



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

Résumés non techniques des projets autorisés (42)

4201 Ce projet vise à faire émerger une voie totalement novatrice dans la compréhension des phénomènes adaptatifs de notre cerveau en réponse à des modifications de nos expériences sensorielles et motrices, qu'elles soient d'origine physiologique (activité physique, sédentarité, vieillissement...), pathologique (maladies neurodégénératives...) ou traumatique (alitement prolongé, plâtre, amputation, para- ou tétraplégie...). Notre intérêt se porte sur une modification post-traductionnelle, la O-GlcNAcylation, dont le rôle dans la plasticité corticale n'a jamais été considéré à ce jour. Certaines données suggèrent en effet que la O-GlcNAcylation pourrait jouer un rôle crucial dans les mécanismes moléculaires à l'origine de la plasticité corticale.

L'objectif principal de notre projet est donc d'identifier l'ensemble des protéines synaptosomales du cortex cérébral dont les taux de O-GlcNAcylation sont modifiés suite à une restriction sensorimotrice ou après une phase de récupération variable. Le second objectif sera de déterminer si ces marqueurs sont impliqués dans la plasticité cérébrale.

Nous pensons qu'une meilleure compréhension des mécanismes de plasticité corticale pourrait aider à prévenir d'une part les effets délétères de l'hypoactivité ou de maladies neurodégénératives sur le système nerveux, et d'autre part les perturbations qui en découlent, telles que les chutes, et leurs conséquences : pertes d'autonomie, altération de la qualité de la vie, augmentation de la morbidité et de la mortalité.

Une première étude nécessite d'utiliser 7 groupes de rats. La seconde partie du projet sera réalisée sur 6 groupes animaux. Le nombre d'animaux par groupe, déterminé par une analyse de puissance, est estimé à 10 rats. Ce nombre a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de résultats satisfaisants (différences statistiquement observables entre les animaux traités et les animaux contrôles).

En comptant en outre quelques animaux pour optimiser le protocole expérimental, nous estimons le nombre total d'animaux nécessaires à 140 au maximum. Dans tous les cas, l'ensemble des procédures expérimentales seront réalisées en limitant au maximum (durée et intensité) toute douleur et/ou stress pour les animaux.

4202 Lors de cette étude, nous caractériserons le phénotype d'un nouveau modèle de souris pour le syndrome d'Ohtahara. Ce syndrome est une encéphalopathie épileptique précoce (EEP). Les EEP sont un type très sévère d'épilepsie du nourrisson. Elles sont caractérisées par une activité épileptique associée à de fréquentes crises survenant durant les tous premiers mois de vie (avant l'âge de trois mois). Chez ces enfants, le tracé électro-encéphalographique est très altéré, et dans les cas les plus extrêmes, il peut présenter un profil dit de "suppression-burst" où l'activité électrique globale du cerveau semble s'interrompre pendant plusieurs secondes entre des périodes d'orage cérébral. Cette activité épileptique est accompagnée d'une détérioration rapide des fonctions cognitives, sensorielles et motrices. Le syndrome d'Ohtahara est l'une des formes les plus sévères d'EEP. Il n'existe pas de traitement efficace et les bases physiopathologiques de la maladie restent mystérieuses. Des mutations dans plusieurs gènes sont responsables du syndrome d'Ohtahara chez l'Homme. Le gène *Kcnq2* est l'un des gènes les plus fréquemment impliqués. Notre projet visera à caractériser le phénotype neurologique d'une souris chez laquelle une mutation faux-sens responsable d'un syndrome d'Ohtahara typique a été introduite dans le gène *Kcnq2* de souris. Il s'agit d'un projet principalement descriptif (au niveau de l'organisme entier et des tissus cérébraux), basé sur le nombre minimal d'animaux (48) permettant d'espérer un résultat statistiquement significatif pour valider le modèle murin comme modèle pré-clinique pour cette pathologie. Les animaux seront hébergés en groupe (au minimum 2 animaux), en présence d'un dôme leur permettant de s'y cacher, avec accès non restreint à la boisson et à la nourriture, afin de limiter leur stress au maximum.

4203 La dégénérescence rétinienne est impliquée dans des situations Cliniques courantes comme par exemple la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), les rétinopathies pigmentaires (RP), la rétinopathie diabétique (RD). Elle est caractérisée par une disparition lente et progressive des cellules photoréceptrices de la rétine. Ces cellules sont responsables de l'absorption de la lumière et de la transformation du signal lumineux en un signal électrophysiologique qui sera transmis au cerveau. Les cellules photoréceptrices sont les cellules à l'origine du signal visuel et par conséquent leur perte conduit à une perte de vision qui à terme peut aboutir à la cécité. Le stress oxydatif a été mis en évidence dans le développement et/ou la progression des lésions conduisant à la dégénérescence rétinienne. C'est pourquoi, dans le cadre de ce projet nous prévoyons d'évaluer l'effet protecteur de nouveaux antioxydants de type nitroène (3 molécules testées à 2 concentrations différentes et 3 voies d'administration différentes) contre la mort des cellules photoréceptrices sur un modèle expérimental chez le rat. 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. Afin de mener à bien ce

projet, nous utiliserons en moyenne 320 rats par an. De plus, il est à noter que les mesures nécessaires seront prises pour réduire la douleur, la souffrance et l'anxiété des animaux tout au long du protocole.

4204 Les cancers de la peau sont parmi les plus fréquents des cancers avec près de 60 000 nouveaux cas par an en France. Les carcinomes squameux représentent 90% de ces cancers. Grâce à un modèle de culture en trois dimensions permettant de mimer l'interaction derme – épiderme, nous avons identifié *in vitro* les canaux calciques CaV1 comme acteur majeur de l'invasion collective des carcinomes squameux (CS). De nombreuses publications ont décrits ces cultures appelées organotypiques comme une méthode de remplacement pour l'étude de l'invasion tumorale. Cependant, elles ne récapitulent pas toute la complexité de l'organe, c'est pourquoi nous aurons maintenant recours à des animaux.

Nous avons démontré *in vitro* que l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques comme le verapamil et le diltiazem, déjà utilisés chez l'homme notamment dans l'hypertension, bloque l'invasion des cellules tumorales dans la matrice environnante. De plus, nous avons constaté que l'invasion des CS est dépendante du remodelage matriciel effectué par les fibroblastes associées aux carcinomes (FACs). Ce remodelage induit une rigidification de la matrice extracellulaire qui entraîne l'augmentation de l'expression des canaux CaV1. L'objectif principal de ce projet est d'évaluer *in vivo* l'effet du verapamil, du diltiazem et du BAPN, inhibiteur du remodelage matriciel, dans un modèle de carcinome cutané induit chimiquement. Pour cela, nous utiliserons des souris FVB/N âgées de 7 à 9 semaines. Pour les besoins de l'étude 4 lots de 6 souris (réalisé 2 fois) seront traitées avec du DMBA (7,12-diméthylbenz[a]-anthracène) à J0 et J42 sur la peau du dos, avec une application bihebdomadaire de TPA les semaines 2 à 6 puis 9 à 30. Les souris seront traitées à partir de la semaine 15, soit juste avant l'apparition des premiers CS. Le traitement s'effectuera par l'eau de boisson avec : le véhicule (lot 1 : souris contrôles), du verapamil (lot 2), du diltiazem (lot 3), ou du BAPN (lot 4).

Cette étude permettra de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de patients atteints de carcinomes squameux. Le suivi des animaux sera quotidien et effectué dans le respect du bien-être animal, avec palpation et mesure de la taille des tumeurs. Il sera assuré grâce à une fiche de score qui permettra de surveiller l'état des animaux (apparence générale, comportement, présences de lésions, progression tumorale, poids) avec une évaluation objective des points limites. Les souris seront sacrifiées à 30 semaines après l'initiation de la carcinogénèse par le DMBA (J0) ou lorsqu'un point limite sera atteint. Les points limites sont définis en annexe, notamment par une taille de tumeur de 17mm atteint ou une ulcération de la tumeur. Cette expérience permettra d'élucider le rôle potentiel anti-tumoral des inhibiteurs du remodelage matriciel et de l'activité calcique au cours de la carcinogénèse cutanée. Le nombre total d'animaux utilisés au cours de ce protocole a été évalué à 48 grâce à la méthode dite de Monte Carlo et calculé pour avoir un nombre minimum, nécessaire et suffisant pour les analyses statistiques adéquates.

4205 La surexpression dans les tumeurs pulmonaires de certains ligands a un effet anti-apoptotique en se fixant sur leurs récepteurs et favorisant ainsi le développement des tumeurs du poumon. Ce projet a pour but de tester les effets d'un médicament candidat antagoniste de l'interaction entre l'un de ces ligands et ses récepteurs. L'objectif est d'évaluer si notre molécule touche les cellules tumorales à caractère souche responsables des récidives, qui sont peu présentes dans la tumeur primaire (d'où la faible efficacité de régression) mais qui sont responsables des récidives.

Pour cela, deux expérimentations seront nécessaires. La première, objet de la présente demande pour valider la faisabilité dans laquelle nous aurons recours à 14 souris. Si, la première expérimentation est positive quant à la faisabilité alors nous effectuerons une seconde expérimentation sur des groupes statistiquement représentatifs et recevant soit le candidat-médicament soit un placebo. Nous aurons alors recours à une nouvelle demande d'autorisation d'expérimenter. Cette expérimentation est programmée suite à des travaux préliminaires sur culture cellulaire. Cependant les modèles actuels ne permettent pas d'étudier les propriétés métastatiques des tumeurs sans avoir recours à l'animal. Afin de d'optimiser le recours à l'animal nous effectuons une première expérimentation avec un faible nombre d'animaux pour vérifier la validité du concept.

Cette demande concerne donc 14 souris qui seront hébergées dans une animalerie conforme à la législation et à l'éthique d'hébergement des animaux de laboratoire.

4206 La sclérose en plaque (SEP) est une maladie très invalidante, auto-immune et définie par la destruction de la gaine (gaine de myéline) entourant le bras principal des neurones (axone) dans le système nerveux central. Des données préliminaires du laboratoire suggèrent un rôle protecteur de notre molécule d'intérêt "A" via sa fixation sur un type particulier de cellules de soutien des neurones, les astrocytes réactionnels. Dans ce projet, nous nous proposons de tester un sous type de molécule A recombinée pour en améliorer l'efficacité.

Pour cela nous utiliserons un modèle murin de SEP induite appelé EAE (encéphalite auto-immune) et bien décrit dans la littérature scientifique.

Nous nous proposons d'étudier :

1-l'effet de l'injection répétée de notre molécule recombinée sur le développement de l'EAE (encéphalomyélite auto-immune expérimentale).

2-Le rôle des récepteurs naturels principaux dans l'efficacité de notre composé.

La règle des 3R a été appliquée déjà en amont de cette demande car de nombreuses molécules recombinées ont été écartées par des tests *in vitro* pour finalement n'en garder qu'une dont nous allons pousser l'évaluation grâce aux procédures de la présente demande d'autorisation. En outre pour mettre en œuvre notre projet de recherche, nous utiliserons le nombre minimum mais suffisant

d'individus pour que l'expérimentation soit significative. Enfin, la mise en œuvre de cette demande se fera en conformité avec la législation et les règles éthiques en vigueur relatives au bien-être animal et à la prise en charge de la douleur.

Nous prévoyons d'utiliser 576 souris.

4207. A l'aide d'approches cellulaires (lignées) in vitro et moléculaires, nous avons démontré le bénéfice thérapeutique de la combinaison de deux molécules chimiques pour éliminer les cellules tumorales. Ces deux molécules ont une Autorisation de Mise sur le marché (AMM) et sont déjà utilisées en clinique mais elles n'ont jamais été combinées. Nos travaux apportent de nouveaux arguments scientifiques en faveur d'un usage combiné de ces molécules dans le traitement des patients présentant un cancer.

Nos données en laboratoire montrent que la molécule n°1 augmente fortement la sensibilité des cellules tumorales à molécule n°2 qui meurent toutes en présence de doses relativement basses des deux molécules combinées. Ces résultats ouvrent des perspectives thérapeutiques intéressantes dans le cancer. En effet, la molécule n°1 à forte dose est très toxique pour les patients et cause des pathologies secondaires parfois irréversibles (ex. perte d'audition, stérilité et/ou maladie cardiaque). Notre projet vise à confirmer in vivo le potentiel anticancéreux d'une combinaison de ces deux molécules dans le modèle souris et ce, par comparaison avec chaque molécule utilisée seule. Pour cela, nous utiliserons un modèle de xénogreffe sous-cutanée de cellules tumorales humaines chez la souris qui reproduit la pathologie cancéreuse humaine.

Pour réaliser l'ensemble de nos expériences, nous demandons l'utilisation de 80 animaux. Dans le respect de la règle des 3R, un seul lot contrôle (souris traitées avec solvants sans les molécules) sera comparé aux trois lots Tests (Molécule N°1 seule, Molécule N°2 seule, et combinaison des deux) afin de réduire le nombre global d'animaux. Pour les mêmes raisons, cette étude se fera de façon longitudinale sur les mêmes animaux, sans en inclure d'avantage au cours de l'expérimentation. Le design expérimental est clair, simple et bien anticipé. Le nombre de 20 souris/lot sera suffisant pour réaliser des analyses statistiques solides et fiables, sans avoir besoin de réitérer l'expérience. En ce qui concerne la notion de « Remplacement », des études préliminaires sur cultures cellulaires ont été réalisées et ont largement validé l'effet antitumoral de ces deux molécules utilisées seules ou en combinaison. A cette étape de l'étude et avant transfert de nos résultats vers l'industrie et la clinique, l'utilisation d'animaux (souris) est indispensable.

Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance jusqu'à leur mort. Toute procédure légère ou moyenne (aucune sévère prévue dans ce projet) sera réalisée sous anesthésie générale et sous surveillance attentive des animaux dans un environnement enrichi et adapté aux animaux. L'estimation de la souffrance sera réalisée quotidiennement par le personnel de l'animalerie selon un score basé sur des points limites bien définis dans le dossier technique. Au-delà d'un score maximal, l'animal sera sorti de l'expérience sans attendre.

4208. En pratique médicale, la reconstruction tissulaire « ad integrum » reste un challenge malgré les techniques de transfert microchirurgicaux ou les greffes autologues d'adipocytes. Dans le cas des reconstructions mammaires, plusieurs traitements chirurgicaux peuvent être proposés : la plus connue est la prothèse de silicone qui reste un corps étranger qu'il faut changer régulièrement. L'alternative est le lipofilling : remplissage progressif des zones déletées grâce à des cellules adipeuses provenant de la patiente, qui présente l'avantage d'être « physiologique » puisque le tissu adipeux du patient sert de greffe. Cependant, même en ne greffant que des couches fines de graisse autologue, la survie cellulaire ne dépasse pas 70 %, suite probablement à un défaut de vascularisation. C'est pourquoi, la technique de lipofilling, rendue possible en 2007 dans le tissu mammaire, est devenue très courante mais reste relativement lourde car nécessitant plusieurs temps opératoires.

