins nécessaires si il y a apparition de lésions cutanées, conjonctivite, bagarres, dents longues... Si malgré les soins ou si d'autres signes apparaissent tels que prostration, piloérection, diarrhées, hypothermie, perte de poids,... cette souris sera mise à mort selon une méthode réglementaire.

4132. Il s'agit de modifications du projet portant le même titre et autorisé sous le numéro 2015090717525577.

Les modifications portent sur les cellules injectées, conduisant donc à une augmentation du nombre de souris, ainsi que le suivi des souris. Les modifications sont clairement indiquées dans le document.

Résumé non technique inchangé sauf le nombre de souris porté à 300 au lieu de 270.

La leucémie aiguë lymphoblastique de la lignée B, un cancer du sang, est très fréquente chez l'enfant. Une grande proportion de ces enfants porte une anomalie génétique qui génère une protéine de fusion anormale appelée ETV6/RUNX1. Le pronostic de ce cancer est généralement bon, mais les traitements actuels conduisent à des risques de cancers secondaires avec un taux de 10% à 15 ans. Nos efforts se portent sur la compréhension de l'apparition et de la progression de ces leucémies.

Pour cela, nous injectons dans des souris des cellules leucémiques que nous modifions génétiquement pour étudier le rôle de certaines molécules sur la progression de la leucémie. Nous n'avons pas d'autre alternative pour étudier la progression de la leucémie. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux, l'ensemble du projet utilisera 300 souris, nombre minimal requis pour avoir des groupes significatifs (test de Mann-Whitney).

Dix souris par groupe seront utilisées pour ces expériences. Nous estimons le nombre d'animaux requis à 300 souris sur 5 ans.

Lors de ces procédures, nous respecterons la règle des 3R. Remplacer : nous n'avons pas d'autre alternative pour étudier la progression de la leucémie que d'utiliser un modèle vertébré qui ne rejette pas les greffes de cellules-le modèle souris que nous utilisons répond bien à ce besoin. Réduire : dans un souci de réduction du nombre d'animaux, l'ensemble du projet utilisera 300 souris sur 5 ans, soit 10 souris par groupe, nombre minimal requis d'après nos études préliminaires, pour avoir des groupes significatifs (test de Mann-Whitney). Raffiner : nos études préliminaires nous ont permis d'ajuster les procédures pour définir au mieux les points limites et minimiser ainsi la souffrance animale.

4133. La démence vasculaire est une maladie non dégénérative, deuxième cause de démence après la maladie d'Alzheimer et conduisant à des troubles profonds de la mémoire. Il est nécessaire de développer des médicaments afin de traiter cette maladie, et pour ce faire, de valider des modèles précliniques afin d'y tester ces molécules. Nous nous proposons d'évaluer les effets de l'injection intracérébrale d'homocystéine, un acide aminé élevé chez les patients souffrant de cette maladie, chez la souris C57BL6J, traditionnellement utilisées pour l'étude de la mémoire.

Pour ce faire, nous injecterons 2 doses différentes d'homocystéine, ou de sérum physiologique servant de contrôle, dans le cerveau des souris. La chirurgie est effectuée par du personnel compétent, dans des conditions aseptiques, et sous anesthésie générale (raffinement). De plus les animaux suivent un traitement anti inflammatoire avant et après la procédure (raffinement).

Après un temps de récupération, les animaux seront soumis à deux tests comportementaux visant à évaluer leur capacité de mémoire. Afin de réduire le nombre d'animaux, mais de toujours pouvoir évaluer la progression des déficits comportementaux, nous utiliserons les mêmes animaux à 15, 30 et 60 jours après l'injection cérébrale (réduction).

Les deux tests de mémoire sont le test de la reconnaissance d'objet et le test de mémoire topographique.

Test de mémoire topographique : Ce test utilise une boîte expérimentale comprenant deux compartiments de forme et d'aspect modulables par addition d'inserts. Les deux compartiments sont connectés par un couloir. Le principe du test est le suivant : L'animal est placé pendant 5 minutes dans la boîte, mais seulement un compartiment est accessible

(Phase d'acquisition). L'animal est ensuite replacé dans sa cage. Après 30 minutes, l'animal est replacé dans la boîte (phase de restitution) alors que les deux compartiments sont accessibles. Si l'animal se rappelle du compartiment visité lors de la phase d'acquisition, il explorera le nouveau compartiment. Le temps passé par l'animal en exploration active dans chaque compartiment est mesuré afin d'établir une mesure de la mémoire topographique.

Pour le test de reconnaissance d'objets le principe est similaire au test précédent sauf que l'animal est d'abord mis en présence de deux objets identiques pendant la phase d'acquisition, puis un des objets est remplacé avec un nouvel objet, non vu auparavant, lors de la phase de rétention. Ces deux tests évaluent deux types de mémoire bien distincts et modulés par deux zones distinctes du cerveau.

Les animaux seront soumis au test de la mémoire topographique à J+15, J+30 et J+60 après l'injection intra-cérébrale, et au test de reconnaissance d'objet à J+16, J+31 et J+61.

Nous utiliserons 36 souris C57BL6J mâles, réparties en 3 groupes (2 doses d'homocystéine et un groupe contrôle (sérum physiologique), couramment utilisés dans la recherche sur le cerveau, auxquelles nous ajouterons 2 souris afin de palier à des problèmes lors de la chirurgie. Soit un total de 38 souris. Ceci permettant l'utilisation d'un nombre minimum d'animaux (réduction) mais aussi de permettre d'utiliser les résultats même si un animal par groupe devait à manquer. 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), ce qui est nécessaire pour tester leur mémoire, car un animal souffrant ou stressé ne peut effectuer ces tests.

Les tests de mémoire étant sensibles au stress, les animaux présentant des signes de stress ou une santé fragile seront mis à mort immédiatement pour éviter toute souffrance inutile. Tous les animaux seront mis à mort à la fin de cette étude.

Tous les animaux seront mis à mort 61 jours après l'injection cérébrale, les cerveaux seront prélevés afin de mesurer différents paramètres des cellules du cerveau et ainsi de les comparer avec la pathologie humaine.

4134. La sclérose en plaques (SEP) est une maladie qui touche le système nerveux central (cerveau et moelle épinière) de l'adulte et qui conduit notamment à des douleurs chroniques et un handicap physique important. C'est une pathologie auto-immune : les défenses immunitaires s'attaquent à la myéline qui enrobe les fibres nerveuses. Elle est liée à une inflammation chronique du cerveau et de la moelle épinière (neuroinflammation) qui s'accompagne d'une démyélinisation. La SEP n'a pas de traitement mais des thérapeutiques comme les corticostéroïdes permettent de ralentir la progression de la maladie et de préserver la qualité de vie.

Il existe un modèle validé de la SEP qui reproduit sa physiopathologie notamment une neuroinflammation du système nerveux, une démyélinisation progressive et des déficits moteurs. Il s'agit du modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE).

La crotoxine est une neurotoxine dérivée du venin de Crotale sud-américain (*Crotalus durissus terrificus*). Il a récemment été démontré que, à dose non toxique, elle a des effets anti-nociceptif, anti-inflammatoire et immuno-modulateur induisant une analgésie et une réduction des signes cliniques chez le modèle EAE induit par le peptide MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein).

Notre hypothèse est que la crotoxine interfère avec le processus de démyélinisation, ralentissant la progression des signes cliniques. Notre objectif est d'évaluer dans un organisme entier (in vivo) le processus de démyélinisation et le potentiel thérapeutique de la crotoxine, compte tenu de la complexité des interactions entre système immunitaire et nerveux. Pour cela, nous suivrons quantitativement le processus de démyélinisation chez le modèle murin EAE en combinant l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) et la tomographie par émission de positons (TEP). D'une part, des techniques récentes d'IRM seront utilisées pour sonder la microstructure cérébrale et la concentration de myéline in vivo et ex vivo à des résolutions spatiales sans précédents. D'autre part, des radiotraceurs TEP spécifiques de la myéline et de l'activation gliale permettront de suivre spécifiquement la progression de la pathologie.

Notre étude préclinique se déroulera en deux étapes. Tout d'abord, les processus de neuroinflammation et de démyélinisation progressive seront caractérisés chez le rongeur exprimant la pathologie SEP, sans traitement. Ces données permettront notamment de calibrer et valider nos outils d'imagerie quantitative. Dans un second temps, l'action thérapeutique de la crotoxine sera évaluée en double aveugle face à un placebo et un traitement de référence corticostéroïde.

Notre étude a été conçue avec la volonté de respecter les règles éthiques, en particulier de réduire le nombre d'animaux (maximum 140 animaux issus d'un élevage autorisé) en effectuant des suivis dans le temps et en utilisant l'IRM et la TEP, deux techniques d'imagerie non-invasive.

Les protocoles d'anesthésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Une visite quotidienne des animaux sera effectuée pour s'assurer du bien-être des animaux. Les animaux sont hébergés en groupes dans des cages enrichies de modules leur permettant d'améliorer leur condition de vie. Une surveillance particulière de l'état de santé des animaux sera également mise en place par l'application d'échelles cliniques journalières et de critères d'arrêts tout au long de l'étude. Dans le cas d'effet inattendu, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en œuvre les traitements appropriés ou de décider de l'euthanasie. Le projet a été soumis au comité d'éthique et l'ensemble de ses recommandations seront mises en œuvre.

4135. L'automatisme cardiaque résulte d'une action coordonnée et d'une association fonctionnelle entre plusieurs types de canaux ioniques. Le système nerveux autonome régule l'activité des canaux ioniques afin d'adapter la fréquence cardiaque aux besoins physiologiques de l'organisme. Les dysfonctions de l'automatisme cardiaque impliquent différents types d'arythmies, telles que la bradycardie sino-atriale, les blocs auriculo-ventriculaires, le syndrome de tachy-bradycardie et les tachycardies ventriculaires, et constituent un problème clinique majeur. Toutefois, le développement d'approches thérapeutiques innovantes pour contrôler ces arythmies reste limité du fait de la compréhension incomplète du rôle fonctionnel des canaux ioniques dans la genèse et la régulation de l'automatisme cardiaque. Pour pallier ces troubles du rythme, il manque actuellement des molécules sélectives capables de moduler l'activité des canaux ioniques impliqués dans l'activité pacemaker cardiaque. En bloquant le canal potassique activé par les protéines G (GIRK4, ou Kir3.4, canal activé par la stimulation vagale) par des approches génétiques et pharmacologiques, nous avons récemment démontré qu'il est possible de normaliser la fréquence cardiaque chez des souris présentant des arythmies telles que la fibrillation atriale, la dysfonction sinusale, les défauts de conduction atrio-ventriculaire et les tachycardies ventriculaires. Ce résultat hautement innovant ouvre des perspectives extrêmement intéressantes pour le contrôle de la bradycardie et des arythmies associées en recherchant de nouvelles molécules régulant le canal GIRK4.

Notre projet de recherche s'articule autour de 2 objectifs principaux :

- L'étude du mécanisme de correction des troubles du rythme par la perte ou l'inhibition du canal GIRK4.
- Le criblage de molécules ciblant le canal GIRK4 comme approche thérapeutique pour réguler et normaliser la fréquence cardiaque chez des souris présentant des bradycardies et des arythmies associées.

Notre but est de permettre une meilleure compréhension des dysfonctions des mécanismes du pacemaker cardiaque et de proposer une approche thérapeutique innovante pour corriger la bradycardie et les arythmies associées chez les patients.

Dans cette perspective, nous allons utiliser un modèle de souris invalidée (Knock-Out) à l'état hétérozygote pour le gène *Scn5a* (souris *Scn5a+/-*). Ce gène code pour la sous-unité alpha du canal sodique cardiaque Nav1.5 qui joue un rôle déterminant en électrophysiologie cardiaque. Chez l'homme, des mutations au niveau de ce gène provoquent un large spectre de pathologies, incluant le syndrome du QT long, le syndrome de Brugada, la fibrillation atriale et des troubles de la conduction cardiaque. La souris *Scn5a+/-*, comme certains patients haplo-insuffisants pour ce gène, présentent une bradycardie sinusale mineure, des troubles majeurs mais progressifs de la conduction auriculo-ventriculaire et des tachycardies ventriculaires. Nous souhaitons vérifier si le blocage du canal GIRK4 peut corriger les défauts électrocardiographiques observés dans ce modèle, en particulier les défauts de conduction auriculo-ventriculaire.

Cette étude pilote sera réalisée par le suivi électrocardiographique continu de souris vigiles implantées avec un capteur téléométrique. La téléométrie permettra de quantifier les défauts électrophysiologiques sans interaction avec un protocole d'anesthésie perturbant la régulation cardiaque par le système nerveux autonome. Les capteurs téléométriques seront implantés sur 12 souris *Scn5a+/-* et 6 souris sauvages. L'intervention chirurgicale sera réalisée sous anesthésie. Une analgésie péri-opératoire et post-opératoire sera mise en place. Après une phase de récupération post-opératoire d'au moins une semaine, l'ECG des souris sera enregistré pendant 7 jours. Dans un premier temps, on enregistrera l'ECG des souris pendant 48 h (J1 et J2) afin de quantifier les défauts électrophysiologiques et l'incidence éventuelle d'arythmies ventriculaires spontanées (extrasystoles, tachycardie...). A J3, afin de contrôler l'influence de l'injection, les souris recevront une injection intrapéritonéale (i.p.) de placebo (NaCl 0.9%). A J4, les souris recevront une injection i.p. de 0.1 mg/kg d'un inhibiteur du canal GIRK4, la Tertiapine Q. A J5, elles recevront une injection de 1 mg/kg de Tertiapine Q. Après cette injection, un délai de 48 heures sera appliqué avant l'administration d'une dose de 5 mg/kg à J7.

Respect de la règle des 3R.

Réduction. Cette étude sera réalisée sur 12 souris *Scn5a+/-*. Ce nombre permettra une analyse statistique fiable des résultats obtenus. Les 6 souris sauvages, issues des mêmes portées que les souris *Scn5a+/-*, permettront de vérifier que nous obtenons bien l'effet attendu (une accélération du rythme cardiaque) sur le fond génétique (129 Sv) de notre lignée, l'ensemble des expérimentations antérieures ayant été réalisées sur des modèles de souris C57Bl6/J.

Remplacement. Les arythmies cardiaques sont des maladies complexes résultant des interactions entre les cardiomyocytes, dont l'activité électrique est altérée, les fibroblastes cardiaques (70% des cellules cardiaques) et le système nerveux autonome. Ce niveau d'intégration ne peut être obtenu que sur un modèle animal.

Raffinement. Les souris seront hébergées en cages ventilées enrichies de papier pour réaliser des nids. Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie avec une prise en charge analgésique adaptée à chaque technique.

4136. Les gliomes sont des tumeurs cérébrales ayant une incidence de 4 à 5 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes. Il s'agit également du deuxième type de cancer le plus fréquent chez l'enfant. Les patients atteints de glioblastome, le plus agressif des gliomes, survivent en moyenne 14 mois après le diagnostic de la tumeur et ce malgré le traitement combinant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. C'est pourquoi il est nécessaire de chercher de nouveaux traitements. Notre projet s'inscrit dans ce contexte en utilisant une source de rayons X très particulière et encore expérimentale, de basse énergie mais de haut flux, permettant (i) de sélectionner au mieux les énergies intéressantes (ii) de faire un microfractionnement spatial de la dose. Ces deux spécificités ne sont pas techniquement possible sur les sources classiques hospitalières à l'heure actuelle. Nous explorons le potentiel de cette technique depuis une quinzaine d'années déjà, selon différentes approches : simulation Monte Carlo, dosimétrie expérimentale, irradiation de cellules en culture. Ces approches bien qu'indispensables restent très limitées car elles ne prennent pas en compte la complexité du tissu tumoral, se développant de façon autonome, possédant sa propre vascularisation etc... De fait, l'utilisation de modèles précliniques porcins permet de tester les modalités d'imagerie (diagnostique), les modalités d'irradiation (géométrie, balistique, dose) et les protocoles de thérapie visant à augmenter la sécurité du patient relativement à la dose délivrée (adjonction de médicaments anticancéreux) sur des tumeurs proches des tumeurs humaines. L'utilisation de cochons permet une analyse des effets secondaires à longs termes sur des volumes irradiés plus important que ce qui a été fait jusqu'alors sur des rongeurs. De plus les volumes irradiés seront plus réalistes que sur des rats et le cerveau circonvolué est un modèle plus proche de celui de l'homme.

Une des étapes indispensables pour la mise en place d'un nouveau protocole de radiothérapie est l'étude de la toxicité du traitement et ce projet permettra de tester la neurotoxicité à long terme de notre méthode sur le tissu cérébral sain. Les grandes étapes de ce projet incluent une série d'irradiation fractionnées dans le temps et l'évaluation de la neurotoxicité potentielle de cette méthode par des tests cognitifs et de comportement. Ce projet portant sur la physiologie cérébrale, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Pour cette demande et afin de respecter la règle des 3R, nous avons limité le nombre d'animaux à hauteur de 4 par expérience, avec 1 expérience par an et cela sur 3 ans (12 porcs). Ce nombre d'animaux a été déterminé grâce à un test statistique appliqué pour chaque expérience, à la littérature, aux expériences réalisées ces 15 dernières années qui nous a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Par ailleurs, certains protocoles de notre équipe font, déjà l'objet d'essais cliniques humains (patients volontaires souffrant de tumeurs cérébrales). L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

4137. L'infarctus du myocarde est l'une des premières causes de décès dans le monde. Sa prise en charge consiste en la reperfusion des artères obstruées. Une reperfusion précoce permet de diminuer la taille de l'infarctus et augmente

considérablement la survie des patients atteints. Cependant, cette phase de reperfusion est elle-même à l'origine de lésions délétères, dites lésions de reperfusion. Les stratégies de cardioprotection visent à limiter la formation de ces lésions additionnelles pour diminuer de façon encore plus importante la taille de l'infarctus. Notre équipe s'intéresse particulièrement à l'utilisation de certains antithrombotiques au moment de la reperfusion. En effet, un des mécanismes mis en jeu dans la formation des lésions de reperfusion est l'activation de la coagulation. La formation de caillots est également en lien avec des phénomènes inflammatoires par le biais d'enzymes impliquées dans la cascade de la coagulation (sérines protéases), capables d'activer des récepteurs générant des effets proinflammatoires. Ces liens entre inflammation et coagulation jouent un rôle important dans la formation des lésions de reperfusion. Ainsi, l'inhibition des sérines-protéases de la coagulation semble être une stratégie pertinente pour limiter les effets néfastes de la reperfusion. Le fondaparinux et le rivaroxaban sont deux molécules anticoagulantes, inhibant une sérine protéase de la coagulation, le facteur Xa. Le dabigatran est un inhibiteur direct de la thrombine. Notre équipe a déjà montré que le fondaparinux possédait un effet cardioprotecteur dans l'ischémie-reperfusion myocardique chez le rat et que cet effet était en lien avec l'activation précoce d'une voie de survie cellulaire (la voie SAFE). Nous souhaitons confirmer l'effet cardioprotecteur du fondaparinux chez le rat, avec un modèle d'ischémie-reperfusion myocardique comportant une phase de reperfusion plus prolongée. A l'aide de ce même modèle nous souhaitons étudier si le rivaroxaban et le dabigatran possèdent également un effet cardioprotecteur et en préciser le mécanisme. Nous voulons également préciser le mécanisme à l'origine de l'effet cardioprotecteur des anticoagulants, en étudiant s'ils ont un effet anti-inflammatoire et/ou protecteur de l'endothélium. L'expérimentation animale est indispensable pour étudier les lésions d'ischémie-reperfusion myocardique, du fait de l'importance de la circulation sanguine dans les différents mécanismes impliqués. Tous les animaux bénéficieront d'une analgésie et d'une anesthésie au cours des procédures chirurgicales, ainsi que d'une analgésie dans les suites opératoires. Cette étude sera réalisée chez le rat qui est un modèle de choix pour l'infarctus du myocarde aigu. Ce modèle est validé et est parfaitement maîtrisé au laboratoire. 249 rats au total seront utilisés pour ce projet. Conformément à la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés a été minutieusement établi de sorte qu'il y ait une utilisation optimale des animaux (Réduire). Seules les expériences indispensables seront réalisées et il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience. La souffrance de l'animal sera réduite au maximum ou supprimée par l'utilisation d'anesthésique (pentobarbital sodique 80mg/Kg) et d'analgésique (buprénorphine 0.1mg/Kg) aux doses appropriées (Raffiner). De plus, il n'existe pas de méthode alternative, ni de modélisation possible de l'infarctus du myocarde aigu (Remplacer).

4138. Le processus spontané et naturel de réparation du tissu osseux est pris en défaut lors d'un traumatisme trop étendu, d'une non-consolidation, d'une résection osseuse de grande taille. Dans ces situations, l'autogreffe osseuse est le traitement de référence mais présente des inconvénients de morbidité et de quantité disponible. L'utilisation de matériaux substituts osseux est l'alternative usuelle pour la chirurgie orthopédique et maxillo-faciale; néanmoins, ces matériaux sont dépourvus de propriété biologique ostéo-inductrice limitant leur efficacité à la réparation de défaut de petite taille. Une approche en médecine régénérative osseuse consiste à rendre ces matériaux implantables biologiquement actifs, en leur associant des molécules ostéo-inductrices, telle que la Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2). La BMP2 est utilisée en clinique dans certaines pathologies mais se heurte à des effets secondaires importants en raison des fortes doses utilisées. Il est nécessaire d'évaluer de nouveaux matériaux supports démontrant une meilleure rétention, permettant de diminuer les doses de BMP2 implantée.

Le projet propose de :

-Evaluer le potentiel ostéogène de deux matrices couplées à de la BMP2 ou d'un peptide mimétique de la BMP-2 in vivo. La première matrice est une céramique synthétique à base d'hydroxyapatite sur laquelle sera greffée la BMP2 ou un peptide mimétique. La seconde est à base de matrice extracellulaire décellularisée et chargée de BMP-2.

-Valider une méthode de quantification par imagerie en fluorescence de la BMP2 présente sur le site d'implantation et de suivre sa libération/dégradation in vivo

L'ensemble du projet nécessite l'utilisation de 105 souris Nude sur une durée de 5 ans.

3R : Afin de diminuer le nombre d'animaux, 2 ou 4 implants seront implantés en sous-cutané par animal. Par ailleurs, des techniques d'imagerie non-invasive seront utilisées pour

-suivre la fluorescence et donc la quantité de BMP2 sur le site d'implantation

-suivre la formation osseuse par micro-scanner.

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

Les résultats obtenus permettront de

-démontrer l'intérêt de greffage de molécules ostéo-inductrices sur une matrice versus son adsorption pour la régénération osseuse

-évaluer l'intérêt d'une matrice extracellulaire naturelle comme plateforme de libération de facteurs de croissance, en particulier la BMP2

-démontrer la faisabilité du suivi de la BMP2 sur le site d'implantation de façon non-invasive par fluorescence.

4139. Ce document présente les différents travaux pratiques effectués sur les animaux par des étudiants engagés depuis au moins 1 an dans une filière scientifique à dominante physiologique. Ces travaux pratiques de licence SVT (Sciences de la Vie et de la Terre) sont répartis dans 3 unités d'enseignement (UE) :

- l'UE "Respiration-circulation"

- l'UE "digestion-excrétion"

- l'UE "Communication et signalisation cellulaire"

- Les 2 premières UE enseignées en 3ème année de licence doivent permettre à des étudiants avertis, formés à la théorie, d'étudier in vivo les grandes fonctions physiologiques que sont la Digestion, l'Excrétion, la Respiration et la Circulation.

Dans chacun de ces modules, les étudiants vont se familiariser à manipuler le rat anesthésié, à respecter son bien-être (surveiller l'analgésie et l'anesthésie de l'animal confié) et aussi à maîtriser les techniques de dissection et de cathétérisation. Cet apprentissage est nécessaire aux étudiants pour aborder les expérimentations suivantes et pour leur donner le souci du raffinement (diminuer le stress et la douleur des animaux). Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum (1 seul rat pour 2 étudiants et par séance).

- L'unité d'enseignement "Communication et signalisation cellulaire" permet aux étudiants de 2ème année de licence d'enregistrer in vivo les activités électriques nerveuses et musculaires dans différentes conditions expérimentales. L'expérimentation se fait sur le nerf sciatique et le muscle gastrocnémien de la grenouille. Là encore, le nombre d'animaux est réduit au minimum (1 grenouille pour 4 étudiants et par séance, c'est-à-dire un membre postérieur par binôme).

Le nombre total d'animaux requis pour 5 ans est de 630 rats et 480 grenouilles. Les animaux sont hébergés dans les conditions réglementaires et leur bien-être est une priorité (acclimatation, enrichissement, surveillance quotidienne, change régulier, nourriture et boisson à volonté...).

Pour les enseignements pratiques de la physiologie, des séances de travaux pratiques se font en simulation dans le but de réduire les animaux utilisés à des fins expérimentales, mais rien ne peut remplacer l'expérimentation animale qui est incontournable dans de nombreux domaines de la recherche biologique, tels que l'étude des grandes fonctions physiologiques.