L'objectif du projet est d'améliorer la méthode actuelle pour les transferts adipeux de gros volumes (> 200 ml), en créant une structure transitoire associant tissu autologue et matière synthétique ne nécessitant qu'une seule intervention « définitive ».

Le regroupement des équipes de chirurgie plastique, de biologie cellulaire de la Banque de tissus ainsi que d'une entreprise privée du textile collaborante, a permis de proposer un structure mixte constituée d'une matrice synthétique biodégradable et de tissu adipeux, créant ainsi une « prothèse » qui deviendra physiologique après dégradation du tissu synthétique. Après sélection de la meilleure matrice proposée par l'entreprise, les résultats des données in vitro sont très prometteurs et nécessitent rapidement la confirmation par des études in vivo, sur le porc.

Le nombre d'animaux sera limité à 10 pour pallier aux variabilités interindividuelles. Le suivi sera pendant 3 mois : clinique par l'évaluation quotidienne de paramètres comportementaux, de l'aspect des poils, et de paramètres physiologiques (poids, température, rythmes cardiaque et respiratoire), et paraclinique par 3 IRM à J15, J45 et J90. Pour diminuer le nombre d'animaux nécessaires, chaque animal comportera jusqu'à 4 conditions expérimentales, dont 2 témoins. Les animaux seront testés 2 par 2 pour éviter toute étude inutile, afin d'optimiser les meilleurs prothèses et la meilleure méthode de mise en place à chaque expérimentation en fonction du résultat précédent.

4209. Les réseaux neuronaux de l'hippocampe sont cruciaux pour les fonctions cérébrales supérieures telles que les processus d'apprentissage et de mémoire et la gestion des états affectifs. Ces processus et états sont essentiels à l'adaptation de chaque individu à son environnement en perpétuel changement, contribuant ainsi à la perpétuité de l'espèce.

De nombreux travaux chez l'homme et le rongeur ont pu montrer que les fonctions mnésiques et les états affectifs se mettent en place progressivement au cours du développement, mais les relations entre l'ontogénèse de ces comportements et celle des structures cérébrales qui les soutiennent restent peu connues. Dans ce contexte, notre but est de déterminer le rôle des différentes populations de neurones granulaires du gyrus denté de l'hippocampe dans les fonctions mnésiques, les états affectifs (anxiété) et les comportements sociaux.

Pour cela, nous proposons de manipuler l'activité des neurones granulaires issus de différentes vagues neurogéniques et d'en étudier les conséquences au niveau comportemental.

Cette étude sera menée sur des souris génétiquement modifiées qui expriment un transgène permettant d'inactiver spécifiquement les cellules d'intérêt (souris *nestin-CreERT2 x CHRM4*) après étiquetage. Brièvement, les cellules seront étiquetées durant la période embryonnaire (E17.5), la période néonatale (P7 ou 1sem), la période juvénile (~P24-26 ou 4 semaines), l'adolescence (~P45 ou 6 semaines) ou à l'âge adulte (~P70 ou 10 semaines) et leur activité sera inhibée lorsqu'elles auront 6 semaines, soit chez des animaux âgés de 6 à 16 semaines. Les conséquences de cette inhibition seront analysées sur les processus mnésiques, les états affectifs et les interactions sociales en utilisant des lots différents d'animaux pour chaque dimension comportementale testée. Nous estimons le nombre d'animaux nécessaires à 686 souris.

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous utiliserons autant que possible les mêmes animaux pour plusieurs tests comportementaux. Afin de raffiner au mieux nos approches expérimentales, nous utiliserons des tests basés sur le comportement exploratoire naturel de l'animal et non invasifs, et prendrons un soin particulier à l'observation des animaux et à leurs conditions d'hébergement.

4210. La Bretagne est un des plus riches gisements d'algues au monde, unique en Europe, avec près de 600 espèces répertoriées et plus de 300 000 tonnes valorisables annuellement. Parmi elles, certaines macro-algues sont composées de molécules dotées de qualités nutritives et sanitaires. Plusieurs molécules bioactives dérivées d'algues entrent d'ailleurs dans la composition de produits déjà commercialisés. Ce projet a pour objectif global de définir des couples molécules / effets biologiques actifs afin de produire une gamme d'extraits algaux ciblant 3 filières : animaux de rente, animaux de compagnie et nutrition humaine. Il comporte i) une phase technologique visant à développer des procédés d'extraction à haut rendement et éco-efficaces des molécules d'intérêt présentes dans les algues vertes, rouges et brunes ii) une phase de tests et de validation *in vitro* et *in vivo* visant à déterminer les propriétés d'intérêt conférées par les composés algaux (immuno-modulation, antimicrobien, effet probiotique, satiété, ...). Dans le cadre du volet piscicole de ce programme, des essais expérimentaux seront réalisés chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). L'état de santé du poisson alimenté par les différents extraits d'algues sera évalué de manière globale suite à une phase d'imprégnation aux différents composés. Pour ce faire, une procédure expérimentale sera menée dans le respect de la règle des 3R, à savoir la réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique et le raffinement des conditions d'hébergement. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions d'hébergement limitant le mal-être potentiel des animaux (volume d'eau adapté avec renouvellement en continu, rythme jour/nuit naturel, ...). En ce qui concerne le remplacement, il n'est pas envisageable, l'utilisation de la truite arc-en-ciel étant nécessaire puisque c'est une espèce-modèle en écophysiologie et qu'aucune méthode alternative n'a encore été développée pour réaliser ces travaux. Au total, 1650 alevins serviront à l'évaluation de l'innocuité de cinq composés extraits d'algues. Le suivi du comportement individuel et l'analyse d'échantillons de sang prélevés lors de l'expérimentation animale permettront d'obtenir une évaluation complète des effets possibles des extraits d'algues chez la truite arc-en-ciel.

4211. Durant le choc septique, les dysfonctions cardiaques et vasculaires sont associées à une majoration de l'infiltration des tissus par des cellules mononuclées comme les macrophages et les monocytes. Ces cellules participent à l'amplification de l'inflammation locale et régionale. Les  $\beta_1$  et  $\beta_2$  adréno-récepteurs sont exprimés sur la majorité des cellules de l'immunité dont les monocytes et les macrophages. La modulation adrénérgique influence l'expression inflammatoire des lymphocytes. Ainsi, théoriquement, l'activation  $\beta_2$  est associée à une balance plutôt anti inflammatoire. A l'inverse une stimulation  $\beta_1$  sur les monocytes induit directement une réponse pro inflammatoire. Ces profils sont en pratique loin d'être aussi clairs.

L'hypothèse de ce travail est qu'une modulation  $\beta$  adrénérgique par un antagoniste des récepteurs  $\beta_1$  cardiosélectifs pourrait favoriser une réponse anti-inflammatoire et inhiber la réponse pro-inflammatoire. Ceci pourrait participer à l'explication des effets hémodynamiques favorables que l'on observe dans les études expérimentales et humaines.

Pour réaliser ce travail, nous évaluerons les fonctions cardiaque et vasculaire, la balance entre les cellules pro- et anti-inflammatoires infiltrant ces tissus, et les protéines inflammatoires synthétisés.

Pour répondre à notre hypothèse, trois groupes d'expérience sont définis. Pour la première et la deuxième expérience, dix groupes de huit souris dans chaque groupe sont prévus ; pour la troisième expérience sept groupes de quinze souris sont prévus. Compte tenu de la mortalité attendue avec ce type de protocole, de l'ordre de 25% à 40% sur les 24 premières heures, et la sévérité de la chirurgie, des souris supplémentaires sont inclus dans le calcul du nombre d'animaux nécessaires. Au total trois cent trente-deux souris seront nécessaires pour réaliser ce sujet.

La règle des trois R est incluse dans la méthodologie de ces expériences. Le calcul du nombre d'animal a été le plus strict possible. Le type d'animal utilisé est en parfaite adéquation avec l'objectif des expérimentations qui associe hémodynamique, mécanistique et survie. Pour chaque procédure expérimentale, des points limites ont été définis a priori et la prise en charge de la douleur, facteur hémodynamique confondant majeur par ailleurs, est prise en compte à chaque stade de chaque procédure. Nous maîtrisons bien les paramètres de milieux de vie, ceci permettant une acclimatation optimale à l'animalerie.

4212. Le diagnostic précis et précoce des tumeurs, ainsi que le développement de thérapies ciblées sont deux axes majeurs de développement en cancérologie. Dans ce contexte, les nanoparticules sont apparues comme des candidats prometteurs au cours des deux dernières décennies. En effet, les nanoparticules présentent de nombreuses propriétés qui améliorent à la fois leur détection par différentes techniques d'imagerie et permettent leur utilisation en thérapie après activation par des stimuli externes.

Dans ce cadre, nous développons des nanoparticules à base d'or et/ou d'oxyde de fer. Les premières études réalisées sur ces particules montrent qu'elles ne présentent pas de toxicité, qu'elles sont détectables par différentes techniques d'imagerie et qu'elles s'accumulent dans les tumeurs de manière passive.

Nous voulons maintenant étudier leurs propriétés thérapeutiques pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie et/ou de l'hyperthermie. Cette étude préclinique est nécessaire avant de pouvoir réaliser des essais cliniques chez l'homme. Il nous est donc impossible de remplacer le modèle animal par un modèle in vitro ou une simulation informatique.

Dans ce cadre, la souris Nude immunodéficiente représente le modèle le plus proche de la physiopathologie humaine, permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les souris sont hébergées dans un environnement contrôlé dépourvu de germes pathogènes qui permet qu'elles ne souffrent pas de leur défaut d'immunité.

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

Dans ce projet, nous travaillerons sur un modèle sous-cutané de mélanome, et nous utiliserons 280 souris.

D'après notre expérience, la réalisation d'études d'évaluation d'un effet thérapeutique nécessite 10 animaux par conditions expérimentales pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Ces conditions permettent 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.

4213. La maladie de Willebrand est une maladie hémorragique caractérisée par un compte plaquettaire très bas. Il a été découvert l'existence d'anomalie de la phase finale de la libération des plaquettes à partir des mégacaryocytes (MK) pouvant expliquer la chute du nombre de plaquettes. Cependant les mécanismes moléculaires de cette pathologie restent inconnus. Les malades Willebrand sont rares. De ce fait, un modèle murin est nécessaire pour comprendre cette pathologie. Ce projet a pour but scientifique porte sur l'étude des défauts de la mégacaryopoïèse dans un modèle murin reproduisant les caractéristiques de la maladie de Willebrand in vitro et in vivo pour expliquer la diminution du compte plaquettaire.

Pour respecter la règle des 3R :

Pour Réduire le nombre d'animaux : L'analyse statistique a montré qu'un total de 100 souris est nécessaire. Le sexe n'étant pas une variable dans cette pathologie, les mâles et les femelles seront utilisés.

Pour Raffiner : le modèle de la souris est le plus pertinent. Dans nos expériences les animaux recevront un anesthésiant et un analgésiant.

A leur actuelle, aucune technique in vitro et notamment de lignées cellulaires ne permet de reproduire toutes les étapes complètes de la mégacaryopoïèse et de la production des plaquettes. Ce modèle in vivo avec la mutation constitutionnelle est le premier modèle reproduisant la pathologie humaine.

4214. Le système immunitaire nous défend contre les infections et les tumeurs. Or, son activité doit être finement contrôlée afin de prévenir le développement des immuno pathologies, provoquées par une activation exacerbée du système immunitaire, telles que les maladies auto-immunes (ex. le diabète juvénile, la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde) ou inflammatoires chroniques (telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et l'asthme allergique). Le contrôle de la réponse immunitaire implique des mécanismes activateurs et inhibiteurs. Parmi les mécanismes activateurs se trouvent des processus qui modifient le type de la réponse immunitaire selon l'agression subie, par exemple des infections par des virus (le cas du SIDA), des bactéries (la tuberculose), ou encore par des parasites (le paludisme). Puisque ces mêmes types des réponses immunitaires peuvent provoquer des immunopathologies, il est important de connaître les mécanismes impliqués dans leur mise en œuvre. Normalement, ces immunopathologies sont prévenues par des sous-populations de globules blancs dits « régulateurs » avec activité immunosuppressive. L'ensemble de ces arguments montre l'importance de la compréhension de la régulation du système immunitaire afin de mieux comprendre les déficits du système immunitaire menant à une sensibilité accrue à des infections, à des immunopathologies et au développement du cancer. Une telle compréhension permettra aussi de développer des thérapies innovantes contre un grand éventail de pathologies.

Notre laboratoire étudie les mécanismes cellulaires et moléculaires qui contrôlent la différenciation et les fonctions intra-thymiques et périphériques de la population des globules blancs qui contrôlent les réponses immunitaires, les lymphocytes T. Notre projet s'articule autour d'un axe de recherche principale :

Les mécanismes qui contrôlent la génération des lymphocytes T dans le thymus

Les lymphocytes T se développent dans le thymus et y peuvent déjà se différencier en cellules qui vont activer ou bien supprimer les réponses immunitaires. Des mécanismes complexes de sélection jouent un rôle très important dans le développement des lymphocytes T « activateurs » qui sont particulièrement adaptés à la défense de l'organisme contre les infections et le cancer et des lymphocytes T « suppresseurs » qui inhibent les réponses immunitaire afin de prévenir les immunopathologies. Nous avons récemment montré que, chez l'homme comme chez la souris, les lymphocytes T peuvent, après leur activation dans des réponses immunitaires, revenir dans le thymus et y modifier le développement des lymphocytes T. Notre projet vise à déterminer l'impact de ces lymphocytes T sur le développement des lymphocytes T activateurs et suppresseurs dans le thymus. Les conditions naturelles du développement des lymphocytes T dans le thymus ne peuvent pas être reproduites in vitro.

Nous appliquons la règle de trois R pendant la planification, la réalisation et l'analyse de nos expériences. Nous utilisons l'expérimentation animale seulement si la question posée est de relevance et si elle ne peut pas être adressée autrement. Le nombre d'animaux est calculé au préalable pour avoir de résultats qui sont statistiquement significatives et nous faisons appel à des experts

d'expérimentation animale pour la réalisation et le suivi des expériences. De que possible nous utilisons de méthodes alternatives in vitro ou in silico.

Pour ce projet de recherche fondamentale nous utiliserons 120 souris de laboratoire de deux souches différentes C57/BL6 (résistantes au développement des maladies auto-immunes) et NOD (développent spontanément le diabète de type 1).