4140. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant de lutter contre les allergies alimentaires mais également de détecter des formulations potentiellement allergisantes.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et est mis en œuvre à grande échelle au sein des laboratoires. Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substances pharmacologiques sur l'allergie alimentaire de façon à prédire leur efficacité clinique. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque test a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre de rongeurs qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 2000. Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

4141. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont la 2ème cause de mortalité dans le monde, et l'une des causes majeures de handicap acquis. Environ 80% des AVC sont dits ischémiques, c'est-à-dire induits par une interruption de la perfusion sanguine cérébrale. La majorité des AVC ischémiques est liée à l'occlusion d'une artère cérébrale par un caillot (thrombus) transporté par la circulation sanguine jusqu'aux artères cérébrales (embolie cérébrale). La reperfusion du tissu cérébral peut être réalisée pharmacologiquement à l'aide d'un traitement thrombolytique. A l'heure actuelle, le rt-PA (Alteplase) est le seul médicament thrombolytique ayant reçu une autorisation de mise sur le marché dans l'indication de la phase aigüe de l'AVC ischémique thrombo-embolique. Ce traitement possède de nombreuses limitations : fenêtre thérapeutique courte, neurotoxicité, risque de transformation hémorragique. De plus, son efficacité est limitée : chez environ 50 % des patients, l'administration du traitement ne permet pas la recanalisation des artères embolisées.

Des études précédentes ont montré qu'un nouveau traitement renforce les effets du rt-PA dans un modèle de thrombo-embolie cérébrale résistant au rt-PA seul chez le rat. L'objectif du présent projet est d'étudier la relation dose-effet de ce nouveau traitement pour préparer les études cliniques à venir.

Ce travail se situe dans le cadre plus général de la recherche de nouvelles thérapeutiques dans le traitement pharmacologique de l'AVC thrombo-embolique. Les données générées seront précieuses et nécessaires pour établir les schémas d'administration qui seront utilisés chez l'homme. Le principal risque sur le plan éthique est que le développement des produits évalués n'aboutisse pas.

L'évaluation des propriétés thrombolytiques d'une molécule in silico ou in vitro ne permet pas de prédire l'efficacité du traitement dans le cadre d'une intervention visant à limiter la taille des lésions cérébrales au cours d'un AVC thromboembolique chez l'Homme. Le nombre et la complexité des mécanismes mis en jeu au cours de l'ischémie-reperfusion du tissu cérébral chez l'Homme ne sont actuellement pas modélisables par des méthodes alternatives, alors qu'ils sont présents de façon similaire chez le rat (remplacement).

Au total, 116 rats mâles Wistar seront utilisés pour ce projet. Sur la base de notre expérience du modèle, le nombre de rat utilisé pour cette étude sera réduit au minimum (réduction) garantissant une interprétation statistique et scientifique des résultats.

Chaque rat sera soumis à 6 procédures : tout d'abord à un prélèvement de sang de 0,4 ml à une des veines de la queue pour préparer des caillots ou thrombi (P1), à l'induction d'une anesthésie par voie gazeuse (P2) pour la mise en place d'une pompe programmable et d'un cathéter placé au niveau de la veine jugulaire pour délivrer les traitements longs sur 6 heures (P3), l'induction de l'AVC par injection de thrombi de taille calibrée au niveau de l'artère carotide en direction du cerveau (P4), et la mise en place de 2 accès au niveau des 2 veines de la queue pour les traitements initiaux courts (P5). Ces traitements initiaux courts seront effectués sur animaux vigiles (P5) par injection d'une partie initiale du traitement (bolus) puis du restant du traitement par perfusion pendant 1 heure. Les traitements longs prendront le relais 3 heures après induction de l'AVC par la mise

en route des pompes programmées pour assurer les traitements pendant 6 heures. Des tests neurologiques sensorimoteurs seront effectués 24 et 48 heures après induction de l'AVC en plaçant les animaux un par un dans un dispositif expérimental (open-field) pendant 10 minutes environ, dans une pièce attenante à l'animalerie, afin d'évaluer les déficits neurologiques.

Les animaux sont observés toutes les 15 minutes pendant les 48 heures suivant l'induction de l'AVC. Tout animal présentant une crise de convulsion supérieure à 5 minutes ou une incapacité à se déplacer avec une perte complète des réflexes posturaux à 24 heures sera mis à mort en conformité avec les recommandations éthiques.

Les animaux sont placés à 2 ou 3 par cage à leur arrivée puis en cage individuelle à partir de l'induction de l'AVC jusqu'à leur mise à mort afin de faciliter leur récupération de la chirurgie, de leur administrer les traitements et de les surveiller (raffinement).

4142. A ce jour seulement 1 à 2 médicaments sur 10000 entrent en phase clinique et seront mis sur le marché. Actuellement, l'accent est donc mis sur l'identification et la validation de biomarqueurs qui présentent des intérêts majeurs pour la Recherche et le Développement de molécules thérapeutiques, dans la mise au point de médicaments innovants et dans le développement des médecines personnalisées. Un biomarqueur est une substance trouvée dans le sang, les fluides ou les tissus et qui fournit une mesure de l'état biologique normal, pathologique ou d'une réponse à un médicament ou une autre substance étrangère.

L'objectif de notre projet est donc d'identifier et/ou de valider des biomarqueurs précoces de toxicité tissulaire ou d'organe à l'aide de modèles animaux mimant le processus complet le plus proche de l'Homme (la toxicité étant induite par une molécule chimique ou biologique connue pour ses effets toxiques spécifiques). A travers une approche expérimentale basée sur la recherche de biomarqueurs circulants accessibles de manière peu ou non invasive (sang, salive, urine, fèces etc..), le potentiel de toxicité de molécules sera évalué de manière précoce à des fins de prédiction, diagnostic ou de pronostic.

Un biomarqueur étant spécifique de certains types d'atteintes (fonction ou tissu), il nécessite de ce fait de co-signer (valider) la lésion dans un certain nombre d'espèces animales utilisées en expérimentation ainsi que chez l'Homme. Il doit donc pouvoir être utilisé pour faire le lien entre les études non cliniques et cliniques (biomarqueur dit « translationnel »).

C'est pourquoi notre projet englobe des espèces rongeurs et non-rongeurs, espèces obligatoires pour la soumission aux autorités réglementaires. Il couvre l'utilisation d'au maximum 2160 animaux dont 72 primates non-humains, 72 chiens, 1152 rats et 864 souris (incluant les souris génétiquement modifiées) sur une période de 3 ans.

L'identification et/ou la validation de nouveaux biomarqueurs comme indicateurs de toxicité précoce permettra en première intention de sélectionner les candidats médicaments les plus prometteurs et/ou d'arrêter plus précocement le développement de molécules ayant un profil toxicologique non acceptable au regard de l'indication thérapeutique proposée. A plus long terme, les biomarqueurs les plus pertinents pourront être utilisés comme outils futurs d'adaptation des essais cliniques par exemple : règles d'arrêt de diagnostic/pronostic chez l'Homme.

Les études expérimentales de ce projet sont réalisées par du personnel formé et compétent. Le nombre d'animaux par groupe et le nombre de groupes sont basés sur les lignes directrices internationales telles que celles d'ICH (« International Conference on Harmonisation ») qui sont appliquées pour les études de toxicologie générale et également sur des bases scientifiques afin d'obtenir un effectif suffisant permettant l'interprétation des effets rares et significatifs. De plus, le contenu de ces études intègre les impératifs éthiques tels que les modalités d'administration et de prélèvement, l'hébergement et l'enrichissement du milieu spécifique pour chaque espèce étudiée mais aussi la prévention de toute douleur, détresse ou inconfort chez l'animal. Enfin, la réutilisation d'animaux (réformés, issus d'autres projets, pour la formation et le maintien des compétences...) ou le placement dans certains cas, s'effectue dans le cadre de nos procédures internes et après approbation vétérinaire contribuant ainsi à l'application de la règle des 3R : raffinement, réduction, remplacement.

4143. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant d'atténuer les déficiences des fonctions cognitives (mémoire, attention, planification, raisonnement..) apparaissant souvent avec le vieillissement cérébral, dans un certain nombre de troubles neuropsychiatriques comme la schizophrénie, la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, ou les troubles d'hyperactivité et de déficit attentionnel.

Ces tests peuvent également permettre d'établir le profil de sécurité au niveau des fonctions cognitives de nouvelles substances médicamenteuses avant leur passage chez l'homme, et ce dans le cadre des recommandations européennes, américaines ou japonaises en vue de l'obtention des autorisations de mise sur le marché.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et est mis en oeuvre à grande échelle au sein des laboratoires de psychopharmacologie. Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substances pharmacologiques sur le comportement animal de façon à prédire leur efficacité clinique. Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre de rongeurs qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 25600. Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

4144. Notre projet porte sur les fonctions d'une superfamille de neuropeptides (Somatostatine et Urotensine II) chez les vertèbres. Les neuropeptides sont de petites protéines, secrétées par certains neurones ainsi que par d'autres types cellulaires, qui agissent comme des signaux envoyés vers d'autres cellules. Ces peptides sont retrouvés chez l'adulte où ils sont impliqués dans différentes fonctions physiologiques notamment, la régulation de la production de l'hormone de croissance et l'osmorégulation, mais chez l'embryon leurs rôles restent largement inconnus. Pourtant, notre équipe, avec d'autres, a montré que ces gènes sont exprimés, c'est-à-dire actifs, dès les stades embryonnaires suggérant qu'ils exercent des fonctions très tôt au cours du développement. L'ambition de notre projet est de comprendre ces fonctions.

Pour ce projet, nous utilisons le modèle poisson zèbre (*Danio rerio*). Cet animal est un formidable modèle pour l'étude du développement chez les vertèbres car il présente une somme d'avantages unique : En particulier, l'embryon est transparent et se développe à l'extérieur de la mère et il est possible de créer des animaux génétiquement modifiés par des techniques avancées d'ingénierie du génome. Ces avantages et la conservation des mécanismes qui contrôlent le développement embryonnaire des vertèbres, permettent au poisson-zèbre de remplacer avantageusement les modèles mammifères tels que la souris ou le rat.

Notre projet vise à comprendre le rôle de ces neuropeptides au cours du développement embryonnaire. L'expression de sept gènes de cette superfamille de neuropeptides, au cours du développement embryonnaire du poisson-zèbre, suggère qu'ils pourraient être impliqués dans la mise en place du système nerveux, en particulier dans la formation et/ou le fonctionnement de neurones impliqués dans la locomotion. Notre projet vise à tester cette hypothèse. En particulier, nous souhaitons tester si l'absence, ou au contraire la suractivation, de ces gènes au cours du développement embryonnaire entraîne un défaut dans la formation et/ou le fonctionnement de neurones impliqués dans la locomotion ainsi que dans le comportement de nage.

Pour ce projet, nous allons produire 30 lignées génétiquement modifiées différentes en utilisant une centaine d'animaux pour chaque lignée (soit 3000 animaux). Pour chaque lignée, des embryons sont micro-injectés avec une solution permettant la transgénèse puis élevés jusqu'à l'âge adulte pour servir de reproducteurs. Les animaux issus de ces lignées ne présenteront pas de phénotype mais, en les croisant entre eux, ils nous permettront d'obtenir des embryons chez qui un gène d'intérêt sera absent ou suractivé et ainsi d'en analyser les conséquences sur le développement embryonnaire du système neuromoteur. Pour ce projet, la grande majorité des analyses portera sur des stades embryonnaires. Nous utiliserons différents types de techniques histologiques pour analyser, chez ces embryons, l'identité des neurones affectés, leurs morphologies, etc... De plus, pour tester si l'absence ou l'activation de ces gènes entraîne des défaut dans le comportement de nage, nous analyserons le comportement de larves de 5 à 8 jours en les filmant pour mesurer leur vitesse de nage, le temps passé à nager etc... Pour cette étude, 7350 larves seront utilisées. Ainsi, finalement, nous allons utiliser un maximum de 10 350 animaux pour ce projet sur 5 ans.

4145. Le virus Ebola provoque une maladie aiguë et grave, souvent mortelle. La maladie à virus Ebola est apparue pour la première fois en 1976, lors de deux flambées simultanées à Nzara (Soudan) et à Yambuku (République démocratique du Congo). Yambuku étant situé près de la rivière Ebola, celle-ci a donné son nom à la maladie.

Les flambées de fièvre hémorragique provoquées par le virus Ebola surviennent principalement en Afrique avec un taux de mortalité variant de 25% à 90% selon le type de virus et les conditions de prise en charge. La précocité et la qualité de cette prise en charge jouent un rôle important pour diminuer la mortalité associée à la maladie

La flambée qui sévit actuellement en Afrique de l'Ouest (dont les premiers cas ont été notifiés en mars 2014) est la plus importante et la plus complexe depuis la découverte du virus en 1976. Elle a produit plus de cas et de décès que toutes les précédentes flambées réunies. Cette flambée a également comme particularité de s'être propagée d'un pays à l'autre, partant de la Guinée pour toucher la Sierra Leone et le Libéria (en traversant les frontières terrestres), le Nigéria (par l'intermédiaire d'un seul voyageur aérien) et le Sénégal (par l'intermédiaire d'un voyageur arrivé par voie terrestre). D'après de récentes données, l'épidémie a provoqué plus de 28000 cas dont 11000 décès.

Les pays les plus touchés (la Guinée, la Sierra Leone et le Libéria) ont des systèmes de santé très fragiles. Le 8 août 2014, il a été déclaré que cette flambée constituait une urgence de santé publique de portée internationale.

Le virus Ebola appartient à la famille des Filovirus. Cinq souches ont été identifiées : Zaïre, Bundibugyo, Soudan, Reston et Côte d'Ivoire. Le virus à l'origine de la flambée 2014 en Afrique de l'Ouest appartient à la souche Zaïre (appelée également souche Gabon) et a été isolé sous le nom de Ebola Makona.

Le but de ce projet est d'étudier l'efficacité d'un traitement antiviral en pré et post-exposition dans un contexte de challenge avec le virus Ebola chez le macaque cynomolgus. En effet, cet antiviral a déjà été testé et les résultats encouragent à augmenter la dose de traitement. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, le traitement sera utilisé en pré-exposition conformément à la procédure déjà réalisée mais également en post-exposition, situation la plus représentative des cas d'infection réels.

Ce projet nécessite l'utilisation de 15 macaques cynomolgus.

Conformité avec les 3R :

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats interprétables. Les expérimentations en cours reposent sur des séries de 15 singes (maximum permis par l'infrastructure du laboratoire NSB4). Elles incluent de manière habituelle des groupes de 5 singes. Cette distribution est justifiée dans l'état actuel de nos connaissances et de notre expérience notamment par le fait que les groupes de 5 singes permettent d'évaluer la variabilité inter-individuelle (souvent importante chez le PNH) et d'obtenir, pour la comparaison inter-groupes, des puissances statistiques adaptées aux besoins des études menées.

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

Afin de raffiner l'expérimentation, une attention particulière sera portée sur l'enrichissement alimentaire, l'enrichissement de confort et sur l'enrichissement de stimulation (altères, anneaux, sachets surprises). Le bien-être animal sera suivi à l'aide d'un scoring qui reprend les observations du comportement, de la prise alimentaire et hydrique, des symptômes hémorragiques. Les

animaux seront visités quotidiennement et observés par un personnel avisé et qualifié. Le temps de travail en animalerie A4 étant réglementée, la vidéosurveillance permet également de revoir le comportement des animaux pendant les périodes où ils ne sont pas stimulés par la présence des techniciens.

4146. Une des avancées récentes majeures dans la compréhension des mécanismes qui régulent l'expression des gènes eucaryotes est la mise en évidence de modifications de la structure de la fibre de chromatine, modulant son niveau de compaction, par des enzymes spécialisés qui rendent les régions promotrices plus ou moins accessibles aux facteurs de transcription. Ce phénomène permet à la fois, la mise en place d'un programme génétique spécialisé au cours du développement, mais également la réponse dynamique de la cellule aux conditions de son environnement (réponse aux stress). L'altération de ces capacités est impliquée dans un grand nombre de pathologies, tumorales ou non.

L'objet du présent projet est de déterminer le rôle d'enzymes de modification de la chromatine, et plus particulièrement du complexe Tip60/p400/H2A.Z, dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal adulte. En effet, ce tissu, qui connaît un renouvellement rapide et continu, est soumis à un contrôle strict des patrons d'expression génique qui permet de définir des compartiments prolifératif et différencié qui assurent la fonction de cet organe vital. Or, de nombreuses évidences tendent à impliquer ce complexe de modification de la chromatine dans le maintien de l'homéostasie épithéliale.

Cette étude sera donc basée sur l'établissement de modèles murins dans lesquels il sera possible d'induire l'invalidation de Tip60, p400 ou H2A.Z de manière spatialement et temporellement contrôlée. Nous établirons ces modèles par croisements de modèles génétiquement modifiés existants. Il sera ainsi possible d'induire le déficit d'une de ces protéines chez l'animal adulte (afin de s'affranchir de la létalité observée chez les animaux KO constitutif) et de suivre précisément l'effet de cette déplétion sur la physiologie et la fonction de l'épithélium intestinal.

Parallèlement à cela, nous étudierons l'impact du complexe sur la sensibilité aux carcinogènes inducteurs de la tumorigénèse colorectale, ainsi que sur la réponse agents thérapeutiques génotoxiques.

L'ensemble du projet devrait nécessiter environ 400 souris. A chaque étape, le nombre d'animaux sera limité au strict minimum, en utilisant des échantillons d'animaux les plus réduits possibles mais suffisants pour assurer une représentation statistique valable. De plus, un maximum de prélèvements (plusieurs tissus, échantillons pour extraction d'ADN, d'ARN, de protéines, ...) sera effectué sur chaque souris sacrifiée afin de permettre une exploitation expérimentale très approfondie.

Par ailleurs, les animaux de génotypes autres que les génotypes d'intérêt seront euthanasiés immédiatement après génotypage.

4147. Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle clef dans le contrôle de l'immunité. Un frein majeur à leur utilisation clinique est le manque de connaissance sur les DC naturellement présentes dans les tissus humains.

Chez l'homme comme chez la souris, les DC XCR1 et les DC plasmacytoïdes (pDC) présentent des fonctions complémentaires et sont cruciales pour l'immunité contre les virus, les bactéries intracellulaires et les cancers.

Nous voulons caractériser les mécanismes moléculaires contrôlant les fonctions des DC XCR1 et des pDC in vivo chez la souris et in vitro chez l'homme. Aussi notre projet s'articulera autour de 3 grands axes :

- 1) Analyser l'impact de l'élimination des pDC ou des DC XCR1 sur la constitution d'une réponse immunitaire lors d'infections par des pathogènes ;
- 2) Réaliser des études fonctionnelles de ces 2 types cellulaires en analysant des souris mutées dans l'expression d'un gène spécifique ;
- 3) Caractériser la dynamique des interactions entre pDC, DC XCR1 et d'autres cellules de l'immunité in vivo par microscopie.

Ce projet, de grande envergure, nécessite la mesure de différents paramètres de la réponse immunitaire au cours d'infections. Ainsi l'intégration d'un système vivant et complet est indispensable. La physiopathologie de la souris est suffisamment proche de celle de l'homme pour que son étude nous permette d'accroître nos connaissances sur le fonctionnement du système immunitaire chez l'homme. Par ailleurs, la taille, la rapidité du cycle de reproduction et la génétique de la souris en font le modèle le mieux approprié pour les études envisagées pour lesquelles des animaux génétiquement modifiés sont nécessaires. Ainsi le modèle murin est un modèle de choix pour notre étude.

Nous utiliserons 4637 souris pour mener à bien cette étude : 83 souris seront utilisées pour la production de virus et de bactéries, 3940 souris seront utilisées pour analyser les réponses immunitaires antivirales et antibactériennes, 566 souris pour effectuer des courbes de mortalité et 48 souris pour faire de l'imagerie in vivo et étudier la dynamique des réponses immunitaires.

Tous ces animaux seront sous fond génétique homogène C57BL/6J pour nous permettre de réduire le nombre d'animaux utilisés en évitant au maximum les variabilités interindividuelles des animaux sous fonds génétiques mixtes. Ainsi, chaque expérience devrait pouvoir être répétée indépendamment deux fois, avec 4 animaux par groupe, minimum requis pour s'assurer de la bonne reproductibilité des résultats.

Les souris seront élevées dans des animaleries conventionnelles et de niveau 3 exemptes d'organisme pathogène spécifique (EOPS). La température, l'hygrométrie et la photopériode sont contrôlées et régulées. Un animal bénéficiera d'au moins 100 cm² de surface. Les animaux seront gardés tant que possible en groupes sociaux stables formés d'individus compatibles. Ils disposeront de matériel pour confectionner des nids et des dômes protecteurs, notamment pour les animaux placés en hauteur car trop exposés à la lumière. Pour les animaux affaiblis, l'accès à la nourriture et à l'eau sera favorisé.

4148. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant de lutter contre les atteintes hépatiques.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et est mis en oeuvre à grande échelle au sein des laboratoires de pharmacologie générale. Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substances pharmacologiques sur l'atteinte hépatique induite par des agents hépatotoxiques (aigüe ou à long-terme). L'effet propre des substances testées sur le système hépatique pourrait également être évalué.

Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests.

Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre de rongeurs qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 12000. Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

4149. Ce projet a pour objectif de produire des souris génétiquement modifiées à phénotype dommageable léger à modéré pour les différentes équipes de recherche travaillant notamment sur certaines maladies neurodégénératives, inflammatoires et/ou cardiovasculaires. Ce projet concerne la production ainsi que la caractérisation biologique et comportementale (phénotype) des animaux génétiquement modifiés. Une fois produites et caractérisées selon les attentes des chercheurs, les différentes lignées sont maintenues dans la zone d'élevage afin de fournir des lots d'animaux aux équipes de recherche.

Ce projet ne débute que si les fonctions physiologiques à investiguer nécessitent le recours à l'animal et lorsque les étapes cellulaires ont confirmé l'intérêt de la cible et la nécessité d'une lignée dédiée au projet.

La lignée créée permet d'évaluer l'impact de la modification du gène d'intérêt sur un premier modèle vivant. Les souris sont accouplées en duos ou trios, les portées génotypées et les animaux sont sevrés puis transférés aux laboratoires destinataires des différents projets de recherche autorisés.

Les modifications génétiques peuvent induire des effets biologiques ou comportementaux, qui sont évaluées en particulier par observations cliniques ou dosages sanguins (étape de Phénotypage). Tout déficit observé à cette étape sera compensé par l'adaptation du milieu environnemental (alimentation, enrichissement...). Le nombre d'animaux utilisés est limité au strict minimum, par ajustement et optimisation des plans de reproduction aux commandes des unités de recherche et permet de garantir qu'un minimum d'animaux sera produit, contribuant ainsi aux objectifs de réduction du recours à l'animal (principe des 3R). Ce projet couvre donc un nombre maximal de 161 520 animaux sur 3 ans. Les procédures expérimentales précisent les catégories d'utilisation : reproducteurs, animaux génétiquement modifiés avec le phénotype attendu le cas échéant.

Les animaux disposent d'enrichissement physique dans les cages (matériel de nidification, tunnels ou dômes) pour faciliter l'expression des comportements naturels de l'espèce. Des contrôles sanitaires sont régulièrement effectués et l'observation quotidienne des animaux permet de s'assurer du bien-être de l'animal. Une équipe de techniciens formés et compétents est en charge de l'élevage de souris génétiquement modifiées et du génotypage/phénotypage et prend en compte les recommandations internes portant sur l'éthique, la manipulation, les soins, l'hébergement...).

4150. Ce projet s'inscrit dans un ensemble de travaux visant à comprendre le rôle de la chromatine dans l'établissement et le maintien des rythmes circadiens. Les horloges circadiennes sont des oscillateurs omniprésents permettant aux animaux d'adapter et de coordonner leur physiologie intrinsèque aux changements environnementaux. L'implication de dysfonctionnements de l'horloge circadienne dans certaines maladies ou syndromes comme les troubles du sommeil, la dépression, l'obésité ou la susceptibilité à certains cancers a également été démontrée. Dans la plupart des tissus mammifères, les horloges contrôlent de façon spatiotemporelle des événements transcriptionnels tout en préservant la plasticité du génome. En plus des facteurs de transcription de l'horloge, de nombreuses protéines de remodelage de la chromatine et des phénomènes épigénétiques ont récemment été impliquées dans l'expression rythmique des gènes et le fonctionnement de l'horloge. Dans des études préliminaires, il est montré que des facteurs épigénétiques essentiels tels les variants d'histones régulent l'horloge dans les tissus périphériques murins. L'objectif de cette demande est de caractériser le rôle des protéines H2AZ1 ET 2 dans une horloge périphérique, le foie, chez des souris KO conditionnelles cre inductibles. Cette étude contribuera à progresser dans la compréhension du rôle exercé par les mécanismes épigénétiques sur le contrôle des horloges périphériques. Comme la complexité de l'environnement tissulaire et le réseau complexe des mécanismes impliqués ne peuvent pas être reproduits in vitro, cette étude nécessite la réalisation d'expériences dans un environnement intégral, à l'échelle de l'animal. En parallèle, des études in vitro sont réalisées pour aborder les interactions et les voies de signalisation moléculaires impliquées. Pour les études in vivo, nous travaillons avec le modèle souris car actuellement c'est la seule espèce chez laquelle il existe des modèles de variants d'histones, lesquels sont identiques entre l'homme et la souris et des modèles rapporteurs du rythme circadien. Conformément aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, les animaux seront utilisés à minima, sans compromettre les objectifs du projet et tout en permettant une exploitation statistique des résultats. Les conditions d'hébergement et de soins utilisées et des points limites adaptés associés à des procédures de surveillance des animaux seront appliquées dans le respect du bien-être animal, ceci afin de limiter au maximum la souffrance subie par l'animal. Ce projet concernera au maximum 210 souris.