4215. La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui affecte le système dopaminergique et qui touche près de 6,5 millions de personnes dans le monde. Les traitements pharmacologiques actuels permettent d'atténuer les symptômes, mais n'ont aucun effet curatif, ne permettent pas de ralentir le développement de la pathologie, entraînent des effets secondaires très gênants et leurs effets s'amenuisent au cours de l'évolution de la maladie. La stimulation cérébrale profonde, intervenant essentiellement à un stade avancé de la maladie de Parkinson, a également une action uniquement symptomatique. En conséquence, la neuroprotection dans la maladie de Parkinson est une piste importante de recherche, afin d'enrayer ou de ralentir la dégénérescence des neurones dopaminergiques.

Actuellement, le diagnostic de la maladie de Parkinson à un stade précoce reste difficile, car il est basé notamment sur les premiers signes moteurs qui interviennent lorsque 50 à 70% des neurones dopaminergiques ont dégénéré. Récemment des études illustrent l'implication d'un dysfonctionnement de la mitochondrie, petit organite qui assure une source d'énergie cellulaire via la production de l'ATP, dès les premiers stades de la neurodégénérescence de la maladie de Parkinson. La détection d'une baisse d'ATP cérébrale par imagerie, reflétant le dysfonctionnement mitochondrial, pourrait aider au diagnostic précoce de la maladie de Parkinson en constituant un biomarqueur.

Le présent projet vise, dans un premier temps, à développer la mesure de l'ATP cérébrale par imagerie (indolore), afin de valider une mise en évidence précoce de la maladie de Parkinson. Dans un second temps, les effets sur la production d'ATP d'une nouvelle thérapie neuroprotectrice, induite par un implant qui délivre une illumination proche infrarouge, seront évalués en vue d'une application clinique. Notre hypothèse est qu'une illumination proche infrarouge stimule la production d'ATP mitochondrial augmentant ainsi la quantité d'énergie cellulaire et la survie des neurones.

Dans cette optique, comme il n'existe pas de modèle ex vivo alternatif, nous mettrons au point la mesure de l'ATP cérébrale chez le rat, puis dans un second temps chez le primate pour assurer une extrapolation à l'application clinique, du fait de sa proximité anatomique et physiologique avec l'Homme. Le nombre d'animaux, provenant d'élevages reconnus, est réduit au maximum tout en assurant la validité statistique des résultats (n=50 pour le modèle rongeur et n=5 pour le modèle primate). Les études chez le rat permettront de réduire au maximum le nombre d'études chez le primate. Afin d'induire les symptômes de la maladie de Parkinson, les animaux seront exposés à une neurotoxine et traités ou non en parallèle avec l'illumination proche infrarouge. Tout est mis en œuvre afin que les animaux aient un niveau d'inconfort aussi limité que possible, et pendant une durée réduite. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long des expériences. Des points limites ont été définis afin de garantir le bien-être des animaux : l'observation d'un niveau de douleur élevé et/ou une perte de poids non contrôlable trop importante conduiront à alerter le vétérinaire en charge du bien-être des animaux qui mettra en œuvre des traitements appropriés ou décidera d'une euthanasie.

4216. La maladie de Parkinson est une dégénérescence chronique des neurones dopaminergiques qui touche près de 6,5 millions de personnes dans le monde. Sa prévalence dans les pays occidentaux augmente avec l'âge. Les complications de la pathologie conduisent à une augmentation de la mortalité, à une baisse de la qualité de vie et son caractère chronique induit de forts coûts de santé. Les thérapeutiques actuelles, dont la stimulation cérébrale profonde, permettent d'atténuer les symptômes, principalement moteurs, mais ne permettent pas d'arrêter ou de ralentir le développement de la maladie. En conséquence, la neuroprotection dans la maladie de Parkinson est une piste importante de recherche, afin d'arrêter ou de ralentir la neurodégénérescence.

Le diagnostic de cette maladie à un stade précoce est difficile à poser car les premiers signes moteurs interviennent lorsque 50 à 70% des neurones dopaminergiques ont dégénéré. C'est pourquoi une stratégie neuroprotectrice doit présenter des risques très limités car elle s'appliquerait à des patients présentant peu ou pas de déficiences motrices. De récentes études ont démontré l'effet neuroprotecteur de l'illumination proche infra-rouge (NIR) sur des cultures cellulaires ainsi que sur des modèles précliniques exposés à une neurotoxine (induisant la mort des neurones dopaminergiques et donc conduisant au développement de symptômes similaires à ceux de la maladie de Parkinson idiopathique).

L'objectif du projet est de développer, sur cette base, une nouvelle thérapie de la maladie de Parkinson, via un implant qui délivre une illumination NIR à action neuroprotectrice.

La présente étude vise à évaluer la diffusion de la température émise dans les tissus en fonction de la puissance délivrée par l'implant afin de déterminer la puissance maximale à ne pas dépasser pour ne pas induire d'échauffement en bout de sonde qui pourrait endommager les tissus. Après les études de simulation ex vivo, permettant de réduire au minimum nécessaire le nombre d'animaux, des données expérimentales seront nécessaires afin d'obtenir toutes les données fonction de l'anatomie. Ces mesures seront réalisées en premier chez le rat pour valider les études préalables de simulation avant d'utiliser un modèle primate, dont les similitudes anatomiques fortes permettent une extrapolation chez l'Homme. Si les mesures se révèlent inexploitables, ou si les résultats sont statistiquement fiables avec un nombre réduit d'animaux, la procédure sera arrêtée précocement réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés. L'étude chez le primate ne sera initiée qu'après validation de la méthode d'imagerie chez le rat. Des rats (n=10) et des primates (n=5), provenant d'élevages autorisés, seront imagés grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Les protocoles d'anesthésie ont été définis et validés par le vétérinaire en charge du bien-être des animaux et les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. L'application de critère d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe assurent le bien-être des animaux. En cas d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

4217. Dans le monde, le nombre de patients atteints d'une maladie neurodégénérative, comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, ou psychiatrique, comme la schizophrénie et la dépression, est estimé proche du milliard. L'allongement de la durée de vie est un facteur majeur d'augmentation de ce nombre. Le retentissement social pour les patients et leurs familles est considérable en raison des handicaps moteurs, intellectuels et psychiques qui en résultent. De ce fait, les conséquences économiques et sociales pour la collectivité sont très significatives.

Les symptômes comportementaux de ces maladies sont la conséquence d'altérations neurologiques complexes qu'il est possible de reproduire en partie chez la souris à la suite d'une altération de son génome, en modifiant son environnement, ou encore en lui administrant des molécules modifiant le fonctionnement du système nerveux. Ces souris sont des modèles pré-cliniques à forte valeur translationnelle à l'homme, qui permettent l'identification de nouveaux bio-marqueurs et de nouvelles cibles qui contribuent au développement de meilleurs traitements pour ces pathologies.

L'objectif de notre projet est d'utiliser ces souris pour : 1) confirmer l'intérêt du modèle en objectivant leurs déficits comportementaux, regroupables en 3 grandes catégories : fonction sensori-motrice (phénomènes sensoriels et motricité), cognitive (apprentissage et mémoire), et états émotionnels, 2) démontrer qu'il est possible de supprimer ces déficits par des approches thérapeutiques de référence/connues et 3) sélectionner les meilleurs traitements pharmacologiques (préalablement testés par des approches in vitro) en termes d'efficacité et de sécurité, et susceptibles d'être évalués ensuite chez l'homme. Les phases 1) et 2) permettront d'appréhender le nombre et la constitution des groupes d'animaux qui seront nécessaires pour la phase 3). Autrement dit, aucun animal ne sera utilisé pour des études d'efficacité si le modèle comportemental n'est pas validé préalablement.

Au total, compte-tenu de la variété des techniques d'induction de modèle pour mimer les pathologies humaines, du nombre de mesures comportementales envisagées, du nombre de cibles thérapeutiques qui seront étudiées, et de la nature de ces cibles (impliquées dans des maladies neurodégénératives ou psychiatriques), l'estimation du nombre de souris nécessaires sur les deux années prévues pour ce projet est de 6000.

Le but ultime du projet est de trouver des traitements pharmacologiques efficaces sur les pathologies du système nerveux, et plus spécifiquement sur les troubles cognitifs, sensori-moteurs ou émotionnels qui en résultent. Cette efficacité ne peut être vérifiée que sur l'animal. La souris est adaptée car son génome, sa physiologie et son répertoire comportemental se rapprochent de ceux de l'homme. De plus, c'est une espèce pour laquelle la communauté scientifique dispose de nombreuses données tant sur les inductions de pathologies que sur le registre comportemental.

L'âge des souris au moment des mesures comportementales dépendra du modèle d'intérêt : les souris génétiquement altérées seront utilisées aux âges pour lesquels l'expression des déficiences comportementales associées a été mise en évidence au préalable dans le cadre d'un autre projet. Des jeunes souris sevrées ou adultes seront utilisées si le phénotype comportemental est induit par des modifications environnementales, ou par des administrations de molécules. En outre, les souris âgées pourront constituer un modèle en soit.

Toutes les souris de ce projet feront l'objet d'un suivi quotidien réalisé par les expérimentateurs et le personnel assurant leur soin. Ce suivi permettra d'identifier tout signe de souffrance et de soustraire les animaux des études en cas d'atteinte des points limites définis. Il sera accru pour les lignées de souris génétiquement altérées susceptibles de présenter un phénotype dommageable. Les animaux disposeront de tubes de coton 'cocoon' pour se construire un nid ou de morceau de bois à ronger dans leur cage d'hébergement.

Les phases de chirurgie nécessaires à certaines inductions de modèles ou traitements pharmacologiques seront réalisées sous couverture anesthésique et analgésique. Ils seront remis en groupe dès que possible en post opératoire afin d'éviter le stress de l'isolement, et leur surveillance sera renforcée. Certains tests comportementaux étant susceptibles d'engendrer un stress mineur pour l'animal, souvent lié à la nouveauté de la situation ou à l'isolement, nous envisageons alors qu'ils soient de courte durée pour stopper rapidement la source de stress ou, au contraire, que la source de stress soit progressivement répétée pour habituer la souris. Pour chaque test comportemental, lorsque suffisamment de données pharmacologiques seront réunies, une consultation statistique sera programmée pour réajuster le nombre d'animaux nécessaire, soit parce que le test est nouveau, soit parce que le nombre d'animaux pour ce test a été évalué depuis longtemps.

4218. L'arthrose est une pathologie des articulations qui se caractérise par une destruction progressive du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral associée à l'apparition d'ostéophytes, ainsi qu'une inflammation de la membrane synoviale. Il est désormais reconnu que cette composante inflammatoire joue un rôle clé dans la maladie, puisqu'elle est liée à une augmentation de la dégradation du cartilage et de la douleur. Il n'existe, à ce jour, aucun traitement capable d'enrayer l'évolution du processus arthrosique. Il est maintenant bien connu que les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont des propriétés régénératives qu'elles exercent via la sécrétion de facteurs immunomodulateurs, anti-apoptotiques, anti-fibrotiques et anti-inflammatoires. La sécrétion de différents facteurs par les CSM joue également un rôle dans la protection des cellules contre le stress oxydatif et la sénescence. Ainsi, les thérapies cellulaires à base de CSM apparaissent comme prometteuses dans le traitement de l'arthrose. Les avancées récentes dans la physiopathologie arthrosique ainsi que dans la compréhension des propriétés régénératives des CSM ont été obtenues grâce à l'utilisation de modèles de souris arthrosiques. Ces études ont notamment montré que les CSM murines réduisent l'épaississement synovial, la formation d'ostéophytes et la destruction du cartilage dans des modèles d'arthroses expérimentales.

Considérant d'une part, le rôle de l'inflammation et du système immunitaire dans le processus arthrosique et d'autre part les différences entre les médiateurs de l'immunomodulation entre les CSM de souris et les CSM humaines, le développement de

modèles animaux sophistiqués mimant au mieux le système immunitaire humain représenterait un plus dans l'évaluation de thérapies cellulaires anti-arthrosiques à base de CSM humaines.

Dans ce contexte, nous souhaitons développer un modèle d'arthrose expérimentale chez la souris humanisée. Les souris NOD/SCID/IL2R gamma -/- (NSG) sont immunodéficientes: elles manquent de lymphocytes T, lymphocytes B et présentent des niveaux très faibles d'activité des cellules NK. Ces souris, privées de la chaîne gamma du récepteur commun aux cytokines, présentent également un fonctionnement déficient de leur système immunitaire inné. Les souris NSG supportent une greffe à long terme de cellules souches hématopoïétiques humaines (CSH). Avec le temps, les CSH greffées se différencient permettant la colonisation du système immunitaire murin par des cellules immunitaires humaines (lymphocytes T et B, cellules NK, cellules dendritiques ainsi que des monocytes/macrophages et des granulocytes).

Ainsi, nous induiront l'arthrose chez des souris NSG (humanisées et non humanisées) par déstabilisation du ménisque médial droit. Afin de caractériser ce modèle d'arthrose en terme de cinétique et degré de l'atteinte arthrosique chez les souris humanisées, les souris seront euthanasiées 6, 8, 12 et 16 semaines après induction de l'arthrose, les membres postérieurs seront prélevés et l'évolution de l'arthrose induite sera appréciée par histologie. Cette procédure utilisera un nombre total de 240 souris. Les expérimentations seront réalisées en respectant la règle des 3 R (Remplacer, Réduire et Raffiner). En effet, une bonne caractérisation du modèle d'arthrose chez les souris humanisées nous permettra de réduire le nombre d'animaux lors de nos futures expérimentations utilisant ce modèle. Par ailleurs, afin de réduire la douleur lors des expérimentations, une analgésie péri-opératoire immédiate est prévue par administration de buprénorphine en pré et post-chirurgie, ainsi que l'ajout de meloxicam dans l'eau de boisson pendant 5 jours post chirurgie. Par ailleurs, les souris seront observées quotidiennement la première semaine après la chirurgie, puis 2 fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation.

4219. La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après l'étude multicentrique STAR\*D, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements.

La pertinence d'un modèle animal à reproduire une pathologie humaine dépend de trois critères : sa validité prédictive (à savoir que les traitements efficaces en clinique doivent l'être dans le modèle), sa validité phénoménologique (la capacité du modèle à induire les symptômes de la pathologie) et sa validité théorique (la place du modèle par rapport au cadre théorique).

Seul le développement de modèles animaux chroniques dans lesquels un état anormal est induit et maintenu pendant une période prolongée, durant laquelle une « thérapie » peut être administrée, peut fournir un outil pour répondre à ces questions.