4151. La santé cérébrale, capacités cognitives incluses, a 2 composantes majeures : la neuroplasticité (aptitude du cerveau à remodeler ses circuits neuronaux) et le débit sanguin cérébral (DSC). Il est unanimement reconnu que le BDNF (brain-derived

neurotrophic factor) synthétisé et sécrété par les neurones du système nerveux central est un acteur clé dans l'induction et le maintien de la neuroplasticité mais des données récentes in vitro ont montré que l'exposition des vaisseaux périphériques au BDNF induisait une vasodilatation. Par ailleurs, nous avons découvert que les vaisseaux contenaient autant de BDNF que le cerveau. Cependant, tout reste à découvrir sur le BDNF d'origine vasculaire. Dans ce contexte, l'objectif du projet est 1) de comprendre les mécanismes qui contrôlent la synthèse du BDNF par les vaisseaux de la circulation cérébrale, 2) d'explorer la contribution du BDNF synthétisé et sécrété par ces vaisseaux dans la préservation et l'amélioration de la santé cérébrale, 3) d'évaluer dans quelle mesure les taux circulants de BDNF sont dépendants des taux présents dans les vaisseaux. Nous formulons les hypothèses selon lesquelles :

- 1) la synthèse du BDNF par l'endothélium des vaisseaux de la circulation cérébrale est sous le contrôle des contraintes de cisaillement (force de friction exercé sur l'endothélium vasculaire par le sang)
- 2) le BDNF d'origine vasculaire contribue aux processus neuroplastiques et induit une augmentation du DSC
- 3) l'interprétation des taux circulants de BDNF doit prendre en considération que le BDNF est également synthétisé et sécrété dans le sang par les vaisseaux.

La conduite de ce projet nécessite la réalisation d'expériences sur des modèles animaux. En effet, il est impossible de reproduire les interactions cellules endothéliales/neurones provoquées par le flux sanguin sur des modèles in silico ou de culture de cellules. Le projet qui est réalisé dans le respect de la règle des 3R s'appliquant aux expériences sur les animaux est en continuité avec les travaux antérieurs du laboratoire. Toutes les procédures proposées dans le projet sont parfaitement maîtrisées par le personnel statutaire du laboratoire, ce qui permet de limiter le nombre d'animaux nécessaire à l'obtention de résultats fiables ainsi que leur souffrance potentielle qu'elles soient physiques ou psychologiques. Dans le cas où l'animal subit successivement 2 procédures, la seconde consiste en une anesthésie suivie de la mise à mort de l'animal. Le projet prévoit - pour une période de 5 ans - 1650 rats (nombre maximal). Ce nombre inclut les animaux dédiés à la réalisation du projet (1530 rats) et les animaux destinés à la formation initiale et continue des chercheurs (120 rats).

4152. Le taux de fer dans le sang chez l'homme est régulé par une hormone, l'hepcidine, synthétisée par le foie. Plus l'expression de l'hepcidine est basse plus il y a de fer dans le sang et inversement. Chez les patients atteints d'hémochromatose d'origine génétique (mutations dans les gènes HFE ou TFR2 ou HJV) le taux d'hepcidine est anormalement bas, car elle ne peut plus être régulée en fonction du taux de fer dans le sang. Cela entraîne un excès de fer sanguin qui va se stocker dans le foie, le cœur et le pancréas et les os. De graves complications peuvent survenir.

Il est toutefois observé pour ces patients hémochromatosiques une grande variabilité du niveau de surcharge en fer et de développement des complications. Les raisons de cette variabilité entre individus ne sont pas parfaitement comprises. Par ailleurs, des liens ont récemment été montrés entre le métabolisme du fer et celui d'autres métaux.

Notre objectif est de déterminer si des anomalies du métabolisme d'autres métaux au cours de l'hémochromatose génétique peuvent survenir car elles pourraient participer à la variabilité d'expression des complications.

Nous analyserons l'impact d'un excès de fer et des niveaux d'hepcidine sur le métabolisme des autres métaux. Le dosage du fer et des autres métaux seront réalisés sur le sang et dans les tissus, et mis en parallèle avec les niveaux d'hepcidine. Ces paramètres seront caractérisés, en comparaison avec des souris normales, i) chez des souris hémochromatosiques -du fait d'une absence d'expression du gène Hfe- qui développent une surcharge fer liée à un niveau anormalement bas d'hepcidine et ii) sur des souris surchargées par du fer exogène, qui réagissent normalement au stock en fer, auront une hepcidine élevée.

Ce protocole est prévu pour répondre à la règle des 3R.

- Réduire le nombre de souris à un nombre minimal, permettant des études statistiques fiables, 14 souris mâles par groupe. L'étude sur les souris hémochromatosiques et leurs contrôles sera réalisée à 6 mois et 12 mois d'âge (84 souris). L'étude sur les souris surchargées par injection de fer sera réalisée à 6mois (42 souris). Le nombre total d'animaux est de 126.

- Raffinement, le protocole ne devrait pas entraîner de douleur significative. Des points limites sont toutefois définis et seront observés en cas d'évènement inattendu. Les animaux seront anesthésiés avant le prélèvement.

- Remplace : l'impact d'un excès de fer et d'une modulation des niveaux d'hepcidine sur les autres métaux dans les différents organes ne peut se réaliser que sur l'animal entier, compte tenu des mécanismes de contrôles généraux entre organes qui sont mis en jeu.

Cette étude permettra de préciser l'impact d'un excès de fer sur les autres métaux dans un modèle où l'hepcidine peut se réguler en fonction du taux de fer dans le sang, comparativement à un modèle où l'hepcidine chez les souris hémochromatosiques ne peut plus corriger le taux de fer sanguin. Les résultats obtenus permettront de mieux comprendre les pathologies du métabolisme du fer et d'identifier des métaux pouvant représenter des marqueurs diagnostiques ou des cibles thérapeutiques.

4153. La sclérodémie systémique (SSc, systemic sclerosis) fait partie des maladies fibrosantes chroniques dont l'origine n'est pas connue. Son atteinte dermatologique lui a donné son nom skleros (dur) et derma (derme). Classiquement, la fibrose est considérée comme irréversible, raison pour laquelle il faut détecter et traiter au plus tôt.

On compte au nombre de 700 000 le nombre de malades aux Etats-Unis et entre 5000 à 7000 en France. Elle peut atteindre toutes les tranches d'âge y compris l'enfant, dans toutes les populations sans distinction de race ni prédisposition génétique particulière.

Une production excessive de collagène qui provoque un épaississement de la peau, qui évolue vers une fibrose des petits vaisseaux et aboutit à une ischémie (privation d'oxygénation) de ceux-ci.

La maladie touche ensuite les poumons, le cœur, les reins ou encore le tractus gastro-intestinal, le pronostic vital est alors en jeu, car il n'existe aucun traitement à ce jour. La sclérodermie conduit à une mortalité de 30 % des malades à l'issue de 5 ans d'évolution de la maladie

Elle présente plusieurs spécificités dont une importante composante auto-immune.

Ces dernières années une reclassification des symptômes de la SSc a permis d'entreprendre la démarche qui ouvre la voie à des traitements précoces. La SSc est une maladie multifactorielle qui implique des facteurs environnementaux et génétique. La pathologie associe des désordres vasculaires (microangiopathie), inflammatoires et immunologiques (auto-immunité) et des signaux profibrosants ; elle présente donc différents angles pour tenter de l'endiguer.

Nous envisageons dans notre projet d'aborder la lutte contre la pathologie, en intervenant sur l'immuno-modulation via une voie pharmacologique. Notre objectif est d'atténuer le phénomène inflammatoire en agissant sur le système immunitaire et ses effecteurs.

Le fait que la maladie soit liée à un désordre à la fois auto-immun, vasculaire et fibrotique, aucun modèle ne reproduit fidèlement la maladie humaine, il y a cependant certains modèles animaux qui s'en approchent par leurs caractéristiques et qui offrent la possibilité d'évaluer l'efficacité de molécules dans le cadre du développement d'un traitement de la pathologie.

Un des facteurs déclenchant serait la production excessive de formes réactives à l'oxygène (FRO) qui sont toxiques. Elle se produirait lors des phénomènes d'ischémie-reperfusion : privation puis re-oxygénation des tissus provoqués par les microangiopathies. Le phénomène de Raynaud : « doigt blanc » car privé d'irrigation est observé fréquemment de façon préalable à l'apparition de la sclérodermie.

Cette hypothèse a permis à certaines équipes de développer un modèle souris qui permet d'installer localement sur la peau une forme de sclérodermie par injection d'agent oxydants (hypochlorite de sodium-« eau de javel »). C'est le modèle que nous désirons utiliser au cours de ce projet.

Notre projet est constitué de différentes phases allant de l'implémentation dans notre laboratoire du modèle, jusqu'à l'évaluation de l'activité de molécules innovantes construite sur la base de notre hypothèse.

Le projet est donc constitué des différentes procédures envisagées en fonction de la nature de l'agent qui permet d'induire la pathologie (hypochlorite de sodium), et des caractéristiques de la molécule à évaluer. Les premières procédures seront nécessaires à la prise en main du modèle, pour sa caractérisation et sa validation. Les molécules que nous désirons développer sont issues de la chimie pharmaceutique. Les nouvelles molécules seront administrées de manière topique ou par administration parentale, avec ou sans période de présensibilisation du système immunitaire, de manière préventive ou curative.

Le respect des points limites assez précoces permet le Raffinement des procédures, en permettant d'anticiper la détresse et la douleur de l'animal afin d'interrompre l'expérience, voire même de procéder à des euthanasies éthiques si nécessaire.

L'euthanasie sera réalisée des signes cliniques notoires traduisant une atteinte du bien-être de l'animal sont rencontrés (perte de poids importante) et persistent après les différentes mesures mises en place pour y remédier. On portera une attention particulière à l'utilisation de litière dépoussiérée et à la mise à disposition de coton pour favoriser la nidification

Dans le cadre de la Réduction du nombre d'animaux impliqués, notre projet s'appuie sur une procédure préliminaire de caractérisation permettant une meilleure connaissance du modèle. Le nombre total de souris impliquées dans le projet a été diminué de façon à rester suffisant et statistiquement valable. Les expériences sont répétées une seule fois en cas de doute sur la reproductibilité.

Pour la durée de 5 ans que durera ce projet, il est envisagé d'utiliser 2016 animaux

4154. Les pertes de substance osseuse constituent une problématique médicale qui dans la plupart des cas peut se résoudre par la greffe ou par l'implantation d'un substitut osseux. Les technologies liées à l'ingénierie tissulaire peuvent significativement améliorer le bénéfice de ces approches chirurgicales conventionnelles en fournissant un substitut osseux cellularisé combinant les propriétés de comblement du biomatériau avec les propriétés régénératives des cellules implantées. La plupart des cellules implantées sont des cellules souches. Compte tenu de leurs capacités de prolifération et de différenciation, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont été largement utilisées en thérapie cellulaire et en particulier pour des stratégies de régénération osseuse. Selon certaines conditions de milieu et d'environnement, elles deviennent des cellules spécialisées : ostéoblastes pour générer de l'os, chondrocytes pour générer du cartilage ou adipocytes pour le gras. De nombreuses publications démontrent le bénéfice fonctionnel de l'intégration de plusieurs types cellulaires dans les matrices pour des modèles de reconstruction osseuse. Ainsi les cellules endothéliales (CE), constituant la paroi des vaisseaux, augmentent in vitro et in vivo, la différenciation ostéogénique des CSM. Nous avons choisi de travailler à partir des CSM et CE de rat, qui seront isolées de la moelle osseuse des fémurs.

Nous disposons de plusieurs types de matrices (à base d'alginate de Ca²⁺, phosphocalciques...). Des premiers travaux ont permis de montrer que ces matrices, contenant des CSM et des CE, implantées en site ectopique chez la souris (en sous cutané) entraîne la formation d'une matrice extracellulaire, et dans certaines conditions un tissu minéralisé et des vaisseaux.

Pour tout nouveau biomatériau, il convient d'évaluer la qualité, la compatibilité (toxicité), la résorption, les propriétés fonctionnelles (capacité ostéoconductrice/inductrice) du tissu reconstruit et le comportement à long terme. La qualification de nouveaux substituts osseux est nécessaire pour permettre un transfert vers un développement industriel et leur utilisation en clinique. Nous pourrions ainsi déterminer quels sont ceux qui répondent le mieux aux contraintes biomécaniques et physiologiques nécessaires à une reconstruction osseuse efficiente et au long terme. Les résultats expérimentaux démontrent des propriétés de reconstruction osseuse et de vascularisation des implants différentes non seulement selon les populations cellulaires intégrées dans la matrice mais aussi en fonction du site d'implantation. En effet le potentiel ostéogène peut varier selon le site anatomique.

C'est pourquoi notre objectif est de développer un modèle de perte de substance osseuse au niveau du crâne, modèle orthotopique, pour étudier les effets de produits d'ingénierie tissulaire sur la réparation osseuse en tenant compte des effets du microenvironnement sur les propriétés fonctionnelles des substituts osseux.

Il est important désormais de démontrer que ces matrices cellularisées implantées chez l'animal forment de l'os et permettent de combler rapidement un défaut important. Le choix du modèle animal s'est porté sur le rat qui est un modèle murin suffisamment gros pour qu'un défaut osseux au niveau de la boîte crânienne soit réalisé.

La demande d'autorisation porte sur une durée de 2 ans avec un nombre de rat utilisés de 168. Pour cette étude, nous aurons besoins de 12 rats par lot pour obtenir des tests statistiquement significatifs.

Toutes les démarches réglementaires seront entreprises pour que ces travaux soient réalisés dans de bonnes conditions pour l'animal et pour l'avancée de la recherche. Les rats bénéficieront d'un environnement adapté, d'une prise en charge de la douleur (par buprénorphine), d'une anesthésie (par Isoflurane et lidocaïne/épinéphrine) ainsi qu'un suivi quotidien. La cage sera enrichie pour assurer le bien-être des animaux.

4155. Le psoriasis est une maladie inflammatoire de la peau qui affecte 125 millions de personnes dans le monde. Si la mortalité associée au psoriasis est assez faible, cette pathologie affecte très sévèrement la qualité de vie des patients

Chez 30 % des patients, l'inflammation cutanée s'accompagne d'une atteinte des articulations, couramment dénommée rhumatisme psoriasique.

Le psoriasis est une maladie complexe dont la pathogenèse implique des facteurs génétiques, immunologiques et environnementaux. Il se caractérise par le développement de plaques érythémateuses couvertes de squames. Il associe une inflammation chronique et la présence des lymphocytes à une hyperprolifération et un défaut de différenciation des cellules de l'épiderme, les kératinocytes. Les lymphocytes T helper jouent un rôle majeur dans la pathologie, ainsi que de nombreuses cytokines pro-inflammatoires qu'ils sécrètent.

Cette maladie de peau a donc pour origine un processus inflammatoire associé à une perturbation de l'immunité.

Actuellement, plusieurs voies de recherche et de développement sont en cours pour améliorer les traitements de ces maladies. Notre approche vise à développer des candidats médicament permettant de réduire ou d'annihiler le processus immunitaires et inflammatoires à l'origine de ces désordres. Donc, 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.

Le processus complexe de protection via l'immunomodulation requiert le recours à l'animal.

Nous choisissons de focaliser l'essentiel de nos travaux pendant la phase précoce et d'utiliser un modèle permettant de développer notre stratégie d'immuno-modulation qui retardera les effets délétères bien avant que les animaux n'entrent dans une phase sévère de la maladie. Les procédures expérimentales seront de courte durée, et les surfaces des zones où seront induites les lésions cutanées seront de taille réduite.

Seules les meilleures molécules seront évaluées sur un nombre restreint d'animaux en phase plus sévère ; dans le souci du respect du concept de Réduction.

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

Le respect des points limites assez précoces permet le Raffinement des procédures, en permettant d'anticiper la détresse et la douleur de l'animal afin d'interrompre l'expérience, voire même de procéder à des euthanasies éthiques si nécessaire.

L'euthanasie sera réalisée dès signes cliniques notoires traduisant une atteinte du bien-être de l'animal sont rencontrés (perte de poids importante) et persistent après les différentes mesures mises en place pour y remédier. On portera une attention particulière à l'utilisation de litière dépoussiérée et à la mise à disposition de coton pour favoriser la nidification

Dans le cadre de la Réduction du nombre d'animaux impliqués, notre projet s'appuie sur une procédure préliminaire de caractérisation permettant une meilleure connaissance du modèle. Le nombre total de souris impliquées dans le projet a été diminué de façon à rester suffisant et statistiquement valable. Les expériences sont répétées une seule fois en cas de doute sur la reproductibilité.

Ce projet engagera des souris et des rats et dans un nombre estimé à 3200 souris pour la durée que couvrira ce projet. Le nombre d'animaux utilisé dans chaque lot de chaque procédure est réduit, il correspond au seuil minimal qui puisse nous permettre d'apprécier avec nos moyens techniques et en fonction de la variabilité inter-individus les effets désirés.

A terme nos travaux pourraient ouvrir de nouvelles voies de traitement de cette maladie auto-immune.

4156. Les endométrites sont une des causes majeures de baisse de fertilité chez la jument et constituent une importante source de pertes économiques dans la filière équine. Différents marqueurs inflammatoires potentiels ont déjà été étudiés dans un effort de comprendre cette pathologie et pouvoir arriver à son diagnostic précoce pour permettre l'instauration d'un traitement adapté aussi tôt que possible.

Nous avons précédemment démontré la présence de myéloperoxydase (MPO) dans l'utérus de juments en œstrus et en présence de signes cliniques d'endométrite. Sa présence dans des utérus sains suggère un rôle physiologique. La caractérisation de cette enzyme dans les différentes phases du cycle chez la jument pourra aider à mieux comprendre son rôle et établir un seuil diagnostique plus précis. L'utéroglobine est un autre marqueur inflammatoire qui, à notre connaissance, n'a pas été encore étudié dans l'utérus de la jument cyclée. Les prélèvements seront donc mis à profit pour explorer cet autre candidat comme indicateur précoce de l'endométrite.

Des prélèvements pendant les différentes phases du cycle œstral de la jument vont aider à caractériser ces deux protéines et éclairer leur rôle physiologique. Des prélèvements sur des juments montrant des signes cliniques d'endométrite et en période post-partum seront réalisés afin d'analyser la relation entre ces conditions et la présence/concentration de ces deux protéines.

Remplacement : les situations physiologiques et pathologiques dans lesquelles les protéines d'intérêt seront étudiées sont complexes et ne peuvent être étudiées que sur l'animal vivant, le statut de pièces anatomiques prélevées sur animal mort ne pouvant être connu précisément. La mesure de la MPO spécifique de l'équin ne peut pas être validée sur une autre espèce (moins évoluée) que la jument.

Réduction : cette étude n'a pas encore été réalisée mais fait suite à une étude préalable ayant déjà fait l'objet d'une publication, ce qui permettra de poursuivre l'investigation des valeurs normales et des rôles de la MPO dans des situations physiologiques et en cas d'endométrite. En outre, les prélèvements réalisés seront mis à profit pour étudier la présence, concentration et les rôles d'une autre protéine impliquée dans la modulation de la réponse immunitaire dans l'utérus et qui a fait l'objet de très peu d'études dans l'espèce équine jusqu'ici, comme en atteste le très faible nombre de publications sur ce sujet dans la littérature.

Raffinement : les procédures sont peu invasives et sont appliquées en routine en élevage équin. Elles ne nécessitent pas que soient fixés des points limites en matière de souffrance animale. Ce suivi privilégié des 60 juments de ce protocole permettra de prévenir les risques d'endométrite que nous rencontrons chaque année dans notre élevage.

4157. La castration des jeunes chevaux mâles est classiquement réalisée en pratique vétérinaire tant sur des chevaux de loisir que sur les chevaux de sport. Cette chirurgie vise à faciliter l'élevage de ces groupes d'animaux en diminuant l'agressivité, la nervosité et la sensibilité aux femelles en chaleur. Elle permet donc pour ces animaux d'avoir un tempérament plus calme et de façon constante sur l'année. Leur dangerosité éventuelle en est autant diminuée.

Cette pratique a connu des évolutions ces dernières décennies notamment par l'amélioration des techniques chirurgicales, plus sûres, et par la prise en compte de la douleur, traitée désormais par des médications appropriées.

Cependant, la castration d'un cheval pré-pubère de 300 à 500 kgs représente encore des risques tant pour l'homme (accidents à la contention) que pour l'animal lui-même : risques anesthésiques, risques de lésions lors de la chute au sol, risque hémorragique et infectieux post opératoire, risque d'éventration.

De nombreuses études ont montré la facilité de réalisation des castrations précoces chez les carnivores domestiques (chiens, chats) et leur absence d'effets secondaires notamment sur la croissance et le développement général. Des effets positifs ont même été montrés comme par exemple le moindre risque de développer des tumeurs mammaires chez les femelles.

Notre objectif est d'étudier l'effet de la castration précoce chez le cheval et les effets sur la croissance notamment osseuse en comparant des poulains castrés dès la première semaine de vie à des poulains castrés à 18 mois. Un suivi sera fait dans le temps pour évaluer la croissance corporelle et osseuse et le tempérament.

Le principe des 3 R a été mûrement réfléchi :

- Remplacement : nous ne pouvons-nous dispenser d'une étude sur l'animal pour ce projet étant donné tous les mécanismes physiologiques complexes mis en cause. En outre, il nous semble indispensable de faire cette étude pour faciliter l'élevage des chevaux de loisir ou de sport, diminuer le risque de la chirurgie et améliorer le tempérament de chevaux destinés à l'utilisation de loisir notamment par des enfants.

- Réduction : les animaux castrés dans ce projet sont tous des animaux qui auraient été castrés classiquement dans leur élevage. Nous ne rajoutons donc pas de procédure sur l'animal par rapport à un élevage classique. Le nombre d'animaux total soit 20 animaux nous permettra de collecter suffisamment de données quant à la croissance ou au tempérament de ces deux lots.

- Raffinement : les animaux sont hébergés en groupes sociaux stables, en stabulation spacieuse en hiver et au pré en été. La chirurgie est réalisée sous anesthésie générale aux deux âges, anesthésie complétée par des traitements contre la douleur adaptés (anesthésie locale, morphiniques, anti-inflammatoires). Les animaux seront manipulés dans le calme, par leurs soigneurs habituels et opérés dans les locaux de l'élevage pour éviter tout stress de déplacement. Des apprentissages seront réalisés pour faciliter les examens au cours du projet (renforcement positif par récompense).

4158. La réparation ou régénération musculaire faisant suite à une lésion implique, entre autres, un type particulier de cellules, les cellules souches du muscle strié squelettique appelées « cellules satellites ». Lors d'une lésion, les cellules satellites s'activent, se multiplient, migrent et fusionnent entre elles ou avec les fibres musculaires existantes afin de restituer l'intégrité du tissu musculaire. Une question clé est l'environnement tissulaire au sein duquel les cellules souches musculaires sont activées. L'environnement joue des rôles importants dans le comportement de ces cellules souches musculaires et des cellules myogéniques, bien que les mécanismes soient encore peu connus. A ce jour, les processus physiologiques impliqués dans la régénération du muscle squelettique ont été largement décrits en réponse à une lésion toxique ou lors de processus pathologiques (e.g., maladies musculaires) mais restent encore mal connus en réponse à l'exercice. De manière générale, l'étendue des lésions musculaires induites par un exercice d'intensité modérée (i.e., au maximum 5-8% de fibres musculaires altérées) est beaucoup moins sévère que celle consécutive à l'injection de mytoxine (i.e., lésion de l'ensemble des fibres musculaires) reproduisant ainsi les observations obtenues chez l'homme sédentaire lors de la reprise d'une activité physique (e.g., course à pied, randonnée).

L'objectif de ce projet de recherche fondamentale est de caractériser les différentes étapes de la réparation musculaire en nous appuyant sur un modèle préclinique de lésion musculaire physiologique induite par un exercice d'intensité modérée et en combinant des analyses cellulaires et moléculaires du muscle strié squelettique.

Ce projet s'appuie sur une procédure expérimentale et mobilisera un total de 108 souris

Les démarches mises en œuvre pour suivre les 3R sont :

- Réduction du nombre d'animaux : le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum après analyses statistiques des expériences passées de l'équipe et des données de la littérature. Les animaux sont "partagés" par plusieurs expérimentateurs de l'équipe. Des banques biologiques informatisées issues des expérimentations limitent l'utilisation de nouveaux animaux. Elles permettent les études histologiques et les cultures cellulaires pour plusieurs analyses. Des prélèvements multiples sont réalisés après euthanasie sur le même individu pour des tests parallèles.