C'est la raison pour laquelle nos travaux se basent sur l'utilisation du modèle du stress chronique léger imprédictible (SCI). De façon intéressante, il s'agit du seul modèle pour lequel il existe une signature moléculaire commune entre la dépression humaine et celle existant après stress chronique imprédictible chez la souris. Ce modèle de stress chronique imprédictible a également été validé pharmacologiquement, et semble le mieux adapté et le plus pertinent pour étudier la pathophysiologie de la dépression.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude:

Raffinement : le stress appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen, en raison de sa brièveté, il sera réduit à son minimum. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu.

Remplacement : aucune méthode alternative ni substitutive n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chronique chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire in vitro n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité interindividuelle (n=15 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

Cette expérience s'intéresse à l'aptitude d'une nouvelle molécule à reverser les effets du stress chronique imprédictible (SCI) sur les fonctions exécutives. Un total de 60 souris mâles sera utilisé répartis en 4 lots de 15 individus.

4220. La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après l'étude multicentrique STAR\*D, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements et la compréhension des mécanismes physiopathogéniques et étiopathologiques sous-jacents. Certains de ces mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant l'analyse d'échantillons cérébraux par exemple. Ces méthodologies ne peuvent être réalisées qu'au travers d'une approche préclinique.

Une restriction pour les recherches précliniques qui veulent étudier le mécanisme d'action des antidépresseurs (ADs) chez l'animal est qu'elles sont surtout réalisées chez des animaux normaux, qui ne sont pas dans un état « dépressif-like » (similaire à un état dépressif ou « depressed-like state »). Or les traitements aux antidépresseurs induisent très peu d'effets chez l'homme sain. Ces études ont été une première étape pour définir le spectre des actions possibles des ADs mais demeurent limitées pour

déterminer les effets qui sont réellement nécessaires à l'action thérapeutique. C'est la raison pour laquelle nos travaux se basent sur l'utilisation du modèle du stress chronique léger imprédictible (SCI).

Le but de cette expérience est double : a) mettre au point des indicateurs sanguins métaboliques prédictifs de la résistance aux antidépresseurs, b) évaluer les marqueurs métaboliques sanguins et cérébraux de la rémission. Pour cette expérience, 60 souris réparties en 4 lots sont requises.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude:

Raffinement : les stress appliqués aux animaux peuvent être qualifiés de léger à moyen, sans stress physique de type nociceptif.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chronique chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire in vitro n'est disponible. Les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité interindividuelle (n=15 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

4221. Le projet vise à évaluer chez la souris le pouvoir pro ou anti-tumoral de cellules qui ont été préalablement modifiées ex vivo. Les études réalisées doivent nous amener à développer des tumeurs primaires et éventuellement des métastases à partir de cellules tumorales réimplantées chez la souris. L'approche consiste ensuite à étudier le rôle de gènes candidats impliqués dans les processus tumoraux, soit en modifiant directement les cellules tumorales qui doivent être réimplantées, soit en modifiant des cellules du système immunitaire murin qui doivent agir sur le développement tumoral.

Le développement tumoral nécessite un suivi quotidien des souris afin de noter toute modification majeure de l'état général de l'animal : taille de la tumeur, perte de poids excessive, mobilité restreinte, défaut d'agrippement, respiration altérée, développement tumoral anormalement important (tumeur excédant un volume de 2 cm<sup>3</sup>) ou en un site gênant la mobilité de l'animal. Le développement de la tumeur primaire est suivi par mesure directe de celle-ci au pied à coulisse ou bien par imagerie de fluorescence ou de luminescence. Ces techniques sont non invasives et permettent le suivi d'un même animal au cours du temps.

La souris est modèle le plus adapté pour les études tumorales d'origine humaine et sans rejet (les souris sont alors immunodéficientes), c'est également un modèle de choix pour l'étude du développement de certaines tumeurs murines (les souris sont dans ce cas de type sauvage, avec un système immunitaire intègre). Le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude ne se fait qu'après des validations in vitro sur des modèles cellulaires. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce modèle pour l'obtention de résultats scientifiques exploitables, pertinents de la pathologie humaine et pour laquelle des études dans un organisme entier sont nécessaires pour faire suite aux études in vitro.

Le nombre d'animaux utilisé se fait sur la base de la pertinence statistique. Nous nous arrêtons à des groupes de 6 animaux par condition, y compris les groupes contrôles nécessaires à la crédibilité de l'analyse de l'étude menée.

Le caractère pathologique tumoral et les modifications physiologiques engendrées ne permettent pas de réutiliser les animaux en fin d'étude ni de raffiner l'étude en utilisant un seul animal pour plusieurs conditions expérimentales. Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal et les animaux sont hébergés en présence d'enrichissements.

Il est prévu d'utiliser un maximum de 900 animaux souris sur 5 ans (180 animaux par an max).

4222. Le mélanome est le cancer de la peau le plus agressif, il a un haut potentiel métastatique et son incidence ne cesse d'augmenter depuis les 30 dernières années. C'est pourquoi, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont développées dont les traitements de radioimmunothérapie pour lesquelles la cible à détruire est la cellule tumorale, l'arme, un vecteur associé à un radioélément qui va émettre un rayon « toxique » pour cette cellule. Notre stratégie est de produire un radiopharmaceutique qui doit cibler préférentiellement la cellule tumorale par rapport aux tissus sains. Nous disposons de différents vecteurs et de plusieurs radioéléments. Ce projet a pour objectif de tester un nouveau vecteur et de nouveaux radioéléments pour cibler le mélanome.

Ce vecteur est un anticorps anti-PD-L1 humain. L'antigène PD-L1 est exprimé par les cellules de mélanome et l'injection d'anticorps anti-PD-L1 chez les patients a déjà permis d'obtenir des régressions tumorales très significatives.

Nous utiliserons pour les thérapies un modèle de souris immunodéficientes NOD-SCID-IL-2Rg [NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, NSG] greffées par voie sous cutanée avec des cellules tumorales de mélanome humain.

Cette saisine a pour objet les études d'escalades de doses préalables et obligatoires avant tout traitement de radioimmunothérapies (RIT). Les escalades de doses se feront sur ce modèle de souris non greffées.

Elles consistent à faire des injections de doses croissantes du vecteur radiomarqué avec chaque radioélément pour déterminer la Dose Limite Tolérée (DLT). Pour chaque vecteur et chaque radioélément, une escalade de doses est indispensable pour déterminer la Dose Maximale Tolérée (DMT) qui permet de choisir la Dose Limite Tolérée (DLT).

La toxicité hépatique et rénale sera mesurée par des dosages biochimiques sur le sérum avant et en fin d'expérience ainsi que par une étude microscopique sur les organes prélevés post mortem le foie, la rate et les reins.

Ce vecteur associé à 3 radioéléments sera évalué dans cette saisine pour permettre la mise en place de nouveaux traitements de radioimmunothérapies et les comparer. 6 doses croissantes seront choisies. Chaque dose sera injectée à 5 souris. Il faudra 30 souris pour un test. 3 radioéléments seront testés. Ce projet nécessitera 90 souris NSG. Le modèle animal est indispensable et non substituable pour déterminer quelle est la dose limite tolérée avant de commencer des études chez l'homme.

Règle des 3R:

Réduire le nombre d'animaux utilisés en conservant le nombre nécessaire pour un résultat statistique significatif.

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.

Remplacer n'est pas possible pour ces études.

4223. La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers. Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement. En outre, les patients rétablis à la suite d'un premier épisode dépressif présentent un risque de récurrence dans les 6 mois évalué à 50% en cas d'arrêt du traitement et il a été montré qu'en l'absence de traitement 15% des patients succombent à la suite d'un suicide et qu'entre 60% et 80% des suicides (entre 10000 et 15000 par an en France) sont le fait d'individus fortement dépressifs. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements et la compréhension des mécanismes sous-jacents. Certains de ces mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant l'utilisation de techniques d'immunohistochimie par exemple.

Une restriction pour les recherches précliniques qui veulent étudier le mécanisme d'action des antidépresseurs chez l'animal est qu'elles sont surtout réalisées chez des animaux normaux, qui ne sont pas dans un état physiologique similaire à un état dépressif. Or, il est bien connu que les traitements aux antidépresseurs induisent très peu d'effets chez l'homme sain. C'est la raison pour laquelle nos travaux se basent sur l'utilisation du modèle du stress chronique léger imprédictible (SCI). Ce modèle animal de stress chronique imprédictible a été validé pharmacologiquement, et semble le mieux adapté et le plus pertinent pour étudier la physiopathologie de la dépression et le mécanisme d'action des antidépresseurs.

Le but de cette expérience est d'évaluer l'implication des mécanismes inflammatoires et en particulier du TNF $\alpha$  dans la vulnérabilité à un stress chronique. En effet, cette cytokine proinflammatoire joue un rôle prépondérant dans l'établissement d'états neuroinflammatoires, eux-mêmes liés aux états dépressifs. Nous envisageons donc l'administration d'un anti-TNF $\alpha$  (Etanercept) chez des souris soumises à un stress chronique. L'action thérapeutique de l'etanercept sera corrélée avec sa capacité à reverser les modifications comportementales induites par le SCI au moyen de tests comportementaux avant d'être comparé à un antidépresseur de référence: la fluoxétine (Prozac). A la fin de cette expérience, les cerveaux seront prélevés pour l'analyse des marqueurs de la neuroinflammation.

Une première expérience sur un lot de 10 souris nous permettra de définir les doses des traitements à utiliser. La deuxième expérience, nécessitera 150 souris réparties en 10 lots de 15 individus, soit un total de 160 souris.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude:

Raffinement : les stress appliqués aux animaux peuvent être qualifiés de léger à moyen, sans stress physique douloureux pour l'animal, ni de restriction hydrique ou alimentaire. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chronique chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire in vitro n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=15 sujets par groupe).

4224. Les cellules microgliales ou macrophages résidents du cerveau sont les principales cellules présentatrices d'antigènes (CPA) de cet organe spécialisé et, de ce fait, sont des acteurs importants dans la réponse immunitaire contre les tumeurs cérébrales. En effet, s'il existe des preuves expérimentales et cliniques montrant que les lymphocytes T CD8 sont capables d'entrer dans le cerveau, leur migration, leur rétention et le maintien de leur cytotoxicité sont conditionnées par l'activation optimale et la présentation antigénique croisée des CPA locales. Contrairement à ses homologues périphériques, notamment à ceux se différenciant à partir des monocytes circulants, les cellules microgliales se différencient à partir de progéniteurs du sac vitellin très tôt au cours du développement embryonnaire, et présentent une très longue durée de vie et une capacité d'auto-renouvellement.

Récemment, un certain nombre de travaux ont mis en évidence un lien étroit entre le microbiote et le cerveau. Dans ce projet, nous émettons l'hypothèse que des perturbations du microbiote intestinal pendant des périodes développementales choisies (in utero, péri-natale) pourraient avoir des effets importants sur les fonctions des cellules microgliales à l'âge adulte, et notamment sur leur fonction d'immuno-surveillance anti-tumorale.

Le projet vise donc à étudier in vivo le rôle du microbiote intestinal dans la survenue de cancers du cerveau. Dans chaque expérience de ce projet, des souris ayant reçu un traitement antibiotiques à large spectre par voie orale perturbant leur microbiote intestinal seront comparées à des souris n'ayant reçu aucun traitement antibiotiques. Nous utiliserons 276 souris C57BL/6 pour la totalité de ce projet, réalisé sur 5 ans. Ce nombre a été défini en tenant compte de la règle des 3R (Réduction du nombre des animaux avec utilisation d'un nombre minimum pour obtenir des résultats statistiquement fiables : nombre d'animaux nécessaire et suffisant calculé d'après des estimations statistiques se basant sur les expériences précédentes du laboratoire, Raffinement du

protocole expérimentale : enrichissement de l'environnement par l'ajout de coton dans les cages d'accouplement et Remplacement des animaux au maximum par des expériences in vitro préalables). Nous attacherons une importance particulière à obtenir le maximum d'informations scientifiques avec chaque animal inclus dans le projet.

Tout au long de ces expériences, l'absence de douleur ainsi que le bien-être des animaux seront au centre des préoccupations par l'administration d'analgésiques au moment de l'implantation de la tumeur et par une surveillance post-opératoire quotidienne des animaux. Pour éviter toute souffrance de l'animal au cours du protocole expérimental, des indicateurs comportementaux et physiques prédéfinis (état général, prostration, poil hérissé, perte de poids) seront évalués quotidiennement et constitueront les points limites de l'expérience (mise à mort de l'animal).

4225. Le tube digestif héberge une communauté de bactéries appelé « microbiote intestinal » dont les capacités sont riches et diversifiées. Le microbiote intestinal a un impact majeur sur l'ensemble de l'organisme qui l'héberge. En effet, il est connu pour être impliqué dans différentes fonctions, dont la digestion, l'immunité ou encore le métabolisme énergétique. Cependant, ce n'est que dans la dernière décennie qu'a émergé le concept selon lequel le microbiote intestinal participe au dialogue intestin-cerveau.

Ces dernières années, un nombre croissant de travaux a mis en évidence la participation du microbiote intestinal à l'axe de communication intestin-cerveau.

Le microbiote intestinal a notamment la capacité de transformer un acide aminé essentiel apporté par l'alimentation, le tryptophane, en indole. L'indole est ensuite transformé dans le foie en dérivés oxydés, les oxindoles, qui sont des molécules neuro-actives (agissant sur le cerveau). Des études chez le rongeur ont démontré que les oxindoles avaient des effets sédatif et anxiogène. Par ailleurs, des études chez l'Homme ont montré qu'une augmentation du taux sanguin ou urinaire en oxindoles était associée à plusieurs maladies neuropsychiatriques et neurodégénératives (ex : encéphalopathie hépatique, schizophrénie, maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson).

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet qui a pour but de comprendre dans quelle mesure une molécule d'origine bactérienne peut influencer l'apparition, le développement ou le maintien de maladies psychiatriques. Pour cela, nous étudierons l'impact de l'indole produit par les bactéries de l'intestin sur le fonctionnement cérébral et le comportement de l'hôte dans des conditions saine et pathologique. Nous nous intéresserons tout particulièrement à l'affection neuropsychiatrique la plus répandue dans le monde, la dépression, et à des troubles mentaux qui lui sont souvent associés, les troubles anxieux.

La dépression, qui touche mondialement plus de 350 millions de personnes, est la « première cause d'incapacité dans le monde [...] et contribue fortement à la charge mondiale de la maladie » (Organisation Mondiale de la Santé, avril 2016). Une proportion importante de patients est aujourd'hui résistante aux traitements et la multiplication des traitements est fréquente avant de trouver celui permettant la guérison. En effet, environ 1/3 des patients n'ont pas complètement atteint la rémission après 4 stratégies successives de traitements. Le manque de traitements personnalisés fait cruellement défaut et la recherche de nouvelles thérapies est cruciale.