- Réduction de la douleur, souffrance, raffinement : Les protocoles les moins invasifs et les moins douloureux possibles seront privilégiés. Plus particulièrement, la procédure expérimentale utilisée n'engendre pas de douleur nécessitant la mise en place d'un traitement analgésique. Aussi, des mesures sont prises pour améliorer les conditions d'élevage afin d'enrichir l'environnement des souris. Des fibres de peuplier ainsi que du coton seront placés dans les cages d'hébergement pour favoriser la nidification des souris et leur bien-être. Les caractéristiques du protocole d'exercice en termes de durée et d'intensité d'effort sont largement en deçà des capacités physiques « moyennes » d'une souris saine de sorte que tous les animaux seront en mesure de courir en descente sur le tapis roulant.

4159. 1-Objectif scientifique du projet :

Malgré les avancées importantes de nos connaissances sur les mécanismes moléculaires qui régissent le développement et la progression tumorale, le traitement de la majorité des cancers reste problématique. La grande variabilité des tumeurs, rend difficile la prise en charge thérapeutique justifiant l'importance du développement des approches de médecine personnalisée. Notre laboratoire a montré que dans certaines tumeurs des ligands et leurs récepteurs à dépendance sont surexprimés. Les couples ligand/récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs à dépendance ont les propriétés suivantes :

- en présence de ligand, le récepteur induit la multiplication cellulaire et la migration,
- en absence de ligand, le récepteur induit la mort cellulaire programmée appelée apoptose.

Le but de ce projet est de « capturer » le ligand pour induire une apoptose dans les cancers résistants au traitement conventionnel ou après rechute. Pour ceci, des modèles de cancer du humain stabilisés chez la souris, et présentant une expression des cibles thérapeutiques et de leurs récepteurs seront utilisés. Notre laboratoire a également mis en évidence que certaines chimiothérapies pouvaient réinduire l'expression de nos cibles thérapeutiques et donc rendre des tumeurs éligibles à nos thérapies alors qu'elles ne l'étaient pas.

Pour capturer les ligands, des anticorps ont été développés par le laboratoire. Pour caractériser leur activité pharmacologique, nos objectifs sont de :

- valider l'efficacité de ces thérapies ciblées
- optimiser les doses d'utilisation
- étudier les mécanismes ciblés par cette thérapie.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Le développement des anticorps anti-Ntn1 constitue une avancée prometteuse dans le domaine des thérapies ciblées anti-cancéreuses.

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

En accord avec la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacé), le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril les analyses statistiques permettant d'interpréter les résultats. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permet une classification des procédures expérimentales en classe modérée. Le choix des 33 modèles de xénogreffe sélectionnés tient compte de l'hétérogénéité des tumeurs retrouvées chez les patients. Ils ne peuvent par conséquent pas être remplacés par d'autre approche entièrement réalisées in vitro. Ils pourront en revanche être réduits en nombre et plus focalisés sur certains sous-types tumoraux en fonction des résultats obtenus in vivo et in vitro.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

4999 souris sur 5 ans à raison d'environ 1000 souris par an. Un bilan retrospectif sera effectué à mi-parcours.

4160. Le cancer est la deuxième cause de décès dans les pays développés après les maladies cardiovasculaires. Les traitements conventionnels de nombreux cancers tels que la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie ont démontré des limites d'efficacité, nécessitant un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les virus oncolytiques sont une nouvelle classe d'agent thérapeutique pouvant être une alternative au traitement des cancers. Par définition, un virus oncolytique est un virus qui démontre une réplication et une lyse spécifique des cellules tumorales avec une faible voire aucune cytotoxicité sur les tissus dits « sains ».

La perspective de ce projet est d'évaluer et de comparer dans différents modèles murins de cancers différents virus de la vaccine oncolytiques exprimant des gènes thérapeutiques (virus « armés »). Les cancers ciblés correspondent aux tumeurs pour lesquelles il y a un fort besoin médical en clinique humaine.

De plus, sachant que le développement clinique de ces virus prévoit de les combiner avec de la chimiothérapie standard utilisée en clinique ou de l'immunothérapie afin de potentialiser l'activité anti-tumorale, le projet se propose d'explorer dans les modèles murins les combinaisons de ces virus avec des agents de chimiothérapies standards ou d'immunothérapie.

Le premier point abordé sera d'évaluer l'activité thérapeutique anti-tumorale des virus de la vaccine oncolytiques « armés » en association ou non avec des substances à activité anti-tumorale. Cette activité thérapeutique sera analysée dans une large variété de modèles murins de cancers.

Les résultats issus de ce projet permettront une meilleure compréhension des mécanismes d'activité des virus oncolytiques en association avec des substances anti-tumorales couramment utilisées en chimiothérapie anticancéreuse.

Les résultats permettront également de valider *in vivo* l'activité thérapeutique anti-tumorale de nouvelles générations de virus oncolytiques dans différents types de cancer.

Du fait de l'absence de système *in vitro* comportant tous les éléments pouvant interférer avec la réplication virale, et permettant de mimer leurs interactions et leur mode d'action, l'emploi de modèles animaux est incontournable. Un nombre maximal de 11304 souris est envisagé pour ce projet. Les effets secondaires dus au traitement seront surveillés et des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique des animaux (prostration, poil hirsute, amaigrissement) sont mis en place afin de limiter le stress et la souffrance des animaux.

Le nombre d'animaux par groupe expérimental est optimisé afin d'obtenir des résultats significatifs malgré les variations entre animaux. Entre 12 et 16 animaux par groupe seront utilisés selon le type de procédure. Sachant que ces virus seront potentiellement de futurs médicaments, dans ces modèles thérapeutiques murins, une puissance statistique est nécessaire. Sachant que les biostatisticiens nous recommandent des groupes de 30 souris, chaque expérimentation sera au minimum dupliquée afin de valider les résultats obtenus.

3R :

Pour l'ensemble des procédures du projet, nous veillons à limiter l'angoisse et la souffrance des animaux, en surveillant l'apparition d'effets secondaires occasionnés par les traitements et en appliquant le cas échéant des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique des animaux. Une visite quotidienne est réalisée. Les animaux sont regroupés afin de favoriser la socialisation et de réduire le stress. De plus, un enrichissement du milieu est prévu dans chaque cage.

Les cellules tumorales sont injectées en sous cutanée, I.V. ou I. P. et les virus et les drogues sont injectées en systémiques. Toutes ces techniques d'injection sont peu douloureuses et ne nécessitent pas d'anesthésie.

Approche statistique :

Le volume tumoral, le nombre de métastases ou la survie des souris sont enregistrés et analysés pour évaluer l'activité du produit testé ou de la combinaison. Les tests du Log-Rank (Survie) et de Mann Whitney (nombre de métastases ou analyse tumorale) sont utilisés en standard (Une analyse multiparamétrique avec le modèle de Cox peut aussi être utilisée pour évaluer plusieurs variables dans l'analyse de survie).

4161. Plusieurs maladies neurodégénératives humaines telles que la maladie de Parkinson ont pu être associées à la présence d'alpha-synucléine agrégée dans des lésions observées principalement au niveau du cerveau, mais également au niveau de l'intestin.

Les hypothèses discutées les plus actuelles dans ces maladies humaines mettent en effet en avant la possibilité d'un déclenchement initial de la pathologie au niveau du système nerveux présent dans le tube digestif.

Les études de la propagation de la maladie sont souvent conduites sur des souris transgéniques surexprimant l'alpha-synucléine humaine portant une mutation responsable de cas familiaux de maladie de Parkinson chez l'homme.

Nous nous proposons de mettre en place par transgénèse virale un nouveau modèle de souris surexprimant l'alpha-synucléine humaine portant cette mutation, au niveau de l'intestin, en utilisant comme vecteurs des virus non pathogènes génétiquement modifiés.

L'étude de la faisabilité de cette stratégie sera réalisée sur un maximum d'environ 80 souris nouveau-nées. Dans un souci de raffinement, les souris sont hébergées dans des cages enrichies. Elles font également l'objet d'un suivi individuel. Après euthanasie, des analyses biochimiques et immunohistochimiques permettront d'évaluer l'efficacité de notre virus génétiquement modifié dans sa capacité à fournir une surexpression d' α -synucléine au niveau du système nerveux intestinal de souris.

Ce projet pourrait permettre de constituer un modèle d'essai pertinent dans l'évaluation du rôle en santé publique de substances chimiques telles que les produits phytosanitaires, dans le développement de maladies neurodégénératives humaines.

4162. Il y a quelques années, un nouveau genre a été identifié parmi les virus Influenza, agents responsables de la grippe : le virus Influenza de type D (IDV). Bien que principalement retrouvé chez des bovins (aux USA, en Chine, en France), l'IDV a également été détecté chez des porcs aux USA et récemment en Italie. Cependant, on ne dispose actuellement que de très peu d'information quant à la sensibilité du porc à cette infection.

Dans une étude préliminaire, nous avons inoculé trois porcs par une souche IDV isolée de bovin, montré leur réponse immunitaire et détecté du virus dans les excréments nasales de l'un d'entre eux entre 8 et 13 jours post-inoculation. L'étude expérimentale proposée ici a pour premier objectif d'étudier les symptômes induits par une souche IDV préalablement isolée sur porc (lors de l'essai préliminaire), inoculée par voie nasale d'une part, par voie trachéale d'autre part. Le second objectif est d'étudier l'excrétion du virus par les animaux inoculés, ainsi que sa transmission à des animaux sains placés en contact direct (hébergement dans le même parc). Enfin, cette étude permettra, via le séquençage des virus excrétés par les porcs inoculés, et selon le cas par les porcs mis en contacts directs avec ces derniers, de mettre en évidence d'éventuelles modifications dans le génome du virus suite à ses passages successifs chez le porc, modifications qui pourraient être liées à un processus d'adaptation à l'espèce.

Pour chaque voie d'inoculation testée, six porcs seront utilisés. Quatre d'entre eux seront inoculés et deux seront mis en contact direct. Trois autres porcs seront inoculés par du milieu de culture et serviront de témoins. Ainsi, 15 porcs seront utilisés dans cet essai, nombre nécessaire et suffisant pour répondre aux objectifs de l'étude. Dans un souci de raffinement, un soin particulier sera apporté au suivi clinique de chaque animal au quotidien. Si une altération importante de l'état de santé était notée (modification sévère de la température corporelle ou perte de poids anormalement élevée par exemple), les animaux concernés seraient euthanasiés après anesthésie.

L'ensemble des informations recueillies dans cette étude servira la mise au point d'un modèle expérimental d'infection du porc par l'IDV et apportera des éclaircissements quant au risque de diffusion de cet agent dans l'espèce porcine.

4163. Les anticorps sont des molécules qui ont la propriété de se "mouler" sur leur cible (antigène). Ils peuvent être générés par des processus de vaccination. En effet, ils sont sécrétés par des cellules du système immunitaire qui peuvent être isolées. Les anticorps sont alors utilisés comme médicament à "action ciblante", ou en recherche pour "détecter" le produit étudié. Ils sont par conséquent employés dans des domaines très variés allant de l'agriculture à la santé humaine.

L'expérimentation animale présentée dans ce projet est effectuée dans le cadre de la recherche et le développement d'anticorps monoclonaux utilisés dans le domaine du diagnostic immuno-hématologique. L'antigène considéré dans cette demande est l'antigène erythrocytaire Diego 1 (Dia ou Di1), qui est exprimé à la surface des globules rouges. Il s'agit d'un antigène présent dans certaines populations amérindiennes ou d'Asie. L'identification de ces individus est un enjeu de santé publique.

Pour ce projet, le nombre maximal d'animaux prévu est de 30 souris balb/c afin de respecter au mieux la règle des 3R :

Réduire : La stratégie d'immunisation choisie pour ce projet est l'immunisation à l'aide d'extraits membranaires de globules rouges, et en cas d'échec, d'hématies intactes. Les lots de souris sont constitués de 5 animaux, et nous nous limitons à deux lots par voie d'injection pour développer des anticorps avec la stratégie choisie.

Raffiner : L'état de santé des animaux est contrôlé après chaque injection par le suivi des poids pendant quelques jours. En cas de souffrance modérée, l'injection de morphine est prévue dans les protocoles. Enfin, pour chaque projet d'immunisation, les conditions d'immunisation et les réponses observées sont consignées dans un fichier. Une analyse rétrospective des expériences réalisées sera effectuée dans le but d'améliorer le nombre d'animaux nécessaires pour ce type d'immunisation.

Remplacer : L'obtention de lignées cellulaires a pour but d'éviter l'immunisation d'un grand nombre d'animaux utilisés pour produire des sérums.

4164. L'accès à des prélèvements biologiques de primates non humains (PNH) est un élément clé dans le développement préclinique. Ils permettent de valider in vitro différentes hypothèses scientifiques et de tester l'efficacité ou la toxicité de certains candidats médicaments. Autrement dit, utiliser des échantillons de PNH 1) permet de réduire l'utilisation d'animaux de laboratoire en les remplaçant par l'utilisation in vitro de cellules (plusieurs produits testés avec les cellules d'un seul animal) ou de liquides biologiques ; 2) rend le développement d'un médicament plus fiable, grâce à une sélection objective de l'espèce animale la plus proche de l'homme. Les prélèvements sont réalisés sur des animaux anesthésiés selon des normes établies pour le bien-être animal. De plus, un hébergement spacieux en groupe sociaux et un enrichissement du milieu adapté sont fournis à ces animaux. Anesthésie, analgésie, hébergement en groupe sociaux et enrichissement participent ainsi au principe de raffinement.

La réalisation de prélèvements biologiques suit donc parfaitement la règle des 3R, tant dans son concept que dans sa réalisation.

Les échantillons sont collectés sur demande afin de rationaliser et donc de réduire au maximum les animaux prélevés.

La présente saisine vise à décrire l'ensemble des procédures appliquées pour collecter ces échantillons.

En effet, les prélèvements biologiques proposés (sang et dérivés, LCR, moelle osseuse..) sont réalisés selon les bonnes pratiques de laboratoire, sans effet délétère pour l'animal, de la même façon que ces prélèvements peuvent être réalisés chez l'homme. Ces prélèvements ne requièrent pas l'euthanasie des animaux.

Les animaux utilisés pour ces prélèvements sont des PNH d'élevage hébergés en groupes sociaux dans des conditions répondant aux normes européennes. Les animaux donneurs sont sous surveillance vétérinaire régulière et sont prélevés selon les règles établies par la structure chargée du bien-être animal. Selon les besoins de la communauté scientifique et les capacités d'hébergement du site, le nombre d'animaux pouvant être éligible à l'un ou l'autre de ces prélèvements sur 5 ans est estimé à 3000. Parmi ces 3000 animaux, (i) tous seront prélevés pour du sang comme un humain peut régulièrement donner son sang, (ii) seul 255 seront également utilisés pour les autres types de prélèvements (10 pour de la moelle osseuse, 100 pour du LCR, 50 pour de l'urine et 75 pour des prélèvements ophtalmiques).

4165. Contexte et Justification : Le bévacicumab (Avastin) est l'anti-angiogénique de référence en oncologie gynécologique, digestive et thoracique. En pratique clinique, cet anti-VEGF-A s'administre systématiquement en association concomitante à la chimiothérapie (taxanes, protocoles Folfiri ou Folfox, pemetrexed, sels de platine...), sans qu'il soit établi à ce jour qu'une telle association concomitante soit la meilleure modalité d'administration. Les données issues de la modélisation mathématique et les simulations in silico qui en découlent suggèrent qu'une administration séquentielle (bévacizumab, délai de 5 jours, chimiothérapie) pourrait aboutir à une plus grande efficacité antitumorale, en raison d'une phase de normalisation vasculaire transitoire augmentant le débit de perfusion tumorale et maximisant la quantité de cytotoxiques atteignant la tumeur. Des données préliminaires non-cliniques obtenues sur un modèle de cancer du sein chimio-résistant ont confirmé qu'en association au paclitaxel, le bévacicumab offrait une plus grande efficacité lorsqu'il était administré effectivement de manière séquentielle. Aucune donnée n'a été publiée avec un modèle de cancer du poumon. Objectifs : L'objectif de ce nouveau projet est de confirmer cette observation sur un autre type tumoral (Cancer du Poumon Non-à-Petites Cellules) et lors d'une association avec un autre cytotoxique (combinaison pemetrexed/cisplatine). A cet effet, 130 souris nude femelles seront xénotreffées par voie sous-cutanée avec une tumeur d'origine humaine de cancer du poumon de type H460 transfectée stable par la luciférase. Le suivi de la réponse (mesure des masses tumorales) sera réalisé par imagerie en bioluminescence, permettant de mesurer les tumeurs de façon non invasive. L'objectif est de confirmer que l'administration séquentielle du bévacicumab permet d'accroître l'efficacité antitumorale de la combinaison, comparativement à l'administration concomitante standard. En parallèle, une étude mécanistique

(pharmacocinétique, recherche de biomarqueurs) sera réalisée sur un groupe satellite afin d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine du différentiel d'efficacité entre les groupes. Cette étude a été conçue pour permettre de répondre à une triple interrogation : 1. Préciser la période exacte de phase de normalisation vasculaire survenant après l'administration du bévécizumab. 2. Démontrer que l'administration séquentielle des médicaments est plus efficace que l'administration standard. 3. Préciser les mécanismes d'action (différentiel sur les concentrations plasmatiques et tumorales) et rechercher d'éventuels biomarqueurs de réponse. Le nombre d'animaux utilisés a été calculé et maintenu minimal tout en générant le maximum d'information exploitable scientifiquement. Les points limites attendus sont la croissance tumorale au-delà d'une masse de 1.5 g et tout signe de détresse ou souffrance recherchés avec une grille de score. Toutefois, la localisation de la xénogreffe (sous-cutanée avec croissance essentiellement externe), le faible risque d'essaimage métastatique et la nature des expérimentations conduites (administrations intra-péritonéales, imagerie non invasive, prélèvements sous anesthésie) ne devraient pas entraîner de douleurs particulières, mais qui seront prise en charge préventivement par l'administration de paracétamol. A ce titre, cette étude s'inscrit pleinement dans le respect de la règle des 3R, en accord avec l'article 5 chapitre II de l'arrêté du 21 février 2013.

4166. Projet : Test d'un vaccin thérapeutique antitumoral contenant de la télomérase recombinante.

Depuis les premiers succès de l'immunothérapie antitumorale, le secteur de la vaccination antitumorale est actuellement en plein regain de développement. En effet, les principaux traitements d'immunothérapie actuels permettent d'accroître/restaurer la réponse immune spontanée qui préexiste dans les cas où la tumeur est attaquée par le système immunitaire. Toutefois, pour la grande majorité des patients, les traitements d'immunothérapie actuels restent inefficaces parce le système immunitaire n'induit pas spontanément une réponse élevée contre la tumeur. Une intervention (une vaccination thérapeutique) est nécessaire pour stimuler le système immunitaire et lui apprendre à rejeter la tumeur comme un corps étranger. La télomérase est réactivée dans 90% des cancers chez l'homme et peut servir de cible reconnue par le système immunitaire. Les souris utilisées dans le cadre de notre projet permettront de confirmer l'efficacité d'un vaccin thérapeutique anti tumorale dirigé contre la télomérase avant son essai chez l'homme. Type d'animaux : souris C57BL/6j

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 400 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans à raison de 20 animaux par expérience (2 groupes de 10 souris : témoin et traité) x 20 expériences. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de projet. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu. Nous avons choisi le modèle TC1 pour sa simplicité de mise en œuvre et car ce modèle a déjà été utilisé pour l'étude préclinique d'un vaccin thérapeutique contre la télomérase actuellement testé en essai clinique aux USA chez l'homme

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides.

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

4167. Le but de cette étude est de comparer l'activité anti-tumorale du Nintedanib et du Régorafénib sur des xénogreffes de cancer colorectal humain HCT-116 et son variant résistant HCT-116/5-FU. Nous espérons que le Nintedanib aura un effet anti-tumoral comparable voir supérieur à celui du Régorafénib afin de pouvoir remplacer cette molécule pour diminuer les effets toxiques dus au Régorafénib.

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

Nous avons choisi le modèle des souris nude car c'est le modèle le plus adapté pour ce genre d'étude, ces souris étant immuno-déficiente, elles ne rejettent pas les cellules humaines qui leur seront injectées. Dans ce cas la réaction du « non-soi » ne peut avoir lieu. Nous suivrons la pousse tumorale au cours du temps et ainsi évaluer l'influence de ces deux facteurs.

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

A la fin de l'étude expérimentale, les animaux seront sacrifiés, les tumeurs prélevées pour poursuivre nos recherches au niveau des voies de signalisation au sein des tumeurs prélevées.

Au total, ce protocole nécessitera un effectif de 90 souris.

Type d'animaux : souris NMRI-Nude Foxn1

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 90 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de projet. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Une étude pilote a déjà été effectuée afin de déterminer le nombre de cellules à injecter afin de réduire le nombre d'animaux.

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

4168. La maladie de Parkinson est une affection neurodégénérative pour laquelle il n'existe pas de traitement curatif efficace. Cette maladie est caractérisée par la mort progressive des neurones à dopamine. Les causes de la maladie de Parkinson sont encore mal connues mais plusieurs types de mécanismes cérébraux à l'origine de la mort des neurones dopaminergiques ont été décrits. En particulier, de nombreuses études suggèrent que des processus neuroinflammatoires en lien avec l'activation des cellules gliales pourraient participer à la mort neuronale. Par le passé, notre équipe a montré dans un modèle de la maladie provoqué par une toxine (MPTP) chez la souris, que la réaction microgliale (les macrophages cérébraux) et neuroinflammatoire joue un rôle délétère dans la mort neuronale. La réaction neuroinflammatoire pourrait donc constituer une cible thérapeutique intéressante pour la maladie de Parkinson. Toutefois, contrairement à ce que nous observons chez les patients, la réaction neuroinflammatoire chez le rongeur reste très transitoire et ce malgré une répétition des injections de MPTP ce qui ne permet pas de tester avec fiabilité l'efficacité thérapeutique de composés neuroprotecteurs. Cette différence majeure entre les rongeurs et les primates a du reste été confirmée chez le macaque pour lequel la réaction neuroinflammatoire perdure parfois plus de 10 ans après l'arrêt de l'injection de MPTP. Nous formulons donc l'hypothèse que la régulation des processus neuroinflammatoires est différente entre les rongeurs et les primates parkinsoniens.

L'objectif de cette étude sera d'étudier la réaction neuroinflammatoire dans un modèle primate de maladie de Parkinson et de déterminer si celle-ci pourrait constituer un marqueur fiable d'évolution de la maladie. Nous avons choisi un primate de petite taille, le singe écureuil, dont l'état parkinsonien et neuroinflammatoire pourront être évalués de façon longitudinale grâce à une imagerie par IRM petit animal haute résolution (11,5 Teslas). Au total, 20 animaux seront étudiés.

La présente demande concerne un projet à long terme et nous estimons 1) qu'il est indispensable de mettre au point et d'optimiser au préalable toutes les procédures expérimentales sur 4 animaux pilotes déjà utilisés, par ailleurs, dans une étude antérieure, 2) que la taille des groupes expérimentaux fixée à 4 est le minimum requis pour l'analyse statistique et assurer l'interprétation des résultats. Tout sera mis en œuvre pour assurer le bien-être des animaux et limiter leur souffrance. En particulier, ces animaux grégaires et arboricoles seront hébergés en groupe dans des volières aménagées avec différents modules d'enrichissement (échelles, tubes et pneus suspendus, plateformes, boîtes à fourrager) et leur régime alimentaire sera varié (croquettes, fruits, graines, vers de farine et autres friandises). La surveillance des animaux se fera quotidiennement à l'aide de caméras vidéo installées devant les cages et la volière et permettant de suivre en permanence le comportement de l'animal sur écran. Les animaux seront également observés quotidiennement à l'occasion de l'entretien et de l'alimentation. A l'occasion des procédures expérimentales, des procédures d'analgésie et d'anesthésie strictes seront employées.

En conclusion, ce nouveau modèle pré-clinique de la maladie de Parkinson permettra de tester des traitements neuroprotecteurs tout en élargissant nos connaissances sur le processus pathologique de cette maladie.

4169. Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par leur instabilité génétique. Ce phénomène d'instabilité est plus au moins important selon le type de tumeurs. Nous sommes intéressés à l'étude du cancer du côlon de type MSI (pour Microsatellite instable). Ces cancers surviennent à la suite du dysfonctionnement du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable du maintien de l'intégrité du génome. Nous avons identifié une mutation du gène CBF2 dans les cancers colorectaux (CCR) MSI, responsable de l'expression d'une forme mutante du facteur de transcription CBF2. Nos résultats démontrent que CBF2 est mutés dans environ 30% de cancers MSI du colon. Par des approches in vitro, nous avons démontré que cette mutation est de type perte de fonction. La mutation du gène est associée à un mauvais pronostic des patients atteint de cancer colique sous chimiothérapie. Notre objectif est d'étudier le rôle de la protéine CBF2 dans la tumorigenèse MSI. Pour ceci nous comptons utiliser une souris transgénique KO au locus CBF2. Notre hypothèse est que la mutation de CBF2 pourra induire une modification du tableau clinique présenté par les souris Msh2KO (augmentation du phénotype tumoral, spectre tumorale différent, staging plus agressif).

Nombre/Type d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation de 60 souris CBF2 KO pour l'ensemble du projet. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment. Il repose sur les principes de

remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de projet. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides.

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

4170. L'autophagie (AP) est un processus physiologique qui régule l'homéostasie cellulaire. L'AP est conservée au cours de l'évolution et caractérisée par une importante accumulation de vacuoles autophagiques à double membrane (autophagosomes) dans le cytoplasme des cellules. Les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes conduisant à la digestion de leur contenu par les hydrolases lysosomales. L'exécution et la régulation de l'AP mettent en jeu des gènes spécifiques et différentes voies de signalisation. L'AP est aussi un mécanisme d'adaptation cellulaire en condition de stress et son absence est souvent observée dans des maladies métaboliques, neurodégénératives et cancers. La restriction calorique est un inducteur majeur de l'AP. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'impact de l'induction de l'autophagie sur le métabolisme et le microbiote intestinal. Cette étude ne peut être conduite qu'in vivo car il n'y a pas de modèles alternatifs pour l'étude de l'activation du métabolisme systémique et la réponse à la modulation du microbiote intestinal. Nous avons sélectionné in vitro des composés capables de mimer les effets biochimiques du jeûne et, donc, d'induire l'autophagie. Nous avons besoin de réaliser des expériences in vivo chez les souris afin de pouvoir confirmer nos données obtenus in vitro. Pour la réalisation de cette étude, nous effectuerons des expériences d'induction de l'autophagie chez la souris en présence et/ou absence de différents régimes alimentaires (normal, gras et en présence de sucre) et de la modulation du microbiote intestinal. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de ces traitements combinés. Ce projet, d'une durée maximale de 5 ans, impliquera l'utilisation de souris immunocompétentes (n=2160), transgéniques (n=3780) et immunodéficientes (n=300). Ce nombre d'animaux est le nombre maximal que nous envisageons d'utiliser. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales seront négatives par rapport à l'hypothèse de travail. Ce projet prévoit 7 procédures qui sont conséquentes. Les procédures 1, 2 et 3 nous permettront d'optimiser les conditions des traitements (concentrations et voies d'administrations des molécules et des antibiotiques, sélection du régime alimentaire) qui seront utilisés dans les procédures suivantes. Nous limiterons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Nous chercherons à regrouper les expérimentations afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Néanmoins, nous pourrions avoir à utiliser moins de souris si la significativité apparaît avec moins de souris. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adapté en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification, de tunnels en cartons et bâtonnets à ronger).

4171. Le décollement de rétine correspond à une séparation entre la rétine neurosensorielle et l'épithélium pigmentaire. On distingue trois formes cliniques : rhéomatogène, la plus fréquente, tractionnelle et exsudative. Le décollement de rétine rhéomatogène est secondaire à une déhiscence de la rétine (déchirure induite par une traction du vitré sur la rétine ou trou rétinien acquis) autorisant le passage de liquide depuis la cavité vitréenne sous la rétine neurosensorielle. Son incidence est estimée à 1 pour 10000 habitants par an, soit environ 6000 nouveaux cas par an. Il s'agit d'une affection potentiellement cécitante nécessitant un traitement chirurgical en urgence.

Ce traitement vise à obturer la déhiscence et à créer une cicatrice étanche empêchant le passage du liquide sous-rétinien, le pompage effectué par l'épithélium pigmentaire permettant alors de réappliquer la rétine. Actuellement, grâce à l'amélioration des techniques chirurgicales et les progrès de l'instrumentation, le taux de succès anatomique à la première intervention s'élève à plus de 80%. Cependant, malgré une réapplication rétinienne totale, la récupération visuelle est parfois limitée, principalement en raison de l'apoptose des photorécepteurs. Les causes précises de cette apoptose sont mal connues et aucun traitement préventif n'existe à l'heure actuelle. La recherche d'un tel traitement nécessite de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de la dégénérescence de la rétine décollée. Celle-ci résulte d'une interaction complexe entre différents types cellulaires juxtaposés et ne peut être modélisée dans des systèmes in vitro.

La séparation entre la rétine neurosensorielle et l'épithélium pigmentaire peut être expérimentalement induite chez le rongeur par la réalisation d'une injection sous-rétinienne, qui représente actuellement le modèle le plus utilisé pour « mimer » le décollement de rétine. Afin d'étudier les mécanismes en amont et en aval de l'apoptose des photorécepteurs, nous soumettons nos modèles animaux à une injection sous rétinienne sous anesthésie générale afin de déclencher un décollement de rétine.

Nous analyserons les différents acteurs cellulaires impliqués dans la dégénérescence rétinienne, leurs médiateurs chimiques et, une fois le mécanisme résolu, les animaux seront traités avec des inhibiteurs spécifiques issus des résultats de ces étapes pour développer de nouvelles thérapies. Les procédures expérimentales seront regroupées dans la mesure du possible pour ne pas multiplier les pools d'animaux contrôles. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et par le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des nids en cellulose et des bâtons à ronger. Si nécessaire (exemple : agressivité des mâles), des maisonnettes en carton seront introduites dans les cages de stabulation. L'utilisation du modèle animal est indispensable pour notre étude. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les conditions d'hébergements seront adaptées au modèle expérimental. Nous estimons avoir besoin de 840 souris réparties dans les différentes procédures expérimentales afin d'apporter des réponses pertinentes et complètes aux questions posées.

Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 «règle des 3R ».

4172. CD146 est une protéine d'adhésion de la jonction endothéliale et est impliquée dans le maintien de l'intégrité vasculaire, en contrôlant notamment l'infiltration de produits sanguins dans les tissus sous-jacents. Grâce à un protocole expérimental précédemment accepté, nous avons mis en évidence un rôle majeur de CD146 dans la progression de l'athérosclérose, de la péritonite et de la glomérulonéphrite. L'expression de CD146 n'étant pas restreinte aux cellules endothéliales mais retrouvée également sur les péricytes et les cellules immunitaires, il est utile de connaître la contribution du CD146 endothélial dans ces pathologies. Pour cela, nous utiliserons les souris délétées en CD146 spécifiquement sur leurs cellules endothéliales. Dans une optique de stratégie thérapeutique, il est nécessaire de mieux cibler CD146 et d'étudier le rôle du CD146 porté spécifiquement par les cellules endothéliales dans ces pathologies grâce à l'utilisation de modèles KO spécifiques. Afin de respecter les règles d'éthique, la règle des «3RRéduction/Remplacement/Raffinement» sera appliquée. Réduire le nombre d'animaux utilisé consistera à se limiter aux seules expériences absolument indispensables et à utiliser des statistiques lors de la conception du protocole expérimental pour une estimation préalable du nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Le concept de raffiner, autrement dit optimiser l'expérimentation, concerne la méthodologie appliquée aux animaux dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'anxiété subie par les animaux. Ainsi, le protocole sera planifié correctement afin d'éviter les perturbations susceptibles de limiter l'expérience et de plus, il sera établi des points limites les plus précoces possible en fonction de l'objectif de l'expérimentation. Enfin, chaque fois que cela sera possible le modèle *in vivo* sera remplacé par des modèles *in vitro* ou "*in silico*" (modèles mathématiques, bio-informatique).

Ainsi, une expérience pilote sera réalisée sur 6 animaux (3 animaux sauvages et 3 animaux déficients en CD146) pour chaque protocole. Puis, nous utiliserons le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de tests statistiques dans une seconde série d'expériences selon la méthode statistique pour le calcul d'effectif, soit un total de 120 souris. Le protocole sera arrêté si l'animal présente des difficultés à respirer (visualisées par une augmentation des rythmes cardiaque et respiratoire répercutée au niveau des flancs de l'animal), si l'animal est prostré ou en retrait, si ses poils sont hérissés. De plus, la douleur et la souffrance seront évaluées lors des protocoles et durant toute la vie de l'animal de la naissance à la mort grâce à une grille d'évaluation de la douleur et nous agirons en conséquence. Les animaux disposent de « nestlets », nids végétal à base de fibres courtes de coton, utilisés comme enrichissement de l'environnement et matériau de nidification, ainsi que de tunnels afin de réduire l'ennui et de diminuer le stress en stimulant l'activité et en procurant un sentiment de sécurité à l'animal.

4173. Les épilepsies focales sont parmi les plus fréquentes et sévères des épilepsies. Certaines formes autosomiques dominantes sont causées par des mutations dans les gènes *Lgi1* et *Depdc5*, respectivement responsables d'une épilepsie du lobe temporal avec hallucinations auditives et d'une épilepsie focale à foyer variable. Nous avons généré 6 lignées de souris knockout (KO) pour le gène *Lgi1*; 5 lignées de souris KO et 2 lignées de rats KO pour le gène *Depdc5* afin de modéliser l'épilepsie humaine chez le rongeur. Nos procédures expérimentales incluent l'étude non-invasive du phénotype épileptique (seizurescan), l'électroencéphalographie (EEG-vidéo) sur animaux libres de leurs mouvements, **l'électroporation *in utero*, l'injection stéréotaxique d'adenovirus-CRISPR-Cas9**, l'administration d'agents convulsivants ou antiépileptiques, l'électrophysiologie intracellulaire sur animaux anesthésiés, ainsi que la biologie moléculaire, la biochimie, la culture cellulaire, l'histologie et l'électrophysiologie *in vitro* à partir de cerveaux prélevés. L'objectif de notre projet est de mieux comprendre les modifications cérébrales secondaires à la délétion de ces gènes qui conduisent à des crises d'épilepsie afin de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Nos études nécessitent l'utilisation d'animaux puisque : (1) Les modifications cérébrales conduisant à l'émergence de l'épilepsie ne peuvent pas être étudiées chez l'humain. (2) La culture cellulaire, du fait de sa connectivité réduite, ne reproduit pas certaines propriétés des crises d'épilepsie dans un cerveau entier tels que le site d'initiation et le patron de propagation. (3) La modélisation *in silico* nécessite des données expérimentales encore manquantes.

Les souris et les rats présentent de nombreux avantages : (1) La possibilité de reproduire l'anomalie génétique humaine grâce aux techniques CRISPR-Cas9 chez la souris ou à l'utilisation de TALEN chez le rat. (2) Les rongeurs ont un cerveau suffisamment complexe pour générer des crises d'épilepsie. (3) De nombreux modèles d'épilepsie ont été développés dans ces deux espèces permettant d'avoir accès à d'abondantes données.

Nous estimons qu'environ 2050 animaux (1500 souris et 550 rats) seront nécessaires à la réalisation de ce projet d'une durée de 5 ans. Nos travaux seront réalisés dans l'application de la règle des 3 R (réduire, raffiner, remplacer). Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés au cours de ce projet, nous ferons une planification rigoureuse des expériences en testant

préalablement la faisabilité des expériences, en combinant différents protocoles au cours d'une même expérience et en réalisant une exploitation maximale des données à l'aide de l'utilisation appropriée de tests statistiques comme le test de student (réduire). Enfin, un soin particulier sera apporté à la réduction de l'inconfort, de la douleur et du stress des animaux grâce à l'utilisation combinée d'anesthésiques et de myorelaxants, mais aussi de conditions d'hébergement adéquates et en milieu enrichi (raffiner). La culture neuronale sera privilégiée dans certains aspects de nos travaux (remplacer).

4174. En élevage porcin, en moyenne, 14% des porcelets meurent avant le sevrage et la moitié de ces porcelets meurent au cours des 3 jours qui suivent la naissance. Les conditions de logement et de conduite des truies pendant la gestation peuvent faire varier ce taux de mortalité. Ainsi, les portées issues de truies élevées sur litière profonde de paille ont des taux de mortalité de la naissance au sevrage plus bas que les portées issues de truies élevées sur caillebotis. Par ailleurs, les truies logées pendant la gestation sur caillebotis ont des concentrations de cortisol plus élevées que celles logées sur paille, ce qui reflète un état de stress. Or le système sur caillebotis est le plus répandu dans les élevages. Le présent projet a pour objectif d'évaluer une stratégie pour réduire l'impact négatif du système caillebotis. Il repose sur l'hypothèse que la paille consommée par les truies en système paille participe à réduire leur stress. En effet la paille peut réduire la frustration alimentaire des truies, frustration fréquente chez les truies gestantes en élevage. D'autre part la paille constitue un substrat manipulable qui permet aux truies une activité d'exploration. La stratégie expérimentale consistera donc à fournir aux truies du système caillebotis des matériaux manipulables (bois) et des granulés de paille à manger (pour réduire la frustration alimentaire). Trois modes de conduite seront étudiés : un système sur caillebotis, un système sur caillebotis, enrichi et un système sur paille. Nous décrirons les performances zootechniques des truies et des porcelets dans ces trois modes de conduite. Nous explorerons en parallèle des paramètres connus pour pouvoir influencer les chances de survie des porcelets nouveau-nés, à savoir les comportements, la physiologie et l'immunité maternelles et juvéniles, ainsi que la composition nutritionnelle et immunitaire du lait.

Les effectifs sont adaptés selon les paramètres étudiés (variabilité) pour permettre une analyse statistique des résultats. Certaines mesures seront réalisées sur un grand nombre de truies et sur tous leurs porcelets (soit, par mode de conduite, au maximum 36 truies et 30 portées). Des mesures spécifiques aux porcelets seront réalisées sur un nombre réduit de porcelets dans un objectif de réduction du nombre d'animaux (à la naissance : 180 porcelets ; à 1 jour d'âge : 1 par portée, soit 90 porcelets). Les truies et les porcelets poursuivront leur carrière dans l'élevage.

Règle des 3R. Le remplacement n'est pas possible car l'utilisation d'animaux est inhérente au type d'étude (amélioration des conditions d'élevage des porcs). Nous avons réduit le nombre d'animaux au minimum statistique en fonction des mesures effectuées. Enfin, toutes les mesures seront réalisées par du personnel formé et expérimenté. Les animaux bénéficieront d'un suivi très proche par les animaliers ainsi que par les différents intervenants. Toute intervention potentiellement douloureuse ou stressante sera contrôlée, et les animaux suivis dans les minutes ou heures qui suivent. En cas de souci de santé, le vétérinaire sera consulté et les animaux traités en conséquence. Au total 1458 porcs seront utilisés dans cette expérience.

4175. L'hémophilie est une maladie qui se caractérise par un retard de la coagulation sanguine pouvant entraîner d'importantes hémorragies. Causée par la déficience en facteurs anti-hémophiliques se situant au cœur de la coagulation sanguine, elle est considérée comme étant une maladie grave et invalidante.

Actuellement, le traitement vise à injecter chez le malade le facteur de la coagulation manquant. Deux principales stratégies sont actuellement menées pour améliorer le traitement de l'hémophilie : (1) l'augmentation des performances des facteurs anti-hémophiliques injectés (demi-vie, activité spécifique) et (2) la thérapie génique. Par ailleurs, de nouveaux concepts innovants visent à modifier, à l'aide d'acides nucléiques, l'équilibre entre les facteurs initiateurs et inhibiteurs de la coagulation.

L'objectif de ce projet est d'étudier dans un modèle de rat non-hémophile, la durée et l'efficacité de matériels nucléiques codant pour des protéines d'intérêt thérapeutique pour la coagulation ou/et capable de modifier l'équilibre de cette dernière. Ces acides nucléiques sont le plus souvent transportés dans les cellules grâce à un vecteur viral, mais ils peuvent également être injectés directement dans les cellules, sous forme de molécules dites « nues ».

Le protocole consistera à injecter, en une seule fois, du matériel nucléique nu (dénué de tout vecteur viral) par voie intraveineuse et à mesurer les conséquences sur la coagulation sanguine du rat non-hémophile.

Les quelques résultats publiés sur ce type d'injection font état de douleurs et d'une baisse du rythme cardiorespiratoire dans les dix premières minutes. Devant le faible nombre de données de la littérature sur le comportement des rats lors de l'injection hydrodynamique et le manque de détails sur les conditions permettant d'optimiser l'efficacité de celle-ci, nous projetons d'effectuer tout d'abord une phase pilote. Cette première procédure consistera à injecter un type de matériel nucléique à des rats ayant reçu ou pas des médicaments visant à limiter des douleurs possibles et/ou des accélérations cardiorespiratoires. Ces rats seront tout particulièrement observés suite à l'injection, essentiellement dans l'heure qui suit. Puis, à des temps précis suivant l'injection, des échantillons de sang seront prélevés sur chacun des rats de façon à suivre l'effet de l'acide nucléique sur une période allant de 1 à 2 mois. A l'issue de la première procédure pilote, nous aurons défini les meilleures conditions permettant de mesurer les effets de l'injection hydrodynamique chez le rat.

Dans le but d'avoir les résultats les plus fiables possibles, notre projet répond au maximum aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement.

1) Remplacement : Le rat est un modèle pertinent supportant une injection de matériels nucléiques.

2) Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit à son minimum sans compromettre l'objectif de l'expérimentation.

3) Raffinement : Le bien-être des animaux sera impérativement pris en compte à chaque étape de l'expérimentation. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance (utilisation d'analgésiques appropriés), angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques fondamentaux notamment dans le domaine de la coagulation. Le projet sera mené par des personnes préalablement formées à ce genre de protocole.

Le matériel nucléaire utilisé dans ce projet comprend une séquence d'ADN codant pour un facteur de la coagulation. Ce matériel nucléaire ne comprend pas de séquences qui s'intègrent aux chromosomes de l'animal. Ce type de matériel n'induit donc ni de pathologies ni de caractéristiques nouvelles chez le modèle rat. L'injection de matériel nucléaire nu chez le rongeur n'est donc pas considérée comme générant un individu génétiquement modifié (OGM) puisque l'expression des séquences reste de courte durée. La technique d'injection proposée cible majoritairement le foie (~40%) pour une expression sur une dizaine de semaines. Le reste du matériel peut se disséminer dans la circulation sanguine mais sera très vite dégradé par les nucléases très actives. Le matériel génétique utilisé dans ce projet donc est du groupe I. Suite au traitement, il ne sera donc pas nécessaire de prévoir des conditions de confinement particulières pour ces rats. Une procédure identique à celle-ci est déjà en application dans une équipe avec laquelle nous collaborons.

Pour cette étude, nous estimons à une cinquantaine le nombre de rats utilisés sur 6 mois.

4176. Le nombre de cancers mammaires a doublé depuis une trentaine d'années, en particulier dans les pays industrialisés où la quantité et la variété de nouvelles molécules d'origine industrielle ne cessent d'augmenter dans l'environnement. Malgré l'amélioration du diagnostic et des traitements, les mécanismes (i) de réponse aux molécules qui mimet ou perturbent les effets des hormones naturelles comme les œstrogènes (hormones féminines), et (ii) de résistance aux traitements anticancéreux restent mal connus. Dans ce sens, la mise en évidence de nouveaux traitements reste l'objectif primordial.

Chez l'être humain, un nouveau récepteur des estrogènes (ER α 36) a été identifié et permet de différencier les tumeurs du sein agressives et les tumeurs non agressives. Le rôle clef de ER α 36 dans (i) le contrôle de la prolifération des cellules tumorales testiculaires et mammaires, (ii) la survie des cellules souches cancéreuses et (iii) la résistance à certains traitements du cancer du sein a été montré en utilisant des cultures de cellules.

Le projet vise à greffer des cellules mammaires humaines, qui expriment ou non ce récepteur ER α 36, chez des souris qui n'expriment pas naturellement ce récepteur. Ces souris seront ou non exposées à un mélange de polluants industriels, des alkylphénols. Ces molécules sont capables de mimer les effets des œstrogènes et susceptibles de provoquer une modification de l'expression de ce récepteur que nous envisageons d'étudier dans un contexte sain (rôle de ER α 36 dans l'initiation tumorale) ou tumoral (rôle de ER α 36 dans la progression tumorale).

Pour ce faire, nous utiliserons 2 lots de 20 souris qui seront greffées avec des cellules non cancéreuses humaines MCF-10A, qui n'expriment pas ER α 36 ou bien des cellules MCF-10A modifiées qui expriment le récepteur ER α 36. Deux autres lots de 20 souris seront greffés avec deux lignées cancéreuses mammaires humaines : MDA-MB-436 et MDA-MB-231 qui expriment faiblement ou fortement le récepteur ER α 36. Ces animaux seront ensuite exposés ou non au mélange d'alkylphénols susceptible d'activer « physiologiquement » l'expression de ce récepteur, à la manière de l'observation déjà faite sur ces cellules en culture. Un lot témoin « non greffé » de 20 animaux complètera l'étude qui utilisera donc au total la quantité minimale de 100 animaux (Réduction), nécessaire et suffisante pour une validation statistique des résultats attendus.

La dose d'exposition choisie est représentative de l'exposition mesurée dans les populations humaines. Le mélange sera administré aux animaux par gavage manuel de nourriture contaminée. Le gavage buccal, non invasif et non stressant pour l'animal, sera préféré (Raffinement) au gavage gastrique présentant davantage de risques (stress, voire perforation du tube digestif).

Cette expérimentation est réalisée en complément d'une étude déjà réalisée sur des cellules en cultures qui nous ont permis de poser nos hypothèses de travail. Le remplacement de ces expérimentations sur l'animal par des méthodes alternatives n'est pas possible dans le domaine d'étude du cancer, et plus particulièrement au stade de l'initiation du phénomène cancéreux que nous étudions.

Enfin, en conformité avec la règle des 3R, les animaux sont placés en cages multiples et le bien-être des animaux fait l'objet d'un suivi quotidien. Les souris seront anesthésiées dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées (injection sous-cutanée de cellules) et mises à mort dès lors que l'un des points limites sera atteint (perte de poids importante, ulcération de la tumeur) au cours des expériences (Raffinement).

4177. La maladie vasculaire artérielle périphérique (MVAP) est une affection impliquant une obstruction des artères périphériques, le plus souvent celles des jambes et qui atteint environ 12 % de la population âgée de plus de 60 ans. La MVAP est provoquée par une athérosclérose (durcissement des artères) ou par des lésions artérielles. Des plaques de fibres, des dépôts de calcium ou de cholestérol peuvent s'implanter dans les artères rétrécies ou présentant des lésions et être à l'origine d'obstructions. Ses deux manifestations principales cliniques sont la claudication intermittente et l'ischémie critique. L'ischémie critique constitue une urgence vasculaire. L'objectif premier du traitement de l'ischémie critique est d'éviter la perte du membre atteint en proposant une revascularisation chirurgicale ou une angioplastie. Il existe également un traitement pharmacologique dont l'efficacité se manifeste essentiellement par un soulagement de la douleur et un retard de l'amputation. Compte tenu de son coût et de son efficacité mitigée, ce traitement n'est réservé qu'aux patients représentant un très haut risque chirurgical. Depuis quelques années,

la stimulation de l'angiogénèse est devenue une voie thérapeutique majeure dans le traitement de l'ischémie critique et de nombreux essais sont en cours. Le but de cette étude est 1) d'améliorer un modèle d'ischémie de la patte postérieure, précédemment développé au Laboratoire chez la souris obèse ob/ob, la souris C57BL/6 et la souris OF-1, et l'appliquer à une souche de souris immunodéprimée NOD/SCID (NOD.CB17-Prkdcscid/NcrCrl) et 2) évaluer l'efficacité de cellules souches humaines mésenchymateuses (xenogreffe) possédant un potentiel proangiogénique et pro-vasculogénique sur ce modèle d'ischémie. En effet, nous avons montré lors d'une étude précédente que l'injection intramusculaire de ces cellules souches chez des souris OF-1 ayant subi une ablation complète du bloc artère fémorale/veine fémorale entraînait une accélération de la néovascularisation. Cependant, cette étude a également montré un résultat défavorable, à savoir un effet de courte durée du potentiel régénérateur, lié au risque de rejet des cellules humaines chez les souris immunocompétentes de type OF-1. L'utilisation d'une souche de souris immunodéprimée permettra de s'affranchir du risque de rejet et ainsi observer un effet sur une durée plus longue. La mise au point d'une chirurgie moins invasive par simple ligature de l'artère fémorale sera associée à une prise en charge multimodale de la douleur. Le projet comprend une phase de mise au point du modèle sur 36 animaux, nombre minimal pour évaluer la faisabilité et la pertinence du modèle puis une phase d'évaluation de l'efficacité de cellules souches humaines sur le modèle caractérisé. Cette seconde phase comprendra 84 animaux afin de tester plusieurs doses de cellules souches. Les animaux fortement immunodéprimés sont hébergés en portoirs ventilés, et ne sont manipulés que dans un environnement hautement confiné. Ils font l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire.

4178. La protection des animaux utilisés à des fins scientifiques repose en Europe sur quatre éléments : l'agrément des établissements où ces animaux sont utilisés, le contrôle de leur origine, l'autorisation des projets dans lesquels ils sont utilisés et la qualification des personnels intervenant auprès de ces animaux. Ce dernier point impose une formation initiale des personnels intervenant auprès des animaux. Notre établissement dispense ce type de formations essentiellement au bénéfice de stagiaires extérieurs à l'établissement pour les concepteurs depuis les années 1990 et pour les techniciens depuis cette année. L'évolution de notre offre et du contenu réglementaire de ces formations est à l'origine de la présente demande d'autorisation de projet.