Afin d'étudier si l'indole représente un facteur de vulnérabilité ou d'amplification de la dépression, nous utiliserons des souris à microbiote contrôlé présentant une forte capacité de production d'indole et manifestant des comportements de type dépressif. Ces conditions expérimentales visant à obtenir un microbiote surproducteur d'indole pouvant s'apparenter à un microbiote intestinal humain résultant d'une prise d'antibiotiques ou d'une alimentation déséquilibrée. Des tests comportementaux seront effectués afin de mesurer le niveau de dépression et d'anxiété des souris dans les différentes conditions expérimentales (avec ou sans surproduction d'indole par deux types de procédures, et en présence ou en absence de stress chronique modéré induisant un comportement de type dépressif). A la fin de la procédure les animaux seront euthanasiés et les cerveaux prélevés afin de faire des analyses biochimiques, dans le but de rechercher les effets de l'indole sur la physiologie cérébrale et son implication dans la dépression. A terme, les résultats de notre étude pourront servir de base à la conception de traitements alternatifs ou complémentaires des traitements classiques actuels utilisés pour lutter contre la dépression.

Seule l'utilisation d'animaux permet d'étudier les interactions complexes entre un microbiote intestinal particulier, le fonctionnement du cerveau et la survenue de troubles comportementaux. Le nombre d'animaux utilisé (320) est celui qui est le minimum nécessaire à l'analyse statistique des données obtenues et donc à l'exploitation et l'interprétation des résultats. Quatre cohortes successives seront mises en œuvre pour chaque procédure afin de pouvoir mesurer l'ensemble des paramètres neurochimiques. L'ensemble des soins donnés aux souris visera à satisfaire le mieux possible leurs besoins physiologiques et comportementaux, conformément à la législation. Leurs états de santé et de bien-être seront évalués quotidiennement.

4226. Le sepsis est une maladie grave caractérisée par une réponse inflammatoire généralisée suite à une infection sévère de l'organisme par des agents infectieux virulents tels que des bactéries. Le choc septique reste une cause majeure de mortalité, notamment chez des patients souffrants de cancer à un stade avancé, et son incidence est en constante augmentation. En France, environ 100 000 patients par an sont admis en soin intensif avec un choc septique. Le taux de mortalité est élevé car il avoisine les 40%. Les patients qui survivent présentent de nombreuses séquelles, notamment un risque élevé de décès à moyen et long terme, et présentent des troubles cognitifs et une réduction des fonctions motrices. Actuellement, les options de traitement restent limitées à un traitement antibiotique précoce, à la réanimation et à essayer de maintenir un bon fonctionnement des différents organes défaillants.

L'évolution du choc septique est également associée à des complications graves au niveau de la circulation sanguine. En effet, chez ces patients, il coexiste un risque thrombotique (occlusion des vaisseaux) et un risque hémorragique (saignement). Cet équilibre instable est notamment dû à la capacité qu'ont les cellules sanguines en présence de bactéries, d'activer la coagulation.

Des études ont montré qu'au cours du sepsis, l'administration d'inhibiteurs physiologiques de la coagulation, diminuaient la mortalité, non seulement en empêchant l'activation de la coagulation, mais aussi par des effets protecteurs par une activité anti-inflammatoire sur les cellules sanguines ou les cellules des vaisseaux sanguins. Cependant, leurs effets protecteurs sont observés à des doses élevées pouvant engendrer des hémorragies ce qui a conduit à arrêter leur utilisation en thérapeutique. Parmi de nouvelles cibles envisagées, nous nous intéressons tout particulièrement à un inhibiteur de la coagulation dépendant de la protéine Z (ZPI) qui a une activité inhibitrice vis-à-vis des facteurs de la coagulation plus restreinte, ce qui nous fait supposer que son utilisation serait associée à risque hémorragique faible ou nul. Par ailleurs, nos travaux menés in vitro montrent que le ZPI a des propriétés anti-inflammatoires. Après ces études in vitro et afin d'aller plus en avant et confirmer le potentiel prometteur du ZPI, comme nouvelle thérapie complémentaire dans le sepsis, une étude chez l'animal est nécessaire. En effet, le recours à l'animal est essentiel pour comprendre les interactions entre le vaisseau sanguin, les cellules du sang et les facteurs de la coagulation. En effet, il existe une étroite collaboration entre ces trois facteurs qui sont essentiels au maintien de l'intégrité du vaisseau notamment en cas d'inflammation sévère comme dans le sepsis. Ainsi un modèle animal est nécessaire pour étudier les effets de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-inflammatoires et anticoagulantes, effets qui ne peuvent être reproduits à l'heure actuelle in vitro du fait de la complexité et de la multitude des partenaires. En résumé, ce projet permettra d'évaluer si l'utilisation de PZ et/ou ZPI pourrait avoir un bénéfice en santé humaine dans des cas de sepsis sévère qui échappent à tous traitements.

Dans ce projet et afin de répondre à la règle des 3 R, les procédures utilisées se feront dans le cadre adapté d'un hébergement agréé, respectant au maximum le bien-être des animaux avec un enrichissement du milieu (morceaux de bois à ronger, filaments de papier kraft pour faire un nid), en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. L'ensemble des expériences seront effectuées par une personne habilitée à expérimenter sur animaux. Par ailleurs, pour déterminer le nombre d'animaux nécessaire à l'ensemble de l'étude, nous avons calculé le nombre d'animaux nécessaires pour chaque procédure pour avoir une réponse statistiquement analysable. Ainsi le nombre total de souris prévu est de 724.

4227. Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde avec plus de 17 millions de morts par an. La maladie coronarienne est responsable de la moitié de ces décès. Cette pathologie se caractérise par la présence de lésions athéromateuses dans la paroi des artères coronaires, qui irriguent le cœur. En pratique clinique, 2/3 des accidents coronariens aigus sont causés par la rupture de plaques vulnérables. La formation de ces plaques vulnérables est peu sténosante, donc indétectable par les techniques actuellement disponibles en pratique clinique. Le radiotracer testé dans cette étude est une molécule innovante puisqu'il s'agit d'un nanobody, qui est un fragment d'anticorps de camélidé. Cet anticorps se fixe spécifiquement à VCAM-1, une molécule impliquée dans les phénomènes inflammatoires et joue un rôle essentiel dans le processus inflammatoire des lésions athéromateuses. Suite à son administration par voie intraveineuse, des caméras dédiées (gamma-caméras) permettent de visualiser et de quantifier la distribution de ce radiotracer dans l'organisme. Sur un modèle murin d'athérosclérose, ce radiotracer permet de visualiser, de manière non-invasive, le développement de plaques d'athérome aortiques et d'évaluer l'effet de thérapies anti-athérogènes. Suite aux bons résultats obtenus lors des études précliniques, cette molécule va être, à présent, transférée en clinique. Afin de pouvoir injecter cette molécule chez l'homme, premièrement pour les phases cliniques puis pour l'administration en pratique clinique, ce nanobody doit être produit aux normes des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). Ces normes visent à garantir la sécurité et la qualité des médicaments mis sur le marché.

L'objectif de cette présente étude est d'évaluer la biodistribution de nouveaux lots produits aux normes des BPF afin de valider leur qualité de production. Deux modèles murins seront utilisés afin de caractériser ces nouveaux lots, d'une part des souris C57Bl/6J nourries avec un régime standard, et d'autre part des souris déficientes pour le gène de l'apolipoprotéine E (ApoE-/-) nourries avec un régime hyperlipidémique qui vont développer des plaques d'athérosclérose

Tout au long des protocoles in vivo, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Pour le remplacement, aucune méthode alternative n'est disponible pour ce type d'étude. Des tests in vitro ont permis de caractériser la molécule, néanmoins, seule des tests in vivo permettront de valider la production du nanobody aux normes BPF. Pour la réduction, nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme indispensables chez l'animal, soit un total de 96 souris utilisées, nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement analysables dans les différents groupes expérimentaux. Enfin pour le raffinement, les animaux seront hébergés par groupe, avec enrichissement du milieu de vie. Un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé. Les sessions d'imagerie seront réalisées sous anesthésie volatile supplémentée avec de l'oxygène, pendant une durée inférieure à 1h. Les animaux seront placés sur un lit thermostaté le temps de l'imagerie et la fréquence respiratoire sera enregistrée en continu afin de contrôler le degré d'anesthésie et de l'ajuster si nécessaire. Le protocole d'imagerie qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse en dehors d'un stress bref et modéré lié à l'injection intra-veineuse de radiotracer.

4228. Le traumatisme médullaire est un trouble aux conséquences terribles pour le patient qui, au-delà de déficiences motrices majeures, est confronté à des troubles urinaires et intestinaux socialement handicapants. Initiée au début des années 1970, les stimulations électriques intra-médullaires et péri-médullaires, regroupées sous le terme générique de stimulation médullaire, sont, aujourd'hui, l'objet d'un regain d'intérêt. Dans un premier temps basés sur une approche empirique, les résultats spectaculaires obtenus chez le petit animal (chat, souris) et sur quelques cas cliniques isolés, semblent mettre en évidence l'existence de réseaux neuronaux pré-câblés au sein de la moelle, réseaux à l'origine de l'activité synergique des muscles.

Au regard du but de nos recherches, qui est de restaurer les fonctions urinaires et intestinales chez le patient blessé médullaire, l'utilisation d'un modèle animal présentant des tractus urinaires et intestinaux identiques à l'homme semble tout indiqué. Le porcelet présentant cette particularité et une moelle spinale aux proportions similaire, des études électro physiologiques de cette

dernière permettraient de combler les lacunes bibliographiques concernant la prise en considération de modèles animaux intermédiaires, susceptibles de valider les observations réalisées chez le petit animal et, par la même occasion, de faciliter la mise en place d'essais cliniques de grande envergure.

Nous utiliserons 2 porcelets Landras de 3 à 4 mois femelles (environ 50kg) par an sur 5 ans (soit 10 au total) Les animaux sont issus d'un élevage agréé. Avant d'être mis sous anesthésie générale, nous leur administrons un calmant afin d'éviter le stress des manipulations. Les porcelets sont pris en charge de la même manière que les patients humains. L'intervention s'effectue sous anesthésie générale additionnée d'analgésiques afin d'éviter toute souffrance. C'est une procédure sans réveil. Il n'y a donc pas de douleur post-opératoire.

Nous ne pouvons remplacer les porcelets par d'autres méthodes in vitro ou in silico puisque que le but de ces recherches et de trouver des solutions aux troubles urinaires et intestinaux chez les patients ayant des déficiences motrices majeures. Pour ce faire nous devons tester sur un être vivant pour trouver des solutions.

Nous utilisons 2 porcelets sur 2 jours. C'est un nombre maximum pour la bon déroulement de la recherche. Sachant que le jour de l'intervention tous les intervenants, dans chaque spécialité, seront présents pour limiter le nombre de manipulations (Neurochirurgiens, chercheurs....).

4229. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques, notamment à visée anti-thrombotique. Certaines procédures peuvent également s'avérer utiles dans le cadre de la pharmacologie de sécurité, car il convient de vérifier de ce type d'études l'absence d'effets sur la coagulation. L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et sont mises en œuvre à grande échelle au sein des laboratoires de pharmacologie. Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs et de lapins. Même si des tests in vitro peuvent être réalisés au préalable afin de mettre en évidence les propriétés anti-thrombotiques des substances testées, ces propriétés devront être confirmées in vivo, dans le modèle animal. L'utilisation d'animaux (rongeurs et lapins principalement) est donc indispensable. Le choix de l'espèce est justifié par le fait que les modèles décrits dans ce projet sont essentiellement validés chez les rongeurs et lapins. 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 et de lapins qui seront nécessaires pour les 5 prochaines années sera de 1200 et 800, respectivement. 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.

4230. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant de lutter contre des maladies rénales (insuffisance rénale aigue ou chronique: fibrose, hypertension systémique dont l'origine est une atteinte rénale,...). Ils permettent aussi, pour certains, l'évaluation des effets secondaires dans le contexte de la pharmacologie de sécurité.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et sont mises en œuvre à grande échelle au sein des laboratoires de pharmacologie. Ces tests nécessitent l'utilisation 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 la fonction rénale d'animaux vigiles ou anesthésiés 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 6800. Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3R, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

4231. La colistine est un antibiotique utilisé en médecine humaine depuis 1958, mais qui a été délaissé à cause de son effet toxique sur les reins (néphrotoxicité). Toutefois, l'émergence de résistances microbiennes à plusieurs familles d'antibiotiques et l'absence de molécules nouvelles ont abouti à des impasses thérapeutiques à l'origine d'un regain d'intérêt pour la colistine. Cet antibiotique de dernier recours est principalement utilisé à l'hôpital sous la forme de colistiméthate de sodium (CMS), afin de traiter les infections nosocomiales, mais également les patients en réanimation ou atteints de mucoviscidose. En médecine vétérinaire, la colistine est majoritairement utilisée chez les animaux de rente pour traiter les infections digestives. Cependant, le CMS est parfois utilisé chez les animaux de productions pour traiter des pneumonies ou septicémie. Les mécanismes aboutissant à la néphrotoxicité ne sont encore que peu connus malgré la fréquence élevée de ces complications, des études plus poussées dans ce domaine sont donc nécessaires.

Dans ce projet, le porc servira à la fois d'espèce cible pour les études de pharmacologie vétérinaire et de modèle d'extrapolation à l'Homme. Cette procédure expérimentale permettra de compléter les résultats d'un premier projet qui s'est attaché, grâce à l'apport de la modélisation pharmacocinétique basée sur la physiologie (modèles PB/PK), à optimiser l'usage du CMS en médecine humaine et vétérinaire. L'unique procédure expérimentale de cette demande consistera à étudier l'accumulation rénale de colistine et de CMS après administration du CMS par voie-intramusculaire à des porcs, sur une semaine, à différentes

échéances pendant et à l'arrêt de l'exposition. Dans un effort de réduction, le nombre d'animaux sera minimisé grâce à des modèles statistiques sophistiqués permettant d'analyser des données éparses et suffisantes pour bien appréhender la variabilité biologique. Ainsi, un maximum de 18 porcs sera utilisé. Concernant le raffinement, des points limites ont été définis afin de permettre une intervention rapide sur les animaux afin de limiter le stress ou la douleur. Enfin, le recours à la modélisation PB/PK permettra d'optimiser l'usage du CMS (prédictions avec d'autres schémas posologiques par exemple), par simulations sans utilisation supplémentaire d'animaux, répondant ainsi aux exigences de remplacement.

4232. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques qui pourraient agir au niveau du système nerveux périphérique, et plus particulièrement ayant des propriétés cholinergiques ou anticholinergiques.