Dans le cadre de ces formations nous estimons indispensable que les stagiaires pratiquent un certain nombre d'actes techniques sur les animaux vivants.

En pratique, nous délivrons des formations sur rongeurs et lapins d'une part et sur chiens et porcs d'autre part.

Pour le module rongeurs et lapins, les stagiaires réalisent la contention et le gavage des rats et des souris vigile puis l'anesthésie de ces animaux. Une fois l'animal anesthésié, différents prélèvements et administrations sont réalisés. L'animal est euthanasié en fin de séance et dans toute la mesure du possible il est ensuite utilisé pour les travaux pratiques de dissection. Le lapin est anesthésié par l'enseignant et les stagiaires repèrent les voies d'abord. Les lapins ne sont pas euthanasiés à l'issue de la séance.

Pour le module chien et porc, les stagiaires voient réaliser la contention des animaux. Ils s'entraînent à la contention des chiens. Puis les animaux sont anesthésiés par le personnel d'encadrement, placés sous respiration contrôlée après intubation et monitorés. Les différents sites d'abord et les éléments essentiels à la surveillance anesthésique sont montrés. A leur réveil, les chiens et les porcs rejoignent le projet de recherche auquel ils sont rattachés antérieurement.

Chaque session comprend jusqu'à 40 stagiaires (rongeurs et lapins) ou 20 stagiaires (chien et porc). Les sessions rongeurs et lapins utilisent 20 rats, 2 lapins et 40 souris. Nous envisageons de répéter ces modules jusqu'à quatre fois par an (deux fois concepteur et deux fois technicien).

Les sessions chien et porc utilisent deux chiens et deux porcs. Nous envisageons de répéter ces sessions deux fois par an.

Soit, une utilisation au total sur 5 ans de 1280 animaux : 400 rats, 40 lapins, 800 souris, 20 chiens et 20 porcs.

Les mesures prises pour le respect des 3R sont les suivantes: en premier lieu, l'esprit de la réglementation suppose qu'il en va du bien-être des animaux ultérieurement manipulés par les stagiaires dans leur exercice professionnel que ces stagiaires aient pratiqué ou au minimum vu pratiquer la plupart des gestes courants et peu invasifs pouvant être utiles à la réalisation de projets de recherche. Depuis le début de l'année 2016, tous nos stagiaires bénéficient d'une séance de travaux pratiques sur mannequins inertes ce qui a des conséquences à la fois de raffinement en améliorant la précision des gestes qu'ils pratiquent ensuite sur des animaux vivants et de réduction du nombre d'animaux nécessaires pour la formation. En sus, lorsque les animaux sont manipulés par nos stagiaires, ils le sont sous anesthésie, ce qui limite l'impact d'une erreur de manipulation éventuelle et répond à l'objectif de raffinement. Le nombre d'animaux est encore réduit car dans toute la mesure du possible, les rats utilisés pour les travaux pratiques de manipulations et prélèvements sont également utilisés pour des travaux pratiques de dissections.

4179. La pollution environnementale liée aux polluants organiques persistants (POP) et ses conséquences en termes de transfert dans la chaîne alimentaire est une problématique d'ampleur dans nos sociétés. Les POP sont des composés chimiques, à l'origine de nuisances avérées sur les écosystèmes et la santé humaine (perturbateurs endocriniens, neurotoxicité, ...). Au plan national, les polluants organiques tels que les Polychlorobiphényles (PCB) et le Chlordécone (CLD) impactent les sols agricoles dans les régions contaminées (ex. St Cyprien, Grès en Bouère, Antilles françaises). Bien que ces molécules soient interdites en France depuis des décennies, elles perdureront dans les sols pendant plusieurs dizaines voire centaines d'années (Plan National d'action sur les PCB, 2008). La problématique qui se pose est celle du maintien de pratiques d'élevage sur de telles parcelles contaminées. En effet, les animaux ingèrent involontairement des quantités non négligeables de sol, et par ce biais les contaminants peuvent s'accumuler dans les denrées d'origine animale. Afin de préserver la santé des consommateurs et de sécuriser les denrées alimentaires, l'Union Européenne a fixé des valeurs limites de résidus dans les aliments (Règlements CE N° 839/2008, Règlement UE N°1259/2011). Les plans de surveillance mis en place ont permis d'identifier un nombre problématique de carcasses non

conformes (exemple : crise PCB de St Cyprien en 2009, 8000 destructions de carcasses de bovins ; exemple : contamination Chlordécone aux Antilles, plusieurs dizaines de carcasses et une centaine de foies détruits entre 2011 et 2015).

Les potentialités de séquestration des POP par les matrices hautement carbonées apparaissent comme des voies prometteuses de gestion de ce risque. Ces potentialités permettraient à des exploitations de plus en plus exsangues de continuer leur fonction. Demeure la problématique de l'efficacité de ce piégeage alors même que le polluant est déjà retenu par les constituants de ce sol, notamment la matière organique. Cette efficacité dépendrait des caractéristiques de la matière hautement carbonée, caractéristiques liées au matériau originel ainsi qu'au traitement de pyrolyse. Plusieurs travaux ayant trait à la problématique de la séquestration de polluants organiques (PCB) ont déjà été valorisés au sein de notre laboratoire. Cependant une telle approche centrée sur la compétition entre les matrices carbonées et la matière organique endogène du sol n'a pas été réalisée. Cette étape est nécessaire avant d'envisager de possibles applications de remédiations sur des terrains contaminés.

Le projet consiste à caractériser, d'une part, l'impact de la séquestration de la CLD et des PCB par du biochar ajouté en tant qu'amendement à un sol, et en simulant les conditions réelles d'exposition. Les résultats obtenus seront consignés d'autre part dans une base de données en vue d'alimenter un modèle générique permettant de simuler la contamination d'un animal élevé en plein air suivant les méthodes d'élevage utilisées.

Pour ce faire 44 porcelets mâles castrés et sevrés (35 jours) seront mobilisés pour cette expérimentation. Le recul que nous avons pu obtenir sur cet animal et ce type de séquestration des contaminants, nous permet de fixer un nombre raisonné de répétition ($n=4$) pour obtenir une puissance statistique satisfaisante au regard de nos hypothèses. Il ne peut être envisagé de remplacement sur cette thématique et les animaux seront mis à mort après l'expérimentation. Des étapes de sélection de matrice hautement carbonées d'intérêt seront réalisées en amont afin de limiter le nombre d'animaux impliqués. Ces sélections seront basées sur les caractéristiques de ces matrices et un test *in vitro* de disponibilité environnementale.

Même si les porcelets sont exposés à des polluants (la chlordécone et les PCB) la dose mimera une exposition environnementale. En se reportant aux seuils toxicologiques, il apparaît que les doses employées ne devraient pas engendrer de troubles ou de souffrance pour les animaux. Un maintien en cage individuelle apparaît nécessaire pour limiter les contaminations croisées entre individus et de maîtriser l'ingestion. Ce contrôle est un point très sensible de l'expérimentation. Les conditions de l'animalerie ont été optimisées pour réduire au mieux l'impact de ce maintien : le contact visuel et olfactif sera préservé. Des éléments assurant la distraction des porcelets seront, de plus, ajoutés dans les cages. Bien qu'aucune souffrance n'ait pu être observée lors des expérimentations similaires précédentes, une évaluation quotidienne de comportements annonciateurs de cette souffrance sera réalisée. Un suivi du poids tous les trois jours sera de même réalisé pour identifier toute perte excessive de poids. Ces éléments permettront d'assurer le caractère éthique de cette expérimentation. Une mise à mort des porcelets sera réalisée à la fin de l'expérimentation.

4180. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin résultent d'une réponse immunitaire inappropriée de l'épithélium aux bactéries présentes dans la flore intestinale. Leurs caractéristiques incluent des douleurs abdominales, des diarrhées et la détérioration de l'état général du patient (fatigue chronique, perte de poids).

Ce projet a pour but d'étudier l'efficacité de traitements contre les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

La colite expérimentale peut être induite par deux modèles : le premier est l'administration dans l'eau de boisson d'un polysaccharide : le Dextran Sulfate de Sodium (DSS). Les caractéristiques typiques de la colite apparaissent au jour 3 et sont exprimés au maximum au jour 7. Le second modèle est l'induction de la colite par injection intra-rectale du trinitrobenzène sulfonate (TNBS). Ces modèles sont simples et offrent un degré élevé d'uniformité et de reproductibilité de la plupart des lésions dans le côlon distal. Ils sont souvent utilisés pour induire une forme de colite qui imite les caractéristiques cliniques et histologiques des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Pour ce projet nous pensons effectuer 30 études sur les souris avec pour chaque étude, l'utilisation de 54 souris (groupes de 6 pour le contrôle et 12 pour les tests d'efficacité), soit 1620 souris, et 10 études chez le rat soit 540 rats.

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

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation :

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant, afin de pouvoir conclure sur la toxicité du traitement.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") :

Les animaux seront suivis quotidiennement pour pouvoir identifier les signes de souffrance caractérisés par son comportement : les changements physiques (pelage, peau, yeux...), la mobilité, l'alimentation, l'agressivité, le poids du corps (mesuré tous les jours, à la même heure) limité à une perte de 20% maximum par rapport au poids initial. La consistance des fèces sera mesurée tous les 2 à 3 jours. Si l'animal présente de fortes souffrances avant la fin de la procédure, il sera euthanasié après concertation avec le référent du comité bien-être des animaux.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Notre projet se focalise sur un modèle expérimental de colite induite par l'ingestion de DSS ou l'administration de TNBS, nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Ce système est indispensable pour reproduire la physiologie de l'intestin d'un organisme entier. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

4181. L'objectif principal de notre équipe "Recherches en Oncologie Nucléaire" est de développer de nouveaux traitements contre le cancer.

La cible à détruire est la cellule tumorale, l'arme est le radioélément qui va émettre un rayon « toxique » pour cette cellule. Il faut accrocher le radioélément à un ligand et à un vecteur afin de former un radiopharmaceutique qui doit cibler et détruire la cellule tumorale tout en minimisant l'impact sur les tissus sains.

Nous disposons de différents vecteurs (Anticorps entiers, fragments, affitines, liposomes, etc...), de plusieurs ligands et de plusieurs radioéléments (Nouveaux radioéléments pour l'imagerie et la thérapie Cuivre 64, Scandium 44, Astate 211 Gallium 68 etc...), certains connus qui servent de références et des nouveaux.

Les Affitins, nouveaux vecteurs, seront testées dans cette étude en imagerie et en thérapie.

1/ L'imagerie est une procédure qui permet de suivre dans un animal, la distribution d'un radiopharmaceutique (vecteur-ligand-radioélément) à différents temps sans le sacrifier. Elle permet également de suivre la progression tumorale et l'efficacité d'un traitement.

2 appareils nous permettent d'obtenir des images de souris :

- une caméra dédiée à la bioluminescence
- une micro TEP Scan qui est quantitative et permet de développer en médecine nucléaire de nouveaux vecteurs et de tester différents radioéléments.

2/ La radioimmunothérapie cible la tumeur grâce à des vecteurs spécifiques associés à des radioéléments.

L'objectif de ce projet est de tester ces nouveaux vecteurs qui sont des Affitins ciblant le myélome multiple murin en vue de traitements de radioimmunothérapie. Etude 1 : Imagerie in vivo après une injection d'Affitins radiomarquées dans 1 modèle syngénique de myélome multiple murin.

Etude 2 : Efficacité et toxicité de traitements de radioimmunothérapie dans 2 modèles syngéniques de myélome multiple murin avec des Affitins comme vecteurs. 150 souris seront nécessaires pour ces études.

Le modèle animal est indispensable et non substituable pour déterminer quel système est le plus efficace pour détecter et détruire la tumeur et le moins toxique pour les organes vitaux avant de commencer des études chez l'homme. Règle des 3R: Réduire le nombre d'animaux utilisés en réalisant préalablement des tests in vitro sur les cellules tumorales. Le nombre d'animaux nécessaires à cette saisine prend en compte cette règle.

Raffiner en assurant une surveillance quotidienne par l'expérimentateur dès la période critique et en fixant des points limites stricts qui conduisent à l'euthanasie. Diminuer le nombre d'animaux nécessaires à nos études en développant l'imagerie pour les études de suivi thérapeutique.

4182. En France, près de la moitié des élevages porcins sont concernés par la grippe. Cette infection virale suscite un intérêt double puisqu'elle a des conséquences sanitaires et économiques pour la filière porcine mais également pour l'homme. En effet, les virus influenza porcins responsables de cette affection respiratoire ont un caractère zoonotique, c'est-à-dire qu'ils peuvent se transmettre de l'animal à l'homme. Ils font donc l'objet d'une surveillance qui révèle une évolution continue nécessitant d'adapter les outils de laboratoire, et notamment les réactifs de référence utilisés dans les tests de diagnostic. Grâce à ce projet, de nouveaux réactifs seront produits. Ce sont des sérums dits hyperimmuns, à savoir très concentrés en anticorps, dirigés contre de nouveaux virus influenza détectés récemment dans des élevages français. Ce type de réactifs ne peut être obtenu que sur l'espèce animale cible, le porc. Le projet consiste à récupérer du sang de porcs qui auront développé une réponse immunitaire suite à une infection (par voie nasale) et un rappel d'immunisation (par voie musculaire). Afin d'éviter le stress de l'isolement, chaque virus sera inoculé à deux porcs. Ces porcs seront euthanasiés 5 semaines plus tard pour récolter un volume de sang important. Ainsi, se basant sur une estimation d'un besoin annuel de deux nouveaux sérums vis-à-vis de deux virus représentatifs des souches détectées dans les élevages français, un maximum de 20 porcs devrait être nécessaire sur les 5 années de validité du projet.

Le virus grippal ne provoque généralement que très peu de signes cliniques, tout au plus une fièvre passagère le lendemain de l'infection et une diminution du gain de poids pendant quelques jours. Un soin particulier sera apporté au suivi clinique de chaque animal au quotidien. Si une altération importante de l'état de santé était notée (modification sévère de la température corporelle ou perte de poids anormalement élevée par exemple), les animaux concernés seront euthanasiés après anesthésie.

4183. Un insecticide fortement rémanent utilisé dans les Antilles françaises de 1973 à 1993 est à l'origine d'une contamination à long-terme du sol, de l'eau et des produits issus de l'agriculture et de la pêche locale. Une étude épidémiologique a montré un lien entre l'exposition à cet insecticide et le cancer de la prostate pour une partie de la population Caraïbienne d'origine africaine ayant résidé en métropole ou dans un pays occidental. Le risque de cancer de la prostate est plus élevé pour cette population par rapport à la population sédentaire vivant aux Antilles. De plus, les travailleurs directement exposés à l'insecticide dans les bananeraies, et avec généralement des concentrations dans le sang plus élevées, ne sont pas plus impactés que le reste de la population. Cet insecticide potentialiserait donc l'effet d'autres carcinogènes et l'exposition interne à l'insecticide serait liée à l'alimentation en France métropolitaine.

Une étude préliminaire chez le rat a montré que la prostate est le tissu cible de cet insecticide après le foie. L'objectif du projet décrit dans cette saisine est de documenter les effets de l'insecticide sur l'appareil génital mâle et la prostate en particulier. Nous travaillerons chez le rat in vivo. En effet aucun modèle in vitro ne peut rendre compte de la complexité des processus métaboliques et physiologiques mis en jeu. Les rats seront hébergés dans des locaux d'animalerie standardisés conformément à la réglementation, avec un enrichissement du milieu de vie leur assurant les meilleures conditions de bien-être et de santé. Les rats seront traités par l'insecticide à la dose de 5 mg/kg. Cette dose a été déterminée à partir d'une revue bibliographique des expérimentations menées chez le rat et est inférieure à la DL50 par voie orale chez le rat (114-140 mg/kg). Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum indispensable pour assurer bonne reproductibilité des résultats et une interprétation fiable. Ainsi,

69 rats seront utilisés. Une première étude sera d'abord réalisée sur 21 rats afin d'avoir une idée plus précise de l'évolution dans le temps de l'adénocarcinome de la prostate dans cette espèce. Une seconde étude sera réalisée sur 48 rats au maximum. Elle permettra, d'une part, d'avoir suffisamment de rats témoins (solvant) et traités (insecticide) pour avoir une puissance statistique suffisante, et, d'autre part, de limiter le nombre de temps d'abattage et donc le nombre de rats dans cette deuxième étude grâce aux résultats de la première étude.

4184. Un régime riche en graisses saturées et en sucres peut induire certaines pathologies métaboliques telles que l'obésité et la résistance à l'insuline.

Ces régimes sont utilisés expérimentalement chez le rat ou la souris ou d'autres rongeurs pour étudier l'impact de ces pathologies sur le métabolisme souvent en combinaison avec des facteurs nutritionnels sensés contrecarrer la survenue ou les symptômes de ces pathologies.

Un tel protocole chez le rat permet de remplacer des tissus humains (sang/plasma, ou tissus) impossibles à obtenir d'un point de vue technique (pour le sang) et/ou éthique (pour les tissus) et d'enseigner aux étudiants via ce modèle.

Ainsi cette étude servira à produire des tissus (plasma, organes) afin d'élaborer des travaux pratiques universitaires pour étudier de marqueurs métaboliques dans un contexte contrôle ou dans un contexte de régime "high fat" (HFD) pour mimer les effets d'une mauvaise alimentation (trop riche) sur le métabolisme.

Le message sera double puisqu'il s'agira d'apprendre des techniques expérimentales de biochimie et aussi d'étudier le métabolisme d'un point de vue théorique (mise en application du cours).

Deux groupes de rats mâles Sprague Dawley seront réalisés avec 16 animaux/groupe, donc un total de 32 rats sera nécessaire.

Le choix de 16 animaux par groupe (n=16) a été fait pour pouvoir générer suffisamment de matériel pour deux années universitaires, dans un souci de réduction, pour ensuite comparer les données obtenues par statistiques avec n=8.

En effet l'impact du régime HFD versus control sera analysé sur différents paramètres (poids, TBARS tissulaires, lipides et glucose sanguins par exemple...) et des tests statistiques seront effectués par les étudiants selon ce qui leur est enseigné (mise en application aussi à travers ces travaux pratiques). Ils testeront d'abord les variances des 2 lots (Fischer Test ; variances égales ou différentes) puis ensuite les moyennes (test de Student) pour chaque paramètre étudié.

Les animaux seront nourris avec des croquettes standard (n=16) ou des croquettes high fat diet (n=16; Research Diet inc. Réf. D12450B).

Les animaux seront placés dans des cages en polyuréthane, à raison de 4 rats par cage dans un souci de raffinement, avec de la litière sous forme de copeaux, un enrichissement type "Lignocel Nesting large" (2 poignées par cage) et de la nourriture et boisson à volonté en libre accès.

4185. Avec les douleurs spontanées et l'hyperalgésie, l'allodynie fait partie des symptômes cliniques fréquemment rencontré à la suite d'une inflammation ou une lésion du système nerveux périphérique ou central.

Les opioïdes sont de puissants analgésiques largement utilisés pour le traitement de la douleur. Ces composés agissent sur 3 types de récepteurs opioïdes : μ (mu), κ (kappa) et δ (delta). Cependant, les données concernant l'efficacité des agonistes des récepteurs mu et delta opioïdes sur l'allodynies mécanique trigéminal sont peu nombreuses et contradictoires.

Le projet vise ici à comparer l'efficacité de deux agonistes mu et delta sur l'allodynie mécanique trigéminales. Cette étude permettra d'établir le rôle respectif de ces récepteurs dans le contrôle de l'hypersensibilité cutanée mécanique trigéminal.

Dans ce projet, 2 approches complémentaires seront utilisées chez le rat adulte. Le nombre d'animaux utilisés a été réduit au minimum (8 à 10 rat par groupe ; 2 à 3 groupes / approche) en ne répétant certains groupes témoins déjà disponible/littérature antérieure.

Une approche comportementale mesurera les effets de 2 agonistes sur l'allodynie mécanique induite par injection de capsaïcine, n=30 rats : 10 mu, 10 delta et 10 témoins/liquide céphalo-rachidien artificiel).

Pour identifier, les réseaux neuronaux au sein du noyau spinal du trijumeau mis en jeu par les 2 agonistes, nous révéleront, par immunohistochimie, l'expression de la protéine Fos (marqueur d'activation neuronale) suite à l'injection de capsaïcine suivie de l'administration de l'agoniste mu, de l'agoniste delta ou de liquide céphalo-rachidien artificiel (n= 24, 8 rats /groupes). L'expression de la protéine Fos sera induite par stimulation mécanique après capsaïcine sur animal anesthésié.

Pour le respect de la règle des 3Rs, le nombre de chaque groupe d'animaux a été réduit au minimum nécessaire et suffisant (selon l'approche) pour discriminer un effet statistiquement significatif entre les traitements (analyse de variance à une voie et tests post hoc paramétriques ou non paramétrique). Bien que l'usage d'antalgique ne soit pas utilisé dans notre étude (en raison même du sujet), des mesures sont prises pour le Raffinement ? Celles-ci consistent à limiter l'intensité (légère), le nombre et la durée des stimulations mécaniques allodyniques au strict nécessaire conformément aux règles éditées par l'association internationale pour l'étude de la douleur. De plus certaines stimulations sont réalisées sous anesthésie (approche immunohistochimique). Enfin les rats sont logés en cage standard avec présence de congénères (2 à 3) et en milieu enrichi.

Au total 54 rats seront utilisés dans ce projet. Les animaux seront mis à mort après la fin de chaque procédure.

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

4186. L'objectif principal de notre équipe "Recherches en Oncologie Nucléaire" est de développer de nouveaux traitements contre le cancer.

La cible à détruire est la cellule tumorale, l'arme est le radioélément qui va émettre un rayon « toxique » pour cette cellule. Il faut accrocher le radioélément à un ligand et à un vecteur afin de former un radiopharmaceutique qui doit cibler et détruire la cellule tumorale tout en minimisant l'impact sur les tissus sains.

Nous disposons de différents vecteurs (Anticorps entiers, fragments, affinités, liposomes, etc...), de plusieurs ligands et de plusieurs radioéléments (Nouveaux radioéléments pour l'imagerie et la thérapie Cuivre 64, Scandium 44, Astate 211 Gallium 68 etc...), certains connus qui servent de références et des nouveaux.

Nous cherchons également à associer la radioimmunothérapie à d'autres approches thérapeutiques anticancéreuses afin d'améliorer la réponse globale au traitement.

L'intérêt de la radioimmunothérapie utilisant des particules Béta a été démontré chez des patients. Notre équipe travaille depuis des années à améliorer ces résultats en utilisant des particules Béta et des particules Alpha désormais produites par le cyclotron Arronax.

Il faut donc faire des études comparant l'efficacité et la toxicité des 2 méthodes ainsi que l'apport de nouveaux vecteurs, ligands et radioéléments.

Cette autorisation nous permettra de continuer et d'approfondir les travaux déjà réalisés par notre équipe qui avaient reçu l'agrément de notre comité d'éthique.

Notre travail consiste donc à choisir le meilleur radiopharmaceutique pour une pathologie donnée, à évaluer l'intérêt d'associations thérapeutiques incluant la radioimmunothérapie, à définir les protocoles optimaux pour cette radioimmunothérapie seule ou en association et à déterminer les mécanismes biologiques et immunologiques mis en place lors des traitement en association à la radioimmunothérapie.

Ce projet concernera les thérapies et l'intérêt de la dose de charge en RIT bêta ainsi que l'étude de l'effet du Flt3-ligand, qui est un immunomodulateur, sur la réponse tumorale aux Radio Immuno Thérapies(RIT) alpha et bêta.

4 questions sont posées :

Question A : Efficacité de la dose de charge en RIT bêta

RIT à l'aide du F(ab')₂-Lutécium-177 avec et sans dose de charge

Question B : Existe-t-il une amplification de la réponse anti-tumorale à la RIT alpha induite par le Flt-3 L ?

Question C: Quelle population immunitaire est impliquée dans la réponse au Flt-3 L au cours d'une RIT alpha ?

L'implication des populations de cellules immunitaires sera évaluée dans un essai de thérapie sur des souris déplétées en cellules T CD4, TCD8 et NK à l'aide d'anticorps spécifiques.

Question D : Quelle est in vitro la spécificité anti-tumorale des cellules activées par le FLT3 Ligand?

Chaque traitement doit comporter un groupe de 10 souris et un groupe témoin.

Ce projet prévoit l'utilisation de 500 souris.

Le modèle animal est indispensable et non substituable pour déterminer quel système est le plus efficace pour détecter et détruire la tumeur et le moins toxique pour les organes vitaux avant de commencer des études chez l'homme.

Règle des 3R :

Réduire le nombre d'animaux utilisés en réalisant préalablement des tests in vitro sur les cellules tumorales.

Raffiner en assurant une surveillance quotidienne par l'expérimentateur dès la période critique et en fixant des points limites stricts qui conduisent à l'euthanasie.

Diminuer le nombre d'animaux nécessaires à nos études en développant l'imagerie pour les études de suivi thérapeutique.