Les anticholinergiques sont utilisés pour augmenter le rythme cardiaque, atténuer les symptômes de la maladie de Parkinson, diminuer les sécrétions de l'estomac ou d'autres glandes du corps (ex salivaire). Les agonistes cholinergiques ont par exemple un intérêt dans le traitement des troubles des glandes salivaires dus à la radiothérapie ou dans le traitement du glaucome. L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et est mise en œuvre au sein des laboratoires de pharmacologie. 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 substance pharmacologiques sur le système nerveux périphérique 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 600. 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.

4233. Plusieurs maladies neurodégénératives humaines telles que la maladie de Parkinson ou les démences à corps de Lewy, ont pu être associées par des études épidémiologiques à l'exposition à des composés neurotoxiques tels que certains pesticides par exemple. Les hypothèses discutées les plus actuelles dans ces maladies humaines mettent en avant la possibilité d'un déclenchement initial au niveau du système nerveux présent dans le tube digestif, au cours d'une exposition à des contaminants chimiques par voie orale. Les études de toxicologie in vivo après exposition orale sont souvent conduites à haute dose et sur une durée limitée ne permettant pas de considérer un processus neurodégénératif au niveau du système nerveux. De même, il n'y a pas ou peu d'informations à propos du mode de déclenchement d'un processus neurodégénératif au niveau du tractus gastro-intestinal qui représente pourtant une porte d'entrée pour ces molécules ingérées dans la nourriture ou l'eau.

Le projet proposé permettra de compléter l'étude déjà effectuée de l'effet neurotoxique de pesticides sur le système nerveux entérique (partie du système nerveux contrôlant le système gastro-intestinal) de la souris. L'objectif du projet est d'apporter de nouvelles connaissances en appliquant un protocole d'exposition au pesticide par l'eau de boisson (pesticide soluble dilué dans l'eau). Ce mode d'administration validé dans la saisine précédente sera mis en œuvre sur des nouvelles lignées de souris sauvages, transgéniques (en utilisant des modèles mimant la maladie de Parkinson). Les expérimentations reposeront sur des expositions chroniques là encore à faibles doses et sur des durées variant de 3 semaines (afin de voir les stades les plus précoces de l'initiation de la maladie) à 18 mois (afin de voir si les changements vus à court termes engendrent des pathologies telles que la maladie de Parkinson). L'originalité de ce projet repose sur l'administration chronique par voie orale et la faible dose, aussi les effets de pesticides seront observés au niveau de l'intestin, afin de pouvoir étudier l'implication possible du système nerveux entérique dans le déclenchement et la propagation d'une neurodégénérescence centrale à court, moyen et long terme.

L'étude permettra de suivre les évolutions des réponses physiopathologiques au cours du temps. L'association de techniques d'analyse du matériel biologique adaptées et de tests statistiques puissants nous permettra de minimiser le nombre d'animaux nécessaires (sur 2 ans un nombre maximum de 340 souris est prévu). Le nombre de prélèvements prévus nous permettra de maximiser les informations nouvelles générées tout en gardant un effectif de souris le plus bas possible. Aussi, même si notre projet est de classe de sévérité légère, nous mettrons en place des points limites dont le respect sera assuré par l'expérience des animaliers et par un suivi clinique quotidien.

Ce projet devrait compléter notre précédente étude afin de fournir un socle de connaissances le plus complet possible qui pourront constituer un modèle d'essais pertinents pour l'évaluation du rôle dans le développement de maladies neurodégénératives humaines, de molécules neurotoxiques tels que les produits phytosanitaires

4234. Les objectifs initiaux du projet de recherche visent à mieux comprendre le rôle des cellules gliales entériques (CGE) dans le contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale (BEI) et de déterminer l'impact d'atteintes pathologiques des CGE dans le développement de lésions de la BEI. Ce travail s'est développé autour des résultats mettant en évidence le rôle clé des CGE dans le contrôle de l'homéostasie de la BEI : inhibition de la prolifération et de la perméabilité et augmentation de la cicatrisation. Ce projet vise à tester l'hypothèse selon laquelle des facteurs gliaux pourraient ralentir ou stopper le développement de colite. Le facteur glial testé sera la prostaglandine I2 (PGI2).

Dans ce projet, nous souhaitons induire et mesurer le développement d'une colite comme c'est le cas pour les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Tout en tenant compte du principe des 3R (limitation des effectifs (3-4 animaux par groupes), raffinement des conditions d'hébergement des souris, remplacement quand possible), nous mettrons en place le modèle

de colite (déjà bien décrit dans la bibliographie). Nous comparerons le développement de colite dans des souris supplémentées en analogue stable de la PGI2 ou non. La moitié de chacun des groupes recevra du Dextran Sodium Sulfate (manière aigüe ou chronique) pour développer une colite. Les expériences seront reproduites 3 fois de manière indépendante et ce projet nécessitera 96 animaux maximum.

4235. L'aspergillose invasive est une infection due à un champignon appartenant au genre *Aspergillus*. Cette pathologie se caractérise par une altération de l'état général due à la dissémination du champignon dans l'organisme. Sans traitement efficace, elle aboutit au décès du patient. Les traitements actuellement disponibles, bien que souvent efficace, sont peu nombreux. L'émergence de souches résistantes ou les effets indésirables de ces traitements font qu'il est nécessaire de développer toujours et encore de nouveaux antifongiques.

Parmi les modèles murins disponibles, deux modèles complémentaires sont adaptés pour cette étude, le modèle d'aspergillose systémique et le modèle d'aspergillose cérébrale. Afin de réaliser l'ensemble des expériences et d'obtenir des résultats interprétables, 600 animaux (300 par procédure) seront nécessaires pour mener à bien cette étude. Les souris sont hébergées en groupe, dans un environnement enrichi. Les protocoles expérimentaux ont été établis de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés en choisissant d'évaluer uniquement les nouveaux antifongiques ayant fait la preuve de leur activité *in vitro*. La durée maximale du traitement est de 5 jours. La souffrance animale est évaluée au cours du suivi quotidien de l'évolution clinique des animaux. Tout animal manifestant un signe de gravité est euthanasié.

4236. Le prolapsus de la Valve cardiaque Mitrale (PVM) affecte 1 personne sur 40 après 60 ans. Il peut se manifester par une régurgitation du sang du ventricule vers l'oreillette gauche lors de la systole ventriculaire et se traduire par une insuffisance cardiaque qui nécessitera in fine une intervention chirurgicale qui reste la seule voie thérapeutique. Malgré les progrès réalisés dans la chirurgie valvulaire, les risques chez les sujets âgés restent importants et il est donc impératif de trouver d'autres voies thérapeutiques et donc d'identifier les mécanismes physiopathologiques à l'œuvre qui restent à ce jour largement méconnus. Le PVM a longtemps été considéré comme une pathologie dégénérative du sujet âgé cependant des bases génétiques héréditaires sont maintenant clairement établies et le premier gène identifié est le gène codant pour la protéine du cytosquelette cellulaire : la Filamine A (FlnA). Les patients porteurs de mutation FlnA ne présentent aucun autre symptôme que les affections valvulaires. Les feuillets des valves sont allongés, épaissis et présentent une dégénérescence myxoïde comprenant des altérations non spécifiques du collagène et de l'élastine et une accumulation de protéoglycanes. Une dystrophie de l'appareil sous valvulaire (cordages épaissis) est aussi parfois observée. Une particularité de ces patients est que la pathologie est plus marquée chez les hommes du fait de la localisation du gène sur le chromosome X et qu'elle peut se déclarer chez des individus jeunes (<20 ans) voire *in utero* puisque un garçon est né avec un PVM. Ce cas suggère une composante développementale dans la pathologie.

Malgré l'avancée des connaissances les mécanismes physiopathologiques impliqués restent méconnus faute de modèle animal récapitulant le phénotype des patients. C'est pourquoi nous nous proposons de créer une lignée de rat transgénique Knock-in sur le gène de la Filamine A pour une des mutations identifiées chez les patients : FlnA-P637Q.

Le projet se propose d'étudier la valvulopathie dans ce modèle de rat transgénique par une étude longitudinale sur des individus atteints tout au long de leur vie et une étude du développement de la pathologie au cours de l'embryogénèse par prélèvement d'embryons sur femelles gestantes. Au total, 206 animaux seront utilisés.

Le projet a été pensé selon les 3R par :

- Réduction du nombre d'animaux utilisés grâce une méthode d'imagerie non invasive, l'échographie, qui permet d'étudier la valvulopathie sans avoir à sacrifier l'animal
- Remplacement : Les mécanismes moléculaires ont été analysés au préalable *in vitro*
- Raffinement : les animaux sont hébergés en groupe avec un enrichissement adapté.

4237. Une allergie est une réaction exagérée du système immunitaire vis-à-vis d'un allergène qui peut être présent dans l'alimentation, dans l'air... En principe, elle est sans danger pour l'homme et se présente sous différentes formes : symptômes digestifs, cutanés, respiratoires.

Brièvement, la maladie allergique est divisée en 2 phases. Lors du premier contact avec un allergène, l'individu ne déclenche pas de réaction allergique mais produit des immunoglobulines (IgE) dirigées contre cet allergène. Ces IgE vont aller se fixer sur un mastocyte, une cellule contenant de nombreuses molécules, dont l'histamine. Lors du second contact avec cet allergène, l'allergène va être reconnu par les IgE fixées sur le mastocyte et ce dernier va libérer son contenu induisant des symptômes cliniques.

Depuis le milieu des années 1950, de nombreuses publications mettent en évidence une association inverse entre allergie et cancer. Par exemple, une étude épidémiologique, réalisée aux Etats Unis en 2005, rapporte que les personnes atteintes d'asthme ou de rhinites allergiques ont un risque diminué de 20% de développer un cancer colorectal et 10% de développer tout autre type de cancer. Cette même étude révèle également que les personnes atteintes uniquement de rhinites allergiques développent moins de cancer du pancréas, et les personnes atteintes d'asthme développent moins de leucémie, de cancer du sein ou de cancer colorectal.

L'ensemble de ces données suggère que les IgE participeraient à l'immuno-surveillance de l'organisme, processus par lequel le système immunitaire détecterait et détruirait toute cellule tumorale nouvellement formée.

L'objectif de cette étude est de tester cette hypothèse en étudiant le potentiel protecteur des IgE sur la croissance d'une tumeur mammaire localisée dans la mamelle ou sur le flanc chez des souris allergiques à un lactosérum.

Pour cette étude 40 souris Balb/C femelles seront utilisées et divisées en 4 groupes de 8 souris et 2 groupes de 4 souris. Elle sera composée de 2 phases, la seconde phase ne sera réalisée que si la première phase est concluante.

Les souris seront tout d'abord sensibilisées au lactosérum (1 injection intragastrique par semaine pendant 6 semaines). La sensibilisation des animaux sera vérifiée par deux méthodes : un test MSET (équivalent du Prick Test humain) et un test de provocation allergique. Le test MSET consiste en une mesure de l'épaisseur de l'oreille avant et après injection intradermique de lactosérum. Lors de la provocation allergique, les souris reçoivent une injection intrapéritonéale de lactosérum et les signes cliniques d'une allergie (baisse de fréquence respiratoire, baisse de température corporelle, symptômes cliniques) sont suivis pendant une heure. La présence d'IgE sériques dirigées contre le lactosérum est mise en évidence par un test in vitro (ELISA) suite à des prélèvements de sang à différents temps du protocole (J0, J21, J35, J42). L'ensemble de ces tests permettra de confirmer que les souris ont développé une allergie contre le lactosérum et qu'elles possèdent des taux significatifs d'IgE sériques contre ce produit. Si, et seulement si cette condition est remplie, l'induction d'un cancer du sein sera effectuée par une injection sous-cutanée de cellules tumorales mammaires 4T1. Nous pourrions alors évaluer le pouvoir « protecteur » des IgE anti-lactosérum contre ce cancer par une mesure du volume tumoral avec un pied à coulisse digital deux fois par semaine pendant 3 semaines. Deux sites d'injection sous-cutanée des cellules seront testés : la mamelle (orthotopique) ou le flanc (hétérotopique).

Une surveillance quotidienne des souris sera effectuée. Elles seront 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.

Nos travaux portant sur le cancer du sein, nous n'utiliserons que des souris Balb/C femelles. Chez cette souche, l'injection de cellules 4T1 mime le cancer du sein humain (Raffinement). Notre étude statistique nous indique qu'utiliser 40 souris est nécessaire et suffisant (Réduction). L'utilisation de souris rendues allergiques est indispensable pour valider le fait qu'une allergie peut protéger d'un cancer. Le dosage d'anticorps est possible in vitro mais il ne renseigne que sur la quantité et non sur la fonctionnalité de ces anticorps vis-à-vis de l'allergène défini (Remplacement). A la fin de l'étude ou si l'un des points limites est atteint (diamètre de la tumeur supérieur à 17 mm, nécrose des tissus environnants la tumeur, affaiblissement de la souris,...), les souris seront mises à mort selon une méthode réglementaire.

4238. Les cellules du sang assurant l'oxygénation des tissus et la défense immunitaire se développent dans la moelle osseuse (MO) à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH) tout au long de la vie des individus. Les mécanismes biologiques qui gouvernent le maintien des CSH par leur auto-renouvellement ne sont pas totalement élucidés, l'un de ces mécanismes est la voie de signalisation Notch. Cependant le rôle de cette voie de signalisation dans l'homéostasie des CSH reste controversé. En effet, il a été montré que la signalisation de Notch semble ne pas être requise pour maintenir les CSH au cours de la vie adulte des souris. D'autres, au contraire, ont mis en évidence que la voie de signalisation Notch joue un rôle important dans l'expansion des CSH in vitro. Nos études préliminaires in vitro ont montré que les CSH pour lesquelles la voie Notch a été inhibée (génétiquement ou à l'aide d'une drogue) se renouvellent de façon plus importante que les CSH sauvages. D'autre part cette expansion est accentuée lorsqu'on utilise des CSH issues de souris IkL/L hypomorphes pour le facteur de transcription Ikaros. Nous cherchons à déterminer si l'expansion des CSH (sauvages et IkL/L) inhibées pour Notch est également accrue in vivo. D'autre part nous chercherons à déterminer si l'inhibition de la voie Notch dans les cellules IkL/L restaure la différenciation de celles-ci. Pour cela, nous transplanterons des cellules de MO (contenant les CSH) inhibées pour Notch dans des souris hôtes irradiées léthalement. Nous déterminerons ensuite si le nombre de CSH inhibées pour Notch greffé est plus important que le nombre de CSH sauvages dans les souris transplantées.

Afin de respecter la règle des 3R, une réduction du nombre d'animaux utilisés a été décidée.

Pour répondre à cet objectif, et afin de pouvoir réaliser des tests statistiques (Student t-test), nous prévoyons d'analyser des groupes de 6 souris/ conditions, soit 126 souris pour le projet global (voir procédures expérimentales). Pour répondre à l'objectif de raffinement, les souris seront hébergées à plusieurs dans des cages de taille réglementaire, en ne dépassant pas le nombre maximal autorisé de souris par cage (souris rassemblées en groupes sociaux), et dans des cages comportant des enrichissements (nids). Enfin, les souris seront observées régulièrement et les dispositions adéquates seront prises si la souffrance des animaux devait atteindre les points limites. La règle du remplacement n'est pas applicable ici: en effet, nous devons avoir recours à un modèle in vivo afin d'étudier les cellules hématopoïétiques qui mettent en jeu des coopérations cellulaires multiples dans les organes hématopoïétique tel que la moelle osseuse et la rate. Pour ces raisons, nous ne pouvons avoir recours à des modèles in vitro. En ce qui concerne les modèles in vivo, la souris est un modèle de choix pour l'analyse génétique et les expériences de transplantation de MO.

4239. La dépression, qui est aujourd'hui la maladie psychiatrique la plus répandue avec une prévalence de 6 à 10% en Europe représente un problème majeur de santé publique. En dépit de cette fréquence élevée et du coût économique de sa prise en charge, la compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la dépression reste limitée à ce jour, tant au niveau de ses facteurs de risque, de la résilience, la résistance aux traitements classiques et des méthodes alternatives de traitement. De nombreuses données montrent par ailleurs qu'une forte composante inflammatoire et immunitaire (avec notamment une synthèse accrue de cytokines inflammatoires) est impliquée dans le développement des symptômes dépressifs et la résistance aux traitements antidépresseurs et que les interactions entre système immunitaire et système nerveux ouvrent des perspectives de traitement intéressantes. Des données cliniques issues de notre laboratoire ont largement contribué à ces connaissances en montrant par exemple que l'immunothérapie par cytokines entraîne une dépression chez environ 50% des patients. Les objectifs

ici sont d'étudier, dans différents modèles animaux adaptés et complémentaires, le rôle de l'inflammation dans l'apparition et le traitement de troubles de l'humeur associés à un contexte inflammatoire (stress, déséquilibres nutritionnels) et d'identifier les mécanismes neurobiologiques impliqués. Nous focaliserons notamment l'étude sur l'action de l'inflammation sur les voies de synthèse des monoamines. Nous utiliserons pour cela des modèles de souris présentant une inflammation aigüe causée par injection d'extrait bactérien inflammatoire ou une inflammation chronique de bas grade induite par une exposition à un stress ou à un régime hyperlipidique, deux situations connues pour induire une réactivité accrue du système immunitaire. Un modèle de souris transgéniques db/db dépourvues du récepteur de la leptine et constituant un modèle d'obésité plus sévère associée à d'importants troubles métaboliques sera également utilisé. Ces modèles seront caractérisés sur le plan comportemental (avec recherche de troubles émotionnels et étude de leur correction par traitement antidépresseur), mais également biochimique (évaluation du statut inflammatoire périphérique et cérébral) et neurochimique (neurotransmission monoaminergique).

En minimisant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats concluants et atteindre une signification statistique, nous estimons qu'au maximum 12 animaux par groupe expérimental seront nécessaires pour mener à bien notre projet. Ceci représente un total de 504 souris sur 3 ans. Toutes les précautions possibles (anesthésie, enrichissement des cages d'hébergement) seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux.

4240. En dépit des progrès de la recherche en cancérologie de ces 20 dernières années, l'espérance de vie des patients porteurs d'une tumeur cérébrale de haut grade (glioblastome) n'a que très peu progressé (14 mois). Pour classer les gliomes en clinique, l'analyse histologique des tissus est la méthode de référence (classification de l'OMS). Ces critères de l'OMS sont toutefois critiqués par la communauté scientifique internationale. En effet, d'une part les biopsies (~1 mm<sup>3</sup>) ne reflètent pas l'hétérogénéité des tumeurs cérébrales et d'autre part le caractère invasif des biopsies empêche leur répétition pour suivre un patient dans le temps. Dans ce contexte, l'imagerie médicale et notamment l'imagerie par résonance magnétique (IRM) s'est fortement développée. Au cours de la dernière décennie, les développements méthodologiques en IRM ont permis de cartographier in vivo des paramètres structurels et fonctionnels caractérisant les tumeurs cérébrales au niveau cellulaire (imagerie de diffusion) et microvasculaire (imagerie du volume et du débit sanguin, de la taille des vaisseaux, de l'oxygénation,...). Bien que certains paramètres, comme la diffusion, soient déjà utilisés en routine clinique, aucun ne s'est imposé pour remplacer l'analyse histologique (et donc la biopsie) dans la classification des tumeurs cérébrales. Une alternative à l'utilisation de l'IRM "mono-paramétrique" est d'exploiter la richesse des acquisitions IRM multiparamétrique afin de créer des images composites présentant des informations similaires aux analyses histologiques.

L'objectif du projet est de développer et d'évaluer l'histologie non-invasive par imagerie par résonance magnétique (h-IRM), une approche récemment proposée pour le diagnostic, le pronostic et l'évaluation de thérapies dans les tumeurs cérébrales. Le développement d'une technique d'imagerie non-invasive remplaçant l'analyse histologique dans la pathologie tumorale se révélerait un formidable outil préclinique et clinique.

Cette étude, menée sur 312 rats adultes portant une tumeur cérébrale (5 modèles différents seront utilisés au cours de cette étude), sera divisée en 3 parties:

1) Développement méthodologique l'h-IRM: chacun des 5 modèles de tumeurs cérébrales (n=12/groupe) sera imagé à un temps de croissance par IRM multiparamétrique avec une haute résolution spatiale. Des marquages structurels (histologie) et fonctionnels (autoradiographie) seront réalisés sur l'intégralité des tumeurs de ces mêmes animaux. Après co-localisation 3D des données, différentes approches statistiques innovantes seront mises en œuvre pour développer l'h-IRM.

2) Validation l'h-IRM comme biomarqueur diagnostic et/ou pronostic: une étude de la croissance tumorale par IRM (diagnostic) et de survie (pronostic) de chacun des 5 modèles étudiés (n=12/groupe) sera réalisée.

3) Validation de l'h-IRM comme biomarqueur d'efficacité thérapeutique: une étude de suivi de l'effet de deux traitements (n=4 groupes) sur un modèle de gliome chez le rat sera réalisée (n=48/groupe).

Les résultats de cette étude permettront de réduire le nombre d'animaux utilisés pour de futurs développements thérapeutiques car ils permettront de limiter le recours à l'histologie (où il faut un animal par temps d'évolution) au profit de suivi in vivo (où un même animal est étudié à plusieurs temps d'évolution). En clinique, cet outil permettra de mieux classer les tumeurs cérébrales en étudiant l'intégralité de la masse tumorale au lieu du petit volume de biopsie utilisé actuellement. Ce diagnostic plus complet, non invasif et donc moins dangereux, permettra d'adapter plus finement et plus régulièrement la prise en charge thérapeutique patient par patient. L'étude portant sur des tumeurs cérébrales, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. En effet, aucun modèle alternatif ne permet encore de reproduire en globalité la complexité de cette pathologie et des interactions entre tissu sain et tissu tumoral.

Ce nombre d'animaux a été déterminé grâce à un test statistique appliqué pour chaque expérience, ce qui nous a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

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

4241. L'hormone thyroïdienne est essentielle dans l'organisme non seulement au cours du développement, mais aussi chez l'adulte, notamment pour le contrôle du métabolisme. Il existe deux types de récepteurs de l'hormone thyroïdienne, répartis dans tout l'organisme : TR $\alpha$  et TR $\beta$ , codés respectivement par les gènes Thra et Thrb. Depuis plus de 20 ans, des patients humains portant des mutations de Thrb ont été identifiés et leur maladie, la résistance à l'hormone thyroïdienne de type  $\beta$ , a pu être étudiée. En revanche, les premiers patients humains portant des mutations de Thra n'ont été identifiés que récemment (2012), grâce à la

propagation des techniques de séquençage du génome en clinique humaine. Ces patients ne présentent pas d'altération majeure des taux d'hormones thyroïdiennes dans le sang et sont caractérisés par une grande variabilité des tableaux cliniques, ce qui complique le diagnostic. Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement satisfaisant pour ces patients, qui présentent fréquemment des symptômes invalidants (troubles de croissance, constipation, déficits moteurs et cognitifs,...). La variabilité observée en clinique pourrait être liée au fait que selon les patients, la mutation se trouve dans différentes régions du gène *Thra*. L'objectif de ce projet est d'étudier la relation entre site de mutation dans le gène *Thra* et conséquences fonctionnelles dans l'organisme chez la souris, qui est un bon modèle pour cette question car l'hormone thyroïdienne et le récepteur TR $\alpha$  jouent des rôles similaires chez la souris et chez l'homme.

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

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

4242. Dans les pays occidentaux, le nombre de personnes en surpoids est en constante augmentation et est associé à l'accroissement des maladies métaboliques (diabète type 2, obésité) et cardiovasculaires. La lutte contre ces pathologies est devenue un véritable enjeu pour les industries pharmaceutiques et agroalimentaires. Ce problème de santé publique est lié à un ensemble de facteurs génétiques et environnementaux parmi lesquels la nutrition joue un rôle majeur. Elle peut notamment permettre, via une stratégie alimentaire adaptée, de limiter, voire même de prévenir, les désordres métaboliques associés à ces maladies comme l'altération du métabolisme des lipides et l'instauration d'une inflammation à bas bruit. Nos travaux récents ont contribué à montrer que lors d'une alimentation riche en lipides, des endotoxines du microbiote intestinal sont absorbées et peuvent contribuer au développement de l'inflammation. Ainsi, l'étude des lipides : structure, digestion, absorption, stockage et utilisation, en lien avec le métabolisme des endotoxines, est une voie à explorer. C'est dans ce cadre que notre projet s'inscrit. La digestion des lipides implique l'action de la bile, sécrétion exocrine du foie. En effet, ce fluide est composé de sels biliaires qui vont émulsionner les lipides et former des micelles. Ces micelles vont ensuite permettre l'absorption des lipides par l'entérocyte. Lors de la consommation d'un régime riche en graisse, la production d'acides biliaires est augmentée pour faciliter la digestion des lipides. De plus, la composition des sécrétions biliaires est modulée selon le régime alimentaire ingéré et pourrait influencer l'absorption des endotoxines. Par conséquent, il serait intéressant de compléter ces connaissances en analysant l'impact de différents régimes lipidiques sur les sécrétions biliaires.

L'objectif du projet de recherche est d'étudier l'effet relatif de la qualité/quantité de différents lipides sur les sécrétions biliaires, les phénomènes inflammatoires et le métabolisme des lipides dans le cadre des maladies métaboliques associées.

Ce projet implique l'utilisation de souris C57BL/6J. Elles seront séparées en 6 groupes de 10 souris et seront soumises pendant 7 jours ou 4 semaines à différents régimes : (i) un régime témoin ou (ii) un régime hyperlipidique enrichi en huile de palme ou (iii) un régime hyperlipidique enrichi en huile de colza ou (iv) un régime hyperlipidique enrichi en huile de tournesol ou (v) enrichi en huile de lin ou (vi) enrichi en matières grasses laitières. Ainsi le protocole porte sur un total de 120 souris.

La présente étude est raffinée par l'utilisation d'un modèle qui ne d'accompagne d'aucune douleur et de stress pour les animaux ; le prélèvement des sécrétions biliaires étant réalisé sur des animaux sous anesthésie terminal. Dans le même respect des 3R, selon des calculs statistiques, le nombre d'animaux sur l'ensemble du protocole a été réduit à 120 souris soit 10 souris pour 6 groupes pour chacun des pans du projet. Pour leur bien-être, leur comportement social sera stimulé par une stabulation collective (4 souris/cage) et par un enrichissement de leur environnement.

Enfin cette étude est justifiée par le fait qu'il est nécessaire de passer par une étape de digestion du régime testé chez la souris et de récupération de fluides physiologiques afin d'analyser les phénomènes cités précédemment; ces derniers n'étant pas modélisables dans leur intégralité avec les modèles *in vitro* existant.

Mots clés: obésité, lipides, inflammation, sécrétions biliaires.

4243. Les lymphocytes T régulateurs Foxp3<sup>+</sup> (Tregs) contrôlent l'intensité des réponses immunitaires et leur limitation dans le temps. A ce titre, ils jouent un rôle important dans la prévention de l'allergie et de l'inflammation. Il y a plusieurs années, nous avons initié un programme de recherche dont l'objectif est d'identifier des molécules spécifiques à la fois des populations des Tregs et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels et de leur tropisme tissulaire. Par une approche pangénomique, nous avons montré qu'une forte expression du gène *Trpm4*, un canal ionique activé par le calcium, caractérise la population des lymphocytes Tregs Foxp3<sup>+</sup>. Afin d'évaluer les conséquences de cette observation, des souris invalidées pour le gène *Trpm4* seront générées. L'objectif est maintenant de démontrer *in vivo* l'impact de *Trpm4* sur la fonction *in situ* des cellules Tregs, tout particulièrement

des Tregs infiltrant les tumeurs, les Tregs associés à la muqueuse intestinale et le tissu adipeux. Notre projet permettra de démontrer que le canal Trpm4 est impliqué dans la fonction des lymphocytes Tregs activés in vivo et qu'il intervient dans le contrôle de la réponse anti-tumorale, de l'inflammation intestinale et de l'obésité. Les résultats de ce projet permettront également d'identifier des nouvelles cibles thérapeutiques potentielles des lymphocytes Tregs et des Tconv associés ces conditions pathologiques.

Notre projet respecte le principe des « 3R » :

- Nous avons choisi le modèle murin comme méthode alternative au modèle primate non humain.
- Nous avons réduit au maximum le nombre de souris (372) permettant une mise au point du protocole et une analyse statistique significative.
- Notre projet respecte également le « bien-être animal » : Nos animaux sont hébergés dans une animalerie agréée. Nous avons optimisé notre procédure en définissant des points limites permettant d'identifier le moment à partir duquel la souffrance et /ou la détresse de l'animal doit être arrêtée.

Les réponses immunitaires, comme la réponse immunitaire anti-tumorale, sont des processus complexes dont la mise en place est conditionnée par des interactions dynamiques impliquant de nombreux partenaires cellulaires présents dans différents compartiments de l'organisme. A l'heure actuelle, aucune approche in vitro ne permet de reproduire de façon satisfaisante l'ensemble des phénomènes impliqués dans l'initiation des réponses immunitaires in vivo. C'est la raison pourquoi nous avons besoin de travailler avec les modèles d'animaux génétiquement modifiés.