4187. La consommation mondiale en produits animaux est en augmentation. Un des challenges actuels est de pouvoir répondre à cette demande sans provoquer une compétition entre les ressources alimentaires destinées à l'homme et aux animaux. C'est dans cet objectif que des recherches sur l'utilisation de nouveaux aliments en élevage sont développées. L'évaluation de l'effet de ces nouveaux aliments sur les animaux et sur la qualité des produits issus de ces animaux est primordiale.

La transmission horizontale d'informations génétiques entre espèces est un point de plus en plus abordé suite, notamment, à la découverte des petits ARN non codants, et plus particulièrement celle des microARN. Ces derniers ont la capacité de réguler l'expression des gènes. Récemment, des études ont montré la présence dans les tissus d'animaux de microARN exogènes provenant de l'alimentation (appelés xénomiR), cependant ces travaux sont source d'une très forte controverse. Si la présence de xénomiR est confirmée, ceux-ci pourraient intervenir sur la régulation de gènes endogènes.

Dans le cas des « nouveaux » aliments, les animaux d'élevage risquent d'être en contact avec de nouveaux xénomiR pour lesquels on ne connaît pas les effets sur l'expression de gènes.

En nous appuyant sur nos connaissances et nos compétences dans le domaine des microARN, nous proposons de répondre à la question de la présence ou non de xénomiR dans les tissus animaux et produits dérivés.

Notre étude s'intéressera à l'apport d'aliment contenant de la farine d'insecte, cette matière première étant au cœur des questions sur la transition alimentaire. Ainsi, nous utiliserons ce type d'aliment pour nourrir des souris et nous rechercherons les xénomiR dans les tissus (glande mammaire, muscle, foie, sang...), mais aussi dans le lait produit par ces souris.

Ce projet nécessite l'utilisation de 20 souris femelles et de 10 mâles. 10 femelles recevront un régime enrichi en farine d'insectes et 10 recevront un régime contrôle pendant 9 semaines. Les mâles utilisés pour l'accouplement, seront utilisés deux fois afin de réduire le nombre d'animaux et ensuite ils retourneront dans l'élevage. Les prélèvements seront faits sur les animaux après euthanasie sauf pour le prélèvement de lait qui sera effectué sur des souris anesthésiées et analgésifiées afin de prendre en compte le bien-être animal. Le nombre d'individus a été réduit au maximum tout en permettant de générer un nombre de données suffisantes pour effectuer des analyses statistiques fiables. Dans un souci de raffinement les souris seront hébergées à plusieurs par cage afin d'éviter le stress dû à l'isolement. De plus afin d'enrichir leur milieu de vie des morceaux de sopalin seront ajoutés dans leurs

cages. Comme nous étudions l'effet d'un aliment sur l'organisme entier, nous sommes obligés d'utiliser l'expérimentation animale.

4188. La douleur aiguë est un processus physiologique nécessaire à la survie. Lorsqu'elle devient chronique ou persistante, à la suite d'une inflammation (douleur inflammatoire) ou d'une lésion nerveuse (douleur neuropathique), la douleur n'offre plus aucun avantage mais provoque au contraire détresse et souffrance. Les traitements disponibles ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Il faut donc découvrir de nouveaux médicaments, et pour ce faire, étudier les mécanismes responsables d'une douleur chronique.

Au cours des dernières années, notre connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires de la douleur s'est considérablement accrue. Pourtant, aucune avancée thérapeutique majeure n'est intervenue. Une des raisons à cet échec est qu'il n'y a pas une mais des douleurs. En effet, qu'elles soient inflammatoires ou neuropathiques, les douleurs chroniques se manifestent par plusieurs symptômes : douleurs spontanées, continues ou paroxystiques, et douleurs provoquées par des stimulations normalement non douloureuses (allodynie) ou normalement déjà douloureuses (exagération de la douleur ou hyperalgésie). Chacun de ces symptômes dépend de mécanismes distincts. Aussi, un médicament efficace sur les douleurs spontanées ne le sera pas nécessairement, par exemple, sur l'allodynie et inversement. D'où la nécessité de traitements spécifiques pour chacun de ces symptômes.

Le projet présent entre dans notre grand dessein de découvrir un traitement efficace pour l'allodynie mécanique. L'allodynie mécanique est le symptôme le plus fréquemment rencontré chez les patients douloureux chroniques : chez 20-50% des patients neuropathiques et 60-80% des migraineux chroniques. De plus l'apparition d'une allodynie est un facteur de risque de chronicisation de la migraine. Il est donc primordial de trouver un traitement efficace pour ce symptôme.

Comment le toucher devient-il douleur ? On sait que la survenue d'une allodynie mécanique chronique provient de modifications du système nerveux central, notamment, de l'activation, dans la corne dorsale de la moelle épinière ou le sous-noyau caudal du trijumeau (Sp5C), d'un circuit neuronal par lequel les informations tactiles peuvent gagner les voies de la douleur. L'activation d'interneurones particuliers de ce circuit, qui expriment l'isoforme γ de la protéine kinase C (PKC γ), y jouent un rôle clé : l'inactivation, génétique ou pharmacologique, de la PKC γ prévient, et, inversement, son activation révèle, l'allodynie mécanique. Inhiber la PKC γ semble donc un bon moyen de traiter l'allodynie mécanique. Cependant la PKC γ est ubiquitaire et intervient dans de nombreuses fonctions. L'application systémique d'un inhibiteur de cette enzyme risque donc d'avoir des effets secondaires importants. Ce projet vise à déterminer quels autres événements moléculaires, à côté de la PKC γ , interviennent dans l'activation des interneurones PKC γ . Bloquer ces événements spécifiques pour prévenir l'activation des interneurones PKC γ pourrait présenter un intérêt thérapeutique pour l'allodynie mécanique.

Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum. Ce nombre tient compte des animaux qui ne répondraient pas aux tests mais reste suffisant pour détecter un effet significatif entre traitements (analyse de variance et tests post hoc paramétriques ou non). Au total 184 rats seront utilisés dans ce projet. Ils seront mis à mort à la fin des procédures par overdose d'anesthésique.

4189. Nos travaux se concentrent sur la protéine NALCN, un canal ionique récemment découvert. Notre groupe est le premier à étudier l'impact de la protéine canal NALCN dans la cancérogénèse prostatique. Nos résultats prouvent que NALCN joue un rôle important dans la régulation du comportement métastatique des cellules prostatiques cancéreuses humaines. Nous avons notamment montré que la diminution d'expression de NALCN permettait d'inhiber les processus de migration et d'invasion cellulaire. C'est pourquoi nous pensons que NALCN peut être une nouvelle cible thérapeutique dans la lutte contre le cancer de la prostate et notamment dans les stades avancés de la maladie. Afin de confirmer nos résultats et d'appuyer cette hypothèse il nous est nécessaire d'approfondir nos travaux grâce à des expériences se rapprochant le plus possible du processus de carcinogénèse dans des organismes complexes, c'est à dire des expériences in vivo. Les souris "nude" sont l'un des modèles les plus utilisés dans le cadre de l'étude des cancers humains, c'est pourquoi nous les avons choisies pour nos expériences. Les métastases prostatiques sont connues pour se disséminer préférentiellement vers les os. Ainsi, une injection des cellules cancéreuses directement dans le tibia des souris nous permettra de mimer au mieux le processus de dissémination des métastases chez les patients. Par ailleurs, l'injection directe de cellules cancéreuses par voie intra-artérielle nous permettra d'étudier le processus global d'apparition des métastases. Pour ces études nous envisageons d'utiliser des cellules exprimant NALCN de manière endogène ainsi que des cellules dont l'expression de NALCN a été diminuée (Knock-down). Nous nous attendons à confirmer nos résultats in vitro à savoir que les cellules présentant une diminution d'expression de NALCN ne produiront pas ou très peu des métastases.

Raffinement - Les règles d'expérimentation seront comme suit. Les souris seront tout d'abord placées en stabulation durant une semaine avant le début du protocole, au sein de l'animalerie d'accueil. Elles cohabiteront par groupe de cinq dans un environnement enrichi, sous surveillance journalière. Tout élément rentrant en contact avec la souris est stérile : nourriture et litière sont irradiées, grilles, cages et biberons sont autoclavés. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Le change de la litière et de la cage s'effectue une fois par semaine par le personnel compétent de l'animalerie. Pendant toute la durée de l'étude, l'état de bien-être des animaux sera évalué quotidiennement. L'observation de signe de souffrance (prostration, état du pelage, perte de poids) entraînera la sortie du protocole de l'animal. Lors de l'injection des cellules tumorales, les souris seront anesthésiées.

Remplacement - La dissémination et la croissance des cellules cancéreuses aux sites secondaires impliquent les cellules cancéreuses mais également les cellules des organes ciblés et le microenvironnement. Par conséquent, l'étude de ces phénomènes in vitro en boîte de pétri reste trop artificielle pour mimer la complexité d'un organisme.

Réduction - Afin de réduire le nombre de souris utilisé, chaque groupe contiendra le nombre minimum d'animaux (10 souris par groupe) indispensable à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Un nombre total de 120 souris sera nécessaire. En outre, l'utilisation de l'imagerie in vivo non invasive pour suivre l'évolution des tumeurs et les atteintes osseuses permettra de réduire le nombre d'animaux requis.

4190. Les protéines végétales représentent 65-70% des apports en protéines alimentaires au niveau mondial. Leur valeur nutritionnelle est définie par leur capacité à fournir des acides aminés pour les besoins de l'organisme pour la croissance et le renouvellement des protéines corporelles. La capacité des protéines alimentaires à assurer les besoins en protéines de l'organisme dépend donc de deux phénomènes dépendants. Le premier est la biodisponibilité de la protéine, c'est à dire la proportion des acides aminés disponibles après les processus de digestion et d'absorption et accessibles pour les phénomènes métaboliques tissulaires. Le second est l'efficacité de ces acides aminés à être utilisés pour répondre aux besoins spécifiques des tissus de l'organisme. Dans ces conditions, il semble important d'étudier la cinétique de digestion, la biodisponibilité et les qualités nutritionnelles des protéines végétales, en particulier dans les situations où l'utilisation de cette source est d'intérêt, par exemple chez les sujets âgés. En effet, le vieillissement est lié à une perte significative de la masse et de la fonction musculaires, autrement appelée sarcopénie. Ce syndrome est associé à une augmentation des besoins en protéines. En outre, le vieillissement est caractérisé par une meilleure assimilation et une plus grande efficacité métabolique des protéines à digestion rapide, comme certaines protéines laitières (lactosérum). L'avancée en âge est également caractérisée par la nécessité de contrôler la consommation de graisses saturées et de cholestérol et d'optimiser l'apport en micronutriments. Ainsi, dans une telle situation, un intérêt particulier pour les sources alimentaires végétales, pauvres en lipides et riches en micro-constituants, apparaît. Néanmoins, ces protéines doivent être de bonne qualité nutritionnelle (profil en acides aminés correspondant aux besoins) et être facilement et rapidement digestibles.

L'objectif de cette étude est d'étudier de nouvelles matrices alimentaires enrichies en protéines végétales dont le contenu et la structure de la fraction protéique sont nutritionnellement adaptés au sujet âgé. Dans ce projet, nous testerons différentes formulations alimentaires que nous ne pouvons décrire pour des raisons de confidentialité. Des structures contrastées, plus ou moins digestibles, seront testées afin d'évaluer l'effet potentiel des mélanges et des procédés sur la vitesse de digestion et l'assimilation protéique au cours du vieillissement.

Nous souhaitons mettre en place un protocole utilisant des rats mâles Wistar jeunes et âgés afin d'évaluer l'impact de l'introduction de ces protéines végétales et de leur procédé de transformation sur leur assimilation par des rats jeunes en croissance et par des rats âgés.

Cette étude se déroulera en deux parties. La première nous permettra de tester l'efficacité alimentaire, la digestibilité, l'utilisation protéique, la rétention protéique et le taux de croissance de rats jeunes (1 mois), consommant ces aliments durant 20 jours. Huit formulations différentes seront comparées à un régime témoin (6% de lipides, 77% de glucides et 17% de protéines sous forme de caséine), et à un régime sans protéines (pour mesurer les pertes azotées endogènes). Ces rats seront séparés en 10 groupes de 10 rats chacun, soit 100 rats. Cette première partie nous permettra aussi de sélectionner les 4 formulations les plus intéressantes (présentant les meilleurs indices de digestibilité et induisant les taux de rétention protéique les plus élevés) à étudier chez le rat âgé.

La seconde partie nous permettra d'étudier la rétention azotée tissulaire et le métabolisme protéique musculaire chez le rat âgé (22 mois), consommant les aliments choisis à l'étape précédente durant 6 semaines. Les 4 formulations retenues seront comparées à un régime témoin (6% de lipides, 77% de glucides et 17% de protéines sous forme de caséine) et à un régime de référence (6% de lipides, 77% de glucides et 17% de protéines sous forme de lactosérum). Ces rats seront séparés en 6 groupes de 10 rats chacun, soit 60 rats. Pour ce projet, nous utiliserons au total 160 rats. L'ensemble du projet comporte 4 procédures dont le degré de gravité va de légère pour 3 d'entre elles à sans réveil pour la dernière. Un maximum de mesures sont prises afin de respecter la règle des 3Rs, en effet l'effectif est calculé pour une utilisation minimale d'animaux et leur bien-être est suivi selon les procédures décrites en annexe (arbre de décision, tableau d'observation des points limites)

L'ensemble des résultats obtenus nous permettra de mieux comprendre l'effet des différentes formulations et la capacité de ces protéines à être utilisées par l'organisme, notamment chez la personne âgée souffrant de sarcopénie.

4191. Responsables de la moitié des décès per- et post-opératoires, les hémorragies représentent un problème majeur en chirurgie, aussi bien au cours d'intervention réglées qu'en cas de traumatismes pénétrants. L'hémostase, première étape clé de la cicatrisation, représente l'ensemble des mécanismes qui concourent à l'arrêt du saignement. Cette étape repose sur diverses techniques conventionnelles (compressions, ligatures, sutures, ...). Cependant, lors d'hémorragies majeures ces techniques se révèlent souvent insuffisantes pour l'arrêt du saignement. Les chirurgiens ont alors recours à des hémostatiques locaux, tous résorbables. Malgré leur efficacité prouvée, ces hémostatiques provoquent de nombreux effets secondaires pouvant conduire au décès du patient. Dans ce contexte, un nouvel hémostatique a été mis au point. Ce pansement est constitué de polyuronate de calcium enrichi en ions zinc, deux composés connus pour leurs propriétés hémostatiques. Non résorbable, il ne sera laissé au niveau de la plaie qu'un temps limité ce qui devrait permettre d'éviter les effets indésirables liés à des résorptions incomplètes. Une étude récente démontre in vitro que cet hémostatique, en comparaison aux produits actuellement disponibles, a une action bénéfique sur les cellules clés de l'hémostase. En effet, il augmente fortement l'activation et l'adhésion des plaquettes tout en préservant les paramètres morphologique et fonctionnel des cellules endothéliales, composantes essentielles des vaisseaux sanguins. L'objectif de ce projet est donc d'évaluer in vivo l'efficacité de ce nouvel hémostatique à différentes échelles dans un modèle de perforation de l'artère fémorale et un modèle d'hépectomie partielle chez la souris. Le projet comporte 2 procédures séquentielles pour un total de 120 souris. En cas d'échec de la procédure 1 (40 souris), le protocole serait arrêté.

Règle des 3 R La procédure n°1 est de classe sans réveil, la perte de sang pouvant parfois être importante avant hémostase complète. Seule la procédure n°2 induira des souffrances modérées, en effet l'utilisation d'une anesthésie générale et l'utilisation d'un analgésique administré systématiquement par voie sous cutanée aux animaux pendant 3 jours post-chirurgie et suivie d'une administration par voie orale si nécessaire préviendra toute souffrance inutile. Un suivi du comportement et de la physiologie des animaux sera également effectué tous les jours. Plusieurs paramètres seront évalués : poids de l'animal, aspect du pelage, comportement (toiletage excessif, état défensif, plissement des yeux ...), blessures / morsures, hémorragie interne afin d'éviter toutes souffrance inutile. La séquence des procédures peut limiter le nombre des animaux en cas d'échec de la 1ère procédure (40 souris) qui arrêterait le projet et éviterait la souffrance modérée de la 2è phase expérimentale. Le nombre d'animaux est réduit au minimum (10 par groupe) pour atteindre une significativité statistique. Cet essai représente le complément d'une série d'expériences faites in vitro ainsi que d'une expérience in vivo intitulée «Evaluation de l'effet à long terme d'un nouvel hémostatique non résorbable, Hémo-Ionic®, à base de Polyuronate de Calcium et de Zinc dans un modèle murin d'excision cutanée », nécessaire pour le passage en phase clinique. L'effet de l'hémostatique qui sera étudié dans ce projet a été testé sur des plaquettes et des cellules endothéliales in vitro. Il a été démontré que ce pansement augmente fortement l'activation et l'adhésion des plaquettes tout en préservant l'aspect morphologique et fonctionnel des cellules endothéliales, cellules clés de l'angiogenèse. Cette étude nécessite actuellement une validation de l'efficacité du pansement in vivo avant de pouvoir le proposer en clinique pour le traitement des hémorragies majeures ou après échec des techniques conventionnelles en chirurgie.

4192. Les tendinopathies calcifiantes de la coiffe des rotateurs sont une cause fréquente de douleurs chroniques de l'épaule. Elles sont liées à des dépôts de cristaux d'hydroxyapatite au sein des tendons. Cette pathologie est fréquente puisqu'elle a été rapportée comme la cause de 7% à 54% des douleurs chroniques de l'épaule selon les séries. La cause aboutissant à ces dépôts reste encore inconnue. La calcification se forme progressivement au sein des fibres tendineuses et, une fois constituée, provoque des douleurs chroniques de l'épaule. Cette phase peut durer de quelques mois à quelques années. L'histoire naturelle est ensuite marquée par une phase de résorption aiguë de la calcification au cours de laquelle la calcification se déverse dans la bourse sous-acromio-deltoidienne, et entraîne une réaction inflammatoire intense qui aboutit ensuite à la disparition de la calcification.

L'objectif de ce protocole est d'étudier la réaction inflammatoire induite par les cristaux dans le phénomène de résorption de la calcification. Pour cela, nous procéderons à l'injection de cristaux d'apatite humains dans une cavité mimant la bourse sous-acromio-deltoidienne. Cette cavité sera constituée sur un modèle de souris par l'injection d'air stérile en sous-cutané. Ce modèle a déjà été utilisé pour l'étude des rhumatismes microcristallins.

Après une injection d'air stérile en sous-cutané sur le dos à J0 et J3, des cristaux issus de calcifications de patients seront injectés dans la poche à J6. Ces cristaux sont recueillis avec le consentement des patients lors d'une procédure d'aspiration de la calcification sous échographie réalisée dans un service hospitalier de Rhumatologie. Nous étudierons le volume de l'exsudat induit et le nombre de leucocytes ayant afflué dans la cavité. Nous réaliserons également un dosage de cytokines inflammatoires dans l'exsudat (IL-1 β , TNF α et IL-6 notamment). En parallèle, nous réaliserons une étude histologique de la membrane de la poche afin d'en évaluer les modifications : épaisseur, infiltrat cellulaire, vascularisation.

La réaction inflammatoire induite par les cristaux de patients sera comparée à celle induite par les cristaux d'apatite de synthèse pour lesquels il existe quelques données (afflux rapide de leucocytes dans la cavité synoviale, sécrétion locale de TNF α).

Ces expérimentations sur la souris sont nécessaires pour mieux appréhender le phénomène inflammatoire dans son ensemble permettant de faire un lien entre les résultats obtenus in vitro.

Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative, à savoir 6 animaux par condition, à raison de 3 conditions. Les analyses seront réalisées à 2 temps (H6 et H24 après l'injection des cristaux), soit un total de 36 souris. Les expérimentations seront répétées 1 à 2 fois afin d'étudier la reproductibilité des effets observés si besoin. Le bien-être des animaux sera primordial durant les expérimentations, notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement (ajout de papier dans chaque cage pour leur permettre la conception d'un « nid »), une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

4193. L'addiction au tabac est une des addictions les plus répandues dans le monde. En France, avec environ 32% de la population adulte, la consommation de tabac représente la première cause de mortalité évitable faisant du tabagisme l'un des plus grands défis de santé publique de notre époque. La nicotine est considérée comme l'un des principaux produits chimiques du tabac responsable de ses propriétés addictives. Outre ses effets renforçant, la nicotine améliore également l'attention aussi bien chez l'homme que chez l'animal, une action psychoactive qui pourrait contribuer à l'initiation et au maintien de son usage. En revanche, les fumeurs abstinents présentent de forts déficits attentionnels qui pourraient réduire leur capacité de contrôler leur consommation et ainsi provoquer la rechute. Toutefois, à l'heure actuelle, on ignore si ces déficits attentionnels sont la cause ou la conséquence de l'exposition chronique à la nicotine. L'association entre le tabagisme et les déficits attentionnels peut être dû à plusieurs raisons. Ces déficits pourraient soit préexister à l'utilisation de nicotine expliquant les mauvaises performances attentionnelles des fumeurs, soit résulter directement de l'utilisation chronique de nicotine. Alternativement, et plus probablement, ces deux phénomènes pourraient causalement s'influencer au travers d'un processus en spirale. C'est à dire que les futurs fumeurs présenteraient des déficits attentionnels mineurs préexistants qui les prédisposeraient à commencer à fumer, et qu'ensuite, l'utilisation de la nicotine chez ces individus aggraverait ces déficits attentionnels augmentant ainsi encore plus la nécessité d'utiliser la nicotine pour améliorer l'attention. Notre projet de recherche a pour but de déterminer si le processus en spirale peut expliquer les liens de causalité existants entre les déficits de l'attention et l'utilisation chronique de nicotine.

Le cortex préfrontal (PFC) joue un rôle essentiel dans les processus attentionnels aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Des études de neuroimagerie ont montré que les fumeurs présentent une diminution fonctionnelle du PFC et une altération de l'attention, suggérant que des dysfonctions du PFC peuvent causer ces déficits attentionnels. Cependant, la nature des processus neuronaux du PFC sous-tendant les performances attentionnelles ainsi que leurs modifications suite à l'exposition à la nicotine restent très mal connues. À ce stade, pour réaliser de nouvelles avancées dans la compréhension des fonctions attentionnelles et de leurs corrélats neuronaux, il est nécessaire d'utiliser un modèle animal. Chez le rat, les fonctions cognitives dépendant du PFC ont été largement étudiées en utilisant la tâche comportementale de 5 choix (5-CSRTT). Ces études ont montré que la nicotine et les agonistes nicotiques améliorent l'attention, alors que le sevrage à la nicotine induit des déficits attentionnels. De plus, le PFC joue un rôle prépondérant dans les performances attentionnelles normales, ainsi que dans les effets pro-attentionnels de la nicotine. Notre projet de recherche a pour ambition d'identifier les processus neuronaux du PFC sous-tendant les performances attentionnelles et de commencer à expliquer comment les dysfonctionnements attentionnels du PFC peuvent conduire au développement et/ou maintien de l'addiction à la nicotine. Notre hypothèse générale est que les déficits préexistants dans les processus neuronaux attentionnels du PFC vont augmenter la vulnérabilité à utiliser de la nicotine et que, chez ces sujets, l'usage de nicotine va altérer davantage l'attention et les processus neuronaux du PFC associés, et augmenter ainsi la nécessité de prendre plus de nicotine. Nous utiliserons une approche à plusieurs niveaux combinant des modèles animaux d'attention et d'addiction aux drogues à des techniques d'électrophysiologiques et d'optogénétiques de pointes pour l'enregistrement et la manipulation de l'activité cérébrale.

Nous interviendrons de façon invasive (e.g. pose de cathéter intraveineux à demeure ; implantation intracrânienne d'électrodes ou de fibres optiques ; administration de drogues ; enregistrements électrophysiologiques *in vivo*) dans 3 différentes sous-régions du PFC : le cortex cingulaire, cortex prélimbique et le cortex préfrontal infralimbique. Notre projet nécessitera au total, pour les 3 structures ciblées, l'utilisation de 264 rats males de la souche Wistar Han. Le degré maximal de gravité de ces interventions invasives est modéré et ne devrait pas varier avec la structure cérébrale ciblée.

L'étude directe des processus de causalité neurobiologique entre les déficits attentionnels du PFC et l'addiction à la nicotine nécessite des interventions invasives que nous réaliserons exclusivement sur le rat de laboratoire. En effet, il n'existe pas encore de modèles mathématique ou *in silico* valides et réalistes permettant d'étudier ces processus et, d'autre part, l'addiction est un trouble du comportement qui ne peut pas être récapitulé sur des lignées cellulaires (humaine ou animale) ou tout autre modèle *in vitro* cellulaire ou subcellulaire. Toutefois, le nombre d'animaux sera réduit au minimum tout en ayant un nombre suffisant d'animaux pour étudier les différences individuelles ou pour détecter des différences significatives entre les groupes (voir section 3.4.10.). De plus, tout au long des expériences, plusieurs critères seront pris en compte pour quantifier le niveau de souffrance de l'animal et décider de procéder à sa mise à mort le cas échéant si le point limite est atteint (voir section 3.3.5.). Les animaux seront logés par groupe de 2 dans des cages collectives (surface au sol de 940 cm²) enrichies par la présence de tunnels et des os à ronger afin de diminuer le stress et l'anxiété des animaux. Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie chimique (Kétamine + Xylazine) et sous analgésie (carprofène) afin de limiter la douleur et le stress des animaux. Enfin, un traitement prophylactique prophylactique d'antibiotique (ampicilline, 50 mg/kg) sera réalisé en amont pour prévenir l'apparition d'infections et ce de façon continue et quotidienne pendant plus plusieurs mois.

4194. Le but de nos travaux est de comprendre comment, au cours du développement, i) se construisent les réseaux de neurones locomoteurs de la moelle épinière et ii) se mettent en place leurs interactions avec les autres réseaux moteurs (notamment oculaires, posturaux et respiratoires). Pour cela, nous avons choisi d'étudier un modèle d'amphibien anoure exclusivement aquatique, *Xenopus laevis*, dont la métamorphose complète implique une refonte quasi intégrale de son système posturo-locomoteur et des réseaux moteurs sous-jacents. Ainsi, nous analysons pendant cette phase développementale particulière les mécanismes de plasticité neuronale qui sous-tendent les adaptations comportementales observées entre les stades larvaires pré-métamorphoses (têtards) et les stades post-métamorphoses (juvéniles). Nos analyses s'étendent du comportement des animaux (différentes formes de nage, ajustements posturaux et oculaires associés, rythme respiratoire) jusqu'aux propriétés morphologiques et électriques intrinsèques des neurones moteurs, en passant par les caractéristiques pharmacologiques et anatomiques des voies de connexions entre les réseaux. Nos approches sont multiples et complémentaires pour arriver à une compréhension intégrée de la construction du système nerveux, de son fonctionnement et de sa plasticité au cours du développement. Lorsque les questions posées le permettent, nous avons aussi recours à des simulations numériques afin de limiter le nombre d'animaux impliqués dans nos expérimentations.

Sur notre modèle d'étude, nous aborderons plusieurs questions fondamentales, telles que :

- Comment les coordinations locomotrices adultes émergent-elles des coordinations larvaires ? Le têtard se déplace en réalisant des ondulations de son appendice caudal (système basé sur une alternance des contractions à gauche et à droite) alors que le juvénile et l'adulte se déplacent grâce à des extensions en phase des membres postérieurs (système basé sur une synchronie bilatérale). Les réseaux adultes sont peu à peu mis en place pendant la métamorphose alors que les réseaux larvaires sont toujours fonctionnels. Nous étudierons alors comment ces deux systèmes interagissent dans les stades mixtes de la métamorphose et comment le système adulte devient progressivement prépondérant au cours de stades les plus tardifs.
- Comment les activités locomotrices spinales interagissent-elles avec les autres systèmes moteurs et comment ces interactions s'adaptent-elles au changement de mode locomoteur pendant la métamorphose ? Lors de la propulsion de l'animal dans l'eau, les autres systèmes moteurs sont aussi mis en jeu afin d'assurer le maintien d'une posture adaptée à la réalisation du mouvement, ou le contrôle de la direction du regard, ou encore le débit respiratoire nécessaire au maintien des fonctions métaboliques. Nous avons déjà pu montrer que toutes ces coordinations reposent largement sur des interactions centrales (c'est-à-dire ne faisant pas

intervenir les retours sensoriels) pilotées directement par les réseaux locomoteurs spinaux. A présent, nous analyserons les mécanismes qui assurent ces coordinations et leur adaptation au changement de mode locomoteur pendant la métamorphose.

- Quel est le rôle des informations supra-spinales et des informations sensorielles dans la construction des réseaux adultes au cours de la métamorphose ? Dans les modèles classiques d'étude du développement, il est impossible de faire clairement la part de ces informations dans la mise en place des réseaux moteurs, du simple fait qu'elles-mêmes se mettent en place au même moment. Un des avantages du xénope est l'existence de la métamorphose, pendant laquelle les réseaux moteurs spinaux sont entièrement remaniés, voire reconstruits, alors que certaines structures sensorielles sont déjà en place et ne seront plus modifiées par la suite. Il devient alors possible de comparer l'effet d'une manipulation sensorielle (reproduisant par exemple une lésion rencontrée dans certaines pathologies humaines ou en postopératoire) faite avant ou après la métamorphose (c'est-à-dire avant ou après la construction du réseau adulte) sur le fonctionnement et la plasticité du réseau spinal adulte ; ceci offre donc désormais l'opportunité unique de séparer la part de cette modalité sensorielle dans l'adaptation classique du réseau moteur (lorsque la lésion est faite une fois le réseau adulte mis en place, après la métamorphose) de son rôle dans l'assemblage du réseau au cours de la métamorphose (lorsque la lésion est faite avant). Dans ce contexte, nous étudierons l'impact d'une hémilabyrinthectomie (comme pratiquée chez beaucoup de patients souffrant du syndrome de Ménière) sur la plasticité du réseau posturo-locomoteur au cours du développement (mise en place) et chez le juvénile (adaptation).

Nous utiliserons environ 1500 animaux sur la totalité de la durée du projet. Nous respecterons la règle des 3R tant que possible : Remplacer : nous utiliserons lorsque c'est pertinent des simulations numériques mais cela restera mineur ; en effet, l'étude de la plasticité neuronale au cours du développement nécessite une approche sur l'animal. Réduire : nous nous sommes basés sur nos expériences précédentes et les contraintes statistiques que nous avons afin de déterminer le nombre maximal d'animaux. Ce nombre est une estimation maximale et sera sans doute réduit dans les faits. Raffiner : les interventions (labyrinthectomie et neuroanatomie) sont réalisées sous anesthésie générale et les animaux récupèrent en général en moins de 2h une activité normale. Ils seront plus attentivement observés afin de détecter tout signe de souffrance. Le cas échéant, l'expérience est immédiatement interrompue chez l'animal concerné.

4195. La demande sociale du maintien de la santé le plus longtemps possible et la nécessaire stabilisation des dépenses de santé conduisent à considérer l'alimentation dans la réduction des risques de survenue des maladies dégénératives liées à l'âge comme incontournable. Ce concept du potentiel santé de l'alimentation est particulièrement pertinent pour la gestion de la physiologie ostéoarticulaire.

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie dégénérative inflammatoire chronique qui est caractérisée par une atteinte articulaire souvent bilatérale et symétrique. évoluant par poussées vers la déformation et la destruction des articulations atteintes. Il s'agit du plus fréquent des rhumatismes inflammatoires de l'adulte avec une prévalence de 0.4% en France. De manière intéressante, cette pathologie possède certaines similitudes avec une autre pathologie, la maladie cœliaque, notamment de par le caractère auto-immun des deux pathologies et l'existence d'altérations comparables, dans les deux cas, de certains mécanismes de l'immunité. La maladie cœliaque se définit comme une intolérance permanente à différentes fractions protéiques du gluten contenues dans différents types de céréales telles que le blé, l'orge, le seigle et le triticale, ce qui conduit à une malabsorption de certains nutriments et des carences alimentaires. Les parallèles existants entre les deux pathologies, associés à l'observation par les rhumatologues d'une proportion importante, au sein des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, de personnes identifiant le gluten alimentaire comme facteur aggravant de leur symptôme, nous ont amené à étudier l'impact potentiel du gluten alimentaire sur le développement de la polyarthrite rhumatoïde. Ce travail devrait notamment permettre d'évaluer objectivement la pertinence du régime sans gluten pour les personnes souffrant de polyarthrite rhumatoïde.

Le volet in vivo de ce projet sera conduit sur un modèle de polyarthrite induite par injection de collagène de type II bovin chez le rat mâle Sprague-Dawley. Dans un premier temps, ce modèle, par ailleurs largement décrit dans la littérature doit être mis au point au sein de nos structures. Pour ce faire, une expérimentation pilote sera menée avec 4 lots de 8 animaux âgés de 10 semaines afin de tester notre protocole et différentes doses de collagène. Les rats subiront une injection unique, intradermique (à la base de la queue) de 100/400µg de collagène de type II bovin ou de véhicule. Ce modèle d'étude permet d'appréhender le développement de la pathologie arthritique et sa potentielle modulation par l'alimentation, ce qui n'est possible que sur un organisme vivant pris dans sa globalité. Le nombre d'animaux a été déterminé sur la base de la bibliographie et d'une puissance statistique nécessaire à la validation du modèle. Tout au long de l'expérimentation, une surveillance sera mise en place pour détecter, réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'anxiété subie par les animaux.

4196. L'accroissement de la masse musculaire résulte de la balance positive entre synthèse et dégradation protéique. Ces deux processus sont finement régulés par différents facteurs nutritionnels incluant acides aminés, hormones et micro-nutriments, et peuvent être influencés par le statut physiopathologique. Par exemple, le vieillissement et l'obésité sont caractérisés par une fonte musculaire. L'obésité peut entraîner une fonte accentuée des muscles squelettiques masquée par l'accumulation de différents lipides (triglycérides, diglycérides, céramides) au sein de ces derniers. Cette accumulation ectopique de lipides au sein de tissus autres que le tissu adipeux participe à la perte de sensibilité à l'insuline des tissus concernés. Cette infiltration lipidique du tissu musculaire entraîne un défaut de synthèse protéique en réponse à divers stimuli nutritionnels. L'une des voies de signalisation majeures impliquées dans la régulation de la synthèse protéique musculaire est la voie mTOR (mammalian target of rapamycin), dont le rôle principal est de contrôler l'initiation de la traduction des ARNm, étape limitante dans la synthèse protéique, en réponse aux stimuli nutritionnels. L'activation ou l'inhibition de cette étape se fait via les protéines 4EBP1 et 4EBP2, dont l'activité est contrôlée par la voie mTOR, et dont la fonction est d'inhiber la synthèse protéique en absence de stimuli.

L'objectif spécifique de cette étude *in vivo* est de mesurer l'impact de la délétion des protéines 4EBP1 et 4EBP2 sur la synthèse protéique et l'activité mitochondriale musculaire dans un contexte de fonte musculaire associée au vieillissement (sarcopénie). Des études ont montré que la délétion de ces protéines stimulait la synthèse protéique de cellules en culture et impactait la biogenèse mitochondriale. Notre hypothèse est que la délétion de ces protéines permet le maintien de la synthèse protéique musculaire et protège en partie le muscle des altérations mitochondriales survenant au cours du vieillissement. Pour répondre à l'objectif de notre étude, qui ne peut se faire que chez l'animal (règle des 3R : Remplacer), nous souhaitons mettre en place un protocole utilisant des souris génétiquement modifiées n'exprimant pas les protéines 4EBP1 et 4EBP2 (4EBP1/2 DKO). Les souris mâles adultes seront séparées en 2 groupes distincts (sauvages et 4EBP1/2 DKO) et utilisées à 6 ou 24 mois. A cet âge, 20 animaux par groupes seront abattus : 10 animaux à jeun et 10 animaux en période post-prandiale. Des études antérieures ont montré que la mortalité est d'environ 50% pour atteindre l'âge de 24 mois, aussi prévoyons nous de doubler le nombre de souris pour obtenir l'effectif nécessaire au bout de 24 mois. Le total de souris sera donc de 60 souris WT et 60 4EBP1/2 DKO, soit 120 souris. Les souris mâles adultes seront séparées en 2 groupes distincts (sauvages et 4EBP1/2 DKO) et utilisées à 6 ou 24 mois. A cet âge, 20 animaux par groupes seront abattus : 10 animaux à jeun et 10 animaux en période post-prandiale. Des études antérieures ont montré que la mortalité est d'environ 50% pour atteindre l'âge de 24 mois, aussi prévoyons nous de doubler le nombre de souris pour obtenir l'effectif nécessaire au bout de 24 mois. Le total de souris sera donc de 60 souris WT et 60 4EBP1/2 DKO, soit 120 souris (règle des 3R : Réduire). Nous comparerons les mesures effectuées durant les phases pré- et post-prandiales, puisque de nombreux travaux démontrent que la synthèse protéique musculaire est principalement altérée en phase post-prandiale, et proviendrait d'un défaut de réponse à l'action anabolique des nutriments et hormones associés à la prise alimentaire.

L'ensemble des résultats obtenus nous permettra de mesurer l'impact d'une dérégulation ciblée de la voie mTOR (délétion des protéines 4EBP1/2) sur le métabolisme protéique musculaire au cours du vieillissement.

Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront les plus appropriées pour éviter ou pour réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durable que pourraient ressentir les animaux (règle des 3R: Raffinement).

L'animalier observera quotidiennement le comportement général de l'animal, son apparence et contrôlera la présence d'eau et de nourriture pour chaque souris. Toute observation anormale sera transmise à l'expérimentateur. De plus, les animaux seront pesés et un contrôle de consommation sera réalisé une fois par semaine. Lors de la pesée, l'animalier observera l'état général de l'animal, notera sur le cahier de suivi et informera l'expérimentateur de toute observation anormale. Si la présence d'un critère grave (mutilation, tumeur, perte de poids >20% en quelques jours), ou en présence de trois critères notables (manque de toilettage, piloérection, posture anormale, hypoactivité, agressivité, vocalisation spontanée, maigreur avec ou sans manipulation), le responsable de l'étude sera consulté. En cas de possibilité de soins et/ou en l'absence de risque de perturber les résultats de l'étude, l'animal sera réintégré à l'étude après sa guérison.

La présence d'un critère grave ou de critères notables ne présentant pas de possibilité de soins entraînera l'euthanasie de l'animal concerné.

4197. Le microbiote humain est composé de milliards de cellules, et de nombreuses études ont montré qu'une altération du microbiote intestinal pouvait être associée à différentes pathologies dont le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII). Le SII est une colopathie chronique fonctionnelle touchant jusqu'à 15% de la population européenne et altérant significativement la qualité de vie des malades. Il s'agit d'une pathologie multifactorielle associant notamment un déséquilibre du microbiote intestinal ou dysbiose, se traduisant par une augmentation et/ou une diminution de certaines populations bactériennes, une hypersensibilité viscérale et une augmentation de la perméabilité intestinale. D'autre part, bien qu'étant le parasite intestinal le plus fréquemment retrouvé chez l'Homme (5 à 15% de la population française), *Blastocystis* reste négligé du fait de l'incertitude quant à son rôle en santé humaine, entraînant une prise en charge thérapeutique des patients limitée, et cela malgré de récentes études épidémiologiques rapportant de fortes prévalences de *Blastocystis* chez les patients souffrant du SII. Ainsi, dans une étude préliminaire, nous avons pu montrer que la prévalence de *Blastocystis* pouvait atteindre 23,2% chez les patients SII contre 16,1% dans une population contrôle. Jusqu'à présent, très peu de travaux se sont intéressés aux interactions entre parasites et flore bactérienne au sein du microbiote intestinal. Des études préliminaires semblent pourtant montrer l'existence d'un « dialogue » entre les bactéries et certains parasites tels que *Entamoeba histolytica* ou *Giardia intestinalis*.

Les objectifs de ce projet sont (1) d'étudier l'impact d'une souche rongeur de *Blastocystis* (fréquemment retrouvé chez l'Homme) sur le microbiote intestinal du rat, et (2) de mesurer les altérations de la barrière intestinale associée à cette infection. Ainsi, nous commencerons l'étude avec un groupe de 40 rats (20 mâles, 20 femelles) afin d'établir la quantité nécessaire de *Blastocystis* pour permettre l'infection. Nous comparerons ensuite 2 groupes de rats : des rats indemnes de la parasitose comparativement à des rats expérimentalement infectés par *Blastocystis* (sous-type 4, ST4), chaque groupe comptant 30 sujets (15 mâles, 15 femelles) afin d'obtenir des données statistiquement exploitables et de voir une éventuelle différence de sensibilité entre mâles et femelles, ce qui a été montré dans certaines études épidémiologiques chez l'Homme. Ce travail reposera sur une approche multidisciplinaire utilisant les outils de séquençage à haut débit (métagénomique, métatranscriptomique) et des mesures physiologiques (hypersensibilité viscérale, perméabilité intestinale).

Ce projet s'inscrit comme pionnier dans l'étude des interactions entre parasites et flore digestive, et des conséquences de ces interactions dans la physiopathologie du SII.

De plus, ce projet est conforme aux exigences éthiques en matière d'expérimentation animale. En effet, (1) les expérimentations sont organisées de façon à obtenir des résultats statistiquement exploitables avec le plus petit nombre d'animaux possible. (2) Les expérimentations et la méthodologie sont optimisées afin de réduire l'inconfort, la douleur ou l'angoisse subies par les animaux (soin porté à l'amélioration des conditions d'élevage et d'hébergement, enrichissement du milieu pour les

animaux en bas âge). De plus, les modèles animaux sont choisis avec pertinence afin de répondre à la problématique posée. (3) Le recours à l'animal est indispensable afin de pouvoir évaluer le niveau de sensibilité viscérale puisqu'il n'existe pas d'alternative pour réaliser ces expériences.

4198 La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin caractérisée par un état d'hyperactivation du système immunitaire intestinal et évoluant par poussées aiguës entrecoupées de périodes de rémission. La MC fut décrite pour la première fois en 1932 par Burill B. Crohn, médecin américain, qui donna son nom à la maladie. Bien que tous les segments du tractus gastro-intestinal puissent être affectés, les sièges préférentiels des lésions caractéristiques de la MC sont l'iléon terminal, le côlon et l'anus. Cette pathologie touche majoritairement l'adulte jeune (15-30 ans) et a un fort impact sur la vie personnelle et professionnelle des malades en raison de la fréquence des poussées, des complications, et du recours à la chirurgie. L'incidence annuelle moyenne de la MC varie de 0,7 à 14,6 pour 100 000 habitants. En effet, l'incidence de la MC observée dans les pays situés au nord de l'Europe est plus importante (par exemple, Grande Bretagne : 11,1 et Suède : 8,9) que celle enregistrée dans les pays du Sud de l'Europe (par exemple, Grèce : 0,9 et Italie : 2,3). Le nombre de patients s'élève environ à 1 million aux Etats Unis et 1 million en Europe dont 120 000 cas en France.

L'étiologie de la MC reste à ce jour mal connue. Toutefois, les études cliniques et épidémiologiques ont permis de montrer qu'elle est multifactorielle faisant intervenir des facteurs environnementaux, des facteurs génétiques et des agents infectieux. L'implication des bactéries *Escherichia coli* dans la MC est suspectée depuis de nombreuses années. Les *E. coli* colonisent anormalement les lésions iléales aiguës et chroniques de patients atteints de la MC (représentant jusqu'à 100% de la flore totale aéro-anaérobie) comparativement aux témoins. Ces *E. coli* colonisant la muqueuse des patients représentent un nouveau pathovar nommé AIEC pour « adherent-invasive *E. coli* ». La prévalence des souches AIEC est plus importante chez les patients atteints de la MC par rapport à des sujets sains, avec des valeurs respectives de 36,4% contre 6,2%. Ces bactéries sont capables d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales et de se multiplier en macrophages induisant une forte réponse inflammatoire. Par ailleurs, la protéine CEACAM6, anormalement exprimée à la surface des cellules épithéliales intestinales des patients atteints de la MC, sert de récepteur pour les bactéries AIEC. Enfin, les AIEC induisent une forte inflammation intestinale dans un modèle de souris transgéniques exprimant le récepteur CEACAM6 humain.

L'autophagie est un processus biologique nécessaire au maintien de l'homéostasie cellulaire et au renouvellement des organites cellulaires. De plus, l'autophagie participe à la réponse immunitaire innée et adaptative de l'hôte vis-à-vis des pathogènes et pourrait donc avoir un rôle clef dans la MC. Cette hypothèse a été renforcée par la découverte de mutations dans des gènes cruciaux de l'autophagie tels qu'ATG16L ou NOD2. De récentes études ont mis en évidence le rôle de la voie GCN2/eIF2alpha/ATF4 dans le contrôle de l'autophagie suite à une carence en acides aminées et que des bactéries pathogènes telles que *Shigella* ou *Salmonella* induise une carence en acides aminées, permettant ainsi l'activation de cette voie.

Il est clair depuis quelques années maintenant que les patients souffrant de la MC présentent des déséquilibres de la composition de la flore intestinale appelés dysbioses. Il a été rapporté chez ces patients une augmentation du nombre d'espèces potentiellement pro-inflammatoires ainsi qu'une diminution du nombre d'espèces potentiellement anti-inflammatoires. Etant donné l'importance la voie GCN2/eIF2alpha/ATF4 dans le contrôle direct ou indirect de la prolifération bactérienne, nous avons émis l'hypothèse que son défaut d'expression pouvait entraîner une dysbiose et ainsi participer à l'apparition d'un terrain pro-inflammatoire.

Le présent projet vise à étudier le rôle de GCN2 dans la susceptibilité de l'hôte à l'infection par des AIEC et le contrôle de la composition du microbiote intestinal en réponse à l'infection par des AIEC, ainsi que l'effet d'une complémentation en acides aminées sur la susceptibilité de l'hôte à l'infection par des AIEC. Pour cela, nous disposons d'un modèle de souris dont l'expression de GCN2 a été génétiquement modifiée que nous allons infecter après leurs avoir données ou non une alimentation riche acides aminés. Un maximum d'échantillon sera prélevé sur chaque animal inclus dans le ce projet afin d'optimiser son utilisation. En accord avec la règle des 3R et afin d'avoir des résultats statistiquement relevant, nous utiliserons des lots de 10 souris, soit un total de 160 souris pour l'ensemble des expérimentations. Enfin, pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, un contrôle quotidien sera mis en place et le cas échéant des mesures appropriées seront utilisées (à savoir injection de paracétamol pour limiter la douleur ou mise à mort des animaux si une perte de poids supérieur à 10% du poids initiale est détectée).

4199 Le gène *Bin1* a été mis en évidence comme le second facteur de risque de la maladie d'Alzheimer. Les travaux *in vitro* et *in vivo* réalisés ont montré une interaction entre *Bin1* et *Tau*. Aussi une souris transgénique (*Hbin1*) exprimant le gène *Bin1* humain sous le contrôle de ces propres régions régulatrices a été réalisée. Cette souris est dans un fond génétique C57Bl6N. Nous savons que l'inactivation du gène *Bin1* chez la souris entraîne sa mort à la naissance. Dans un premier temps nous voulons caractériser cette souris et obtenir si possible des animaux homozygotes pour *Bin1*. Cette étude portera sur 400 souris et sera réalisée sur des animaux de 2-3 mois et de 6-7 mois.

Afin de réduire le nombre d'animaux nous travaillerons également sur des cultures de cellules neuronales isolées à partir d'animaux adultes. Pour réduire le stress lors de la réalisation de certaine procédure telle que la procédure 3 les animaux auront une phase d'entraînement. Les procédures invasives ou terminales nous utilisons des anesthésiques afin d'éviter toute douleur inutile. Chaque procédure impliquée dans ce projet a un point limite défini au préalable afin d'éviter toute souffrance inutile aux animaux. Les animaux inclus dans ce projet sont observés régulièrement afin de vérifier l'absence de signes de souffrance (perte de poids, piloerection, dos rond, démarche anormale, pâleurs des extrémités, automutilation, isolement lethargie, vocalisation anormale).

4200 La population des pays économiquement développés vieillit. Ainsi, la proportion des 60 ans ou plus passera à 26 % en 2020 et à 35 % en 2050. Le vieillissement est caractérisé par le déclin de nombreuses fonctions biologiques réduisant la qualité de vie et augmentant la dépendance et la surmorbidity. Parmi ces altérations, la fonte musculaire (sarcopénie) se caractérise par une perte de la masse, de la qualité et de la force des muscles squelettiques. C'est la raison pour laquelle la carence protéique doit être évitée chez la personne âgée. Au-delà de l'aspect quantitatif, l'association des protéines à des nutriments non protéiques (fibres alimentaires par exemple) peut faciliter ou limiter leur assimilation et leur utilisation. Le vieillissement s'accompagne d'une augmentation des besoins protéiques mais nécessite également de contrôler les apports en acides gras saturés et cholestérol et d'optimiser les apports en micronutriments. Dans cette situation, une source protéique végétale à la fois riche en protéines et en micronutriments, de bonne qualité nutritionnelle, facilement et rapidement digestible est potentiellement intéressante. Nous évaluerons l'impact d'une telle protéine végétale associée ou non à une fibre alimentaire sur la rétention azotée tissulaire ainsi que la masse et le métabolisme protéique des muscles squelettiques chez des rats âgés. Sur la base de notre expérience et en conformité à la règle des 3R, le nombre d'animaux est limité à la quantité minimale suffisante pour atteindre les objectifs. Nous utiliserons au total 100 animaux. Des mesures de Raffinement seront prises pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux. Ainsi, l'état général de l'animal sera observé quotidiennement et noté sur le cahier de suivi. L'expérimentateur sera informé de toutes observations anormales. Si un animal présente 3 points limites notables ou 1 point sévère selon un tableau adapté à l'étude, il sera pris une décision afin de limiter la douleur à son maximum.

Les résultats obtenus nous permettront de mieux comprendre l'effet de cette protéine végétale associée ou non à une fibre alimentaire particulière sur le développement des modifications du métabolisme protéique musculaire chez le rat âgé sarcopénique.