4244. Les nouveau-nés, dont le système immunitaire est immature, sont fréquemment soumis à des infections d'origine parasitaire, virale ou bactérienne. Chez les espèces animales de rente (ruminants, porcins, volaille, etc...), ces infections sont responsables d'une diminution de leur prise de poids mais également de nombreuses mortalités dans les élevages générant des pertes économiques fortes pour les éleveurs.

Notre laboratoire dispose d'un produit innovant capable de stimuler rapidement et de manière aspécifique, le système immunitaire des animaux nouveau-nés.

Ainsi, nous souhaitons évaluer la possibilité d'utiliser notre immunostimulant chez le poussin et, dans un premier temps, évaluer la dose nécessaire pour une efficacité optimale. Pour y parvenir, les poussins seront répartis dans 4 lots différents : un lot témoin non immunostimulés et 3 lots immunostimulés avec des doses croissantes. Chaque lot sera constitué de 30 poussins soit 120 poussins par expérience. Cette expérience sera répétée entre 2 et 4 reprises sur des races de volailles différentes (races de poules pondeuses et races de poulet de chair) soit un nombre d'animaux compris entre 240 de 480 animaux sur 5 ans.

Les expérimentations ont été conçues en respectant la règle des 3Rs:

- Remplacer : Bien que l'efficacité de notre immunostimulant néonatal ait d'ores et déjà été démontrée chez l'agneau, des études réalisées chez l'animal sont encore nécessaires car notre produit immunostimulant fait intervenir le système immunitaire complet et qu'aucune méthode alternative n'est disponible à l'heure actuelle.
- Réduire : le nombre d'animaux inclus dans le protocole a été réduit à son minimum grâce à un plan d'expérience et a été optimisé pour obtenir le maximum de données scientifiques,
- Raffiner : Les études seront menées en tenant compte des besoins éthologiques des volailles, en limitant leur stress et en évitant de prolonger les souffrances induites par les procédures expérimentales.

A la fin des expérimentations, les animaux sont euthanasiés selon les procédures éthiquement recommandées et ne pourront être réutilisés.

4245. Ce projet fait partie intégrante d'un projet de recherche mené chez le porc étudiant les mécanismes de rejet suite à une greffe de tissus composites (comprenant la peau, le tissu sous-cutané, des muscles, des nerfs, des artères et de l'os). A terme, le but du projet de recherche est d'envisager la mise au point d'un protocole induisant une tolérance à la greffe qui rendrait le traitement immunosuppresseur à vie inutile.

Ce projet consiste à réaliser la poursuite de l'hébergement des animaux ayant reçu un greffon de tissus composites afin de contrôler l'évolution du greffon et les paramètres sanguins suivants :

- le nombre de cellules sanguines,
- le fonctionnement des organes (en particulier rein et foie),
- les taux plasmatiques en immunosuppresseurs,
- l'analyse des sous populations lymphoïdes,
- l'analyse du chimérisme.

En vue de prélever différents organes, les animaux seront euthanasiés à la fin de ce projet.

Le porc est le modèle non primate qui se rapproche le plus de l'Humain, notamment au niveau de l'anatomie du système vasculaire. Le projet utilise 4 porcs, ceux ayant montré une acceptation prolongée du greffon.

Tout au long de leur hébergement, les animaux auront des conditions d'hébergement adaptées. Ainsi, ils bénéficieront d'un logement, d'un environnement, d'une alimentation, d'un apport en eau et en soins appropriés à leur santé et à leur bien-être.

Afin d'augmenter leur bien-être, les animaux seront hébergés collectivement et disposeront d'un environnement enrichi.

Afin de maintenir des conditions optimales d'hébergement, les paramètres d'ambiance, l'aliment, l'abreuvement seront vérifiés quotidiennement.

Une attention particulière sera portée à l'adaptation des animaux à leur environnement en s'assurant notamment de l'harmonie des groupes formés, de leur consommation alimentaire et hydrique et de la maîtrise de leur environnement (mangeoire, pipette).

Dans le but de repérer rapidement toute anomalie, les animaux seront suivis quotidiennement. Ainsi, si un animal montre des signes de pathologie, de souffrance ou de douleur, le vétérinaire (ou tout autre personne compétente) interviendra pour mettre en place un traitement thérapeutique et/ou des soins divers dans le but de le soigner et de le soulager.

4246. La douleur est un processus physiologique présent à la fois chez l'adulte et l'enfant. Cependant, contrairement à l'adulte, la sensibilité douloureuse est différente chez le jeune, ce qui peut se traduire par des traitements peu efficaces ou pas adaptés. Au cours de ces dernières années, de nombreuses études développementales ont été réalisées pour mieux comprendre ces différences de sensibilité.

Chez l'adulte, une inflammation ou une lésion nerveuse peut déclencher différents symptômes douloureux. Un des symptômes observés appelé allodynie, correspond à une douleur provoquée par une stimulation normalement non douloureuse. Ce symptôme est paradoxal de par son déclenchement. En effet, en condition physiologique, les informations tactiles et douloureuses n'aboutissent pas au même niveau de la moelle épinière ou du tronc cérébral. Les deux modalités sensorielles (tact et douleur) sont donc normalement séparées. En conditions pathologiques, par exemple lors d'une allodynie, l'information tactile devient capable d'activer des neurones nociceptifs. Cette activation se fait grâce à un circuit qui implique plusieurs neurones et notamment une population spécifique d'interneurones excitateurs qui expriment l'isoforme gamma de la protéine kinase C (PKC $\gamma$ ).

Contrairement à l'adulte, une lésion nerveuse n'induit pas d'allodynie chez le jeune.

Sachant que les interneurones PKC $\gamma$  apparaissent progressivement au cours de trois premières semaines post-natales et que durant cette période, de profonds remaniements des fibres qui transmettent l'information tactile et douloureuse vont avoir lieu, nous émettons l'hypothèse que l'apparition progressive des interneurones PKC $\gamma$  serait liée à l'apparition des fibres nociceptives. Pour répondre à cette question, nous souhaitons étudier les effets du blocage de ces fibres sur l'apparition et le développement des interneurones PKC $\gamma$ .

Ce projet combinera une étude comportementale et immunohistologique. Au total 36 rats seront utilisés. Ils seront mis à mort à la fin des procédures par overdose d'anesthésique.

Dans le but de réduire le nombre d'animaux, les rats utilisés dans l'étude comportementale seront ensuite utilisés pour les études immunohistochimiques conformément à la règle des 3R. De plus, aucune méthode alternative actuelle ne permet de remplacer les protocoles nécessaires pour la réalisation de ce projet. Il est donc indispensable de réaliser les observations chez l'animal. Enfin, les animaux seront dans des cages de 800 cm<sup>2</sup> au sol (cage enrichies) dans l'animalerie thermorégulée (22±1 °C), avec hygrométrie contrôlée et cycle de lumière inversé (lumière de 19h à 7h). L'accès à la nourriture et à l'eau sera ad libitum et un changement de litière sera effectué 2 fois par semaine.

4247. Les maladies cardio-vasculaires représentent l'une des principales causes de mortalité dans les pays occidentaux, et la principale chez les personnes insuffisantes rénales, les mécanismes responsables sont encore incomplètement connus. Notre objectif est de déterminer le rôle du vieillissement des protéines dans le développement des anomalies des parois vasculaires, en particulier au cours de l'anévrisme aortique. Le vieillissement des protéines est la conséquence de plusieurs réactions qui consistent en la fixation de métabolites simples sur leurs groupements fonctionnels. Dans notre étude, nous nous intéresserons à la réaction de carbamylation qui correspond à la fixation de cyanate sur les protéines. Le cyanate provient de plusieurs sources, l'une des principales est celle liée à la décomposition de l'urée. Le but de ce projet est d'évaluer l'impact de la carbamylation des protéines matricielles de la paroi vasculaire sur le développement et l'évolution de l'anévrisme aortique.

Des études *in vitro* réalisées au préalable ont permis d'émettre des hypothèses quant au rôle de la carbamylation dans le développement de l'anévrisme. Cependant, ces hypothèses doivent être vérifiées chez l'animal car les mécanismes impliqués sont très complexes et incomplètement connus.

Nous développerons un modèle murin d'anévrisme aortique par l'infusion d'angiotensine II. Dans ce modèle, la réaction de carbamylation sera amplifiée artificiellement par du cyanate dilué dans l'eau de boisson.

Un total de 120 souris seront utilisées, sur deux fois 10 semaines. Le nombre d'animaux est réduit au maximum et est déterminé par la nécessité d'obtenir des résultats exploitables sur le plan statistique. Les tests statistiques choisis sont adaptés à de petits effectifs. Les animaux seront hébergés selon les conditions légales dans des cages enrichies (rouleaux de carton rigide dans les cages). La pose du système d'infusion d'angiotensine II et la néphrectomie sub-totale seront réalisées sous anesthésie générale avec une prise en charge de la douleur post-opératoire. Des points limites seront déterminés et seront recherchés quotidiennement par le personnel de l'animalerie, qui préviendra le chercheur le jour même pour décider de la conduite à tenir. Les prélèvements (sanguin, histologiques) ne se feront qu'au moment de l'euthanasie de l'animal profondément anesthésié.

4248. *Borrelia crocidurae* et *B. miyamotoi* sont des bactéries responsables de fièvres récurrentes en Afrique et en Europe respectivement dont le réservoir est des rongeurs sauvages. L'infection bactérienne à *B. crocidurae* est transmise par des tiques molles du genre *Ornithodoros* et provoque chez la souris une bactériémie et des fièvres, de même que chez l'homme qui est un hôte accidentel. L'infection à *B. miyamotoi* est de découverte plus récente dans l'Hémisphère nord et est transmise par des tiques dures du genre *Ixodes*.

Ce projet s'effectue dans le cadre du centre national de référence sur les *Borrelia*: le laboratoire dispose d'un modèle de maladie de Lyme chez la souris pour étudier la transmission de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Nous n'avons pas de modèle animal pour étudier l'autre pathologie dont *Borrelia* est responsable: les fièvres récurrentes.

Dans ce projet, nous prévoyons de mettre en place le modèle murin au laboratoire afin de mieux analyser le processus de transmission. L'infection sera induite chez les souris soit par inoculation intrapéritonéale de suspension bactérienne maintenue in vitro, soit par des tiques infectées, cela nous permettra d'analyser le rôle de la salive de la tique dans la transmission. Nous travaillerons avec des souris BalbC ou des souris C57bl6 âgées de 3 à 4 semaines qui est l'âge favorable pour pouvoir infecter nos souris, de plus ces souris sont sensibles à l'infection par *Borrelia crocidurae* et *B. miyamotoi*.

Pour la durée de notre expérience (2 ans) nous prévoyons d'utiliser 930 souris.

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

Remplacement : notre modèle est infectieux nous ne pouvons pas travailler sur des organes isolés car il n'y aurait pas de dissémination dans les organes et il n'y aurait pas de contact du pathogène avec le système immunitaire de l'animal.

Raffinement : Une attention particulière sera apportée aux animaux traités afin de limiter leur inconfort. Ils ont aussi des enrichissements dans leur cage et restent hébergés en groupe

Réduction : Le nombre prévu de souris pour le projet est réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. L'analyse statistique est un student T test.

4249. La dépression a un impact sociétal majeur. Cette pathologie touche 3 millions de personnes en France et est responsable de près de 10000 suicides par an. Les traitements classiques ne sont pas optimaux dans le traitement de la maladie car ils ont une latence d'action de plusieurs semaines et ils entraînent des effets secondaires très contraignants. De plus, 1/3 des dépressifs sont résistants aux traitements existants. Le but de ce projet est de trouver les facteurs environnementaux pouvant faire varier le taux d'un propeptide sanguin (PE), ainsi que les organes responsables de cette variation. Ce propeptide provient de la maturation d'un récepteur à la neurotensine (NTSR3) aussi appelé sortiline. Il est un bloqueur spécifique de certains canaux potassiques dont l'implication dans la dépression a été démontrée.

Des dosages de la concentration de ce propeptide dans le sérum de cohorte de sujets humains dépressifs et sains ont mis en évidence un taux de PE plus faible dans le sang des personnes dépressives que dans celui des personnes saines. De plus, ce taux tend à revenir à des valeurs similaires à celles des contrôles après traitement avec des antidépresseurs classiques. Cette étude a mis en évidence que le PE peut servir d'outil diagnostique en tant que marqueur sanguin de la dépression. Des données déjà obtenues chez la souris corroborent celles obtenues chez l'humain, démontrant la valeur prédictive de ce modèle pour ce projet. Les résultats d'une étude pilote réalisée sur la souris nous indiquent une corrélation entre les variations du niveau de neurotensine et de PE circulant. Nous avons aussi observé que l'injection de neurotensine en subchronique (4 jours) induit un comportement antidépresseur chez la souris C57BL6J.

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes d'action du PE afin d'explorer le potentiel thérapeutique et diagnostique de cette molécule dans la dépression. Nous utiliserons 774 souris pour adresser les différentes questions qui se posent pour atteindre nos objectifs et auxquelles nous tenterons de répondre à travers les 3 procédures envisagées.

La première procédure nous permettra d'établir s'il y a un lien direct entre neurotensine et PE, si le comportement antidépresseur lié à l'injection de neurotensine est corrélé à une augmentation de PE sanguin et si l'effet antidépresseur induit par la neurotensine est dû à une action centrale ou périphérique.

La deuxième procédure aura pour objectif d'établir s'il existe une corrélation entre l'état dépressif induit des souris et les taux de PE, de neurotensine et de cortisol circulants et ainsi de connaître le/les mécanisme(s) responsable(s) de cette chute de PE sanguin.

En fonction des réponses obtenues grâce aux 2 précédentes procédures, la procédure 3 nous permettra de préciser les mécanismes d'action et le rôle du PE dans le processus dépressif.

Les enjeux très prometteurs concernant le rôle du propeptide dans le diagnostic et le traitement de la dépression nous paraissent particulièrement important au regard des contraintes imposées aux animaux, et toutes les dispositions seront prises pour en limiter l'intensité lors de la réalisation de ce projet qui satisfait aux exigences des 3 R.

Remplacement : ce travail a été précédé et s'appuie sur de nombreuses données acquises sur des systèmes in vitro et des études ont d'ores et déjà été menées sur des cohortes de patients humains qui confirment la prédictibilité du modèle murin. Néanmoins l'élucidation des mécanismes d'action du PE, au sein de l'organisme, implique des analyses qui ne sont pas éthiquement envisageable chez l'homme.

Réduction : nous avons déterminé les effectifs de nos groupes de manière à obtenir une forte validité statistique avec un minimum d'individu et notre projet a été conçu pour optimiser la quantité d'information analysable par procédure.

Raffinement : L'établissement de fiches de suivi des animaux intégrant la définition a priori de points limites précoces et adaptés permettront une évaluation quotidienne des contraintes éventuellement subies par les animaux tout au long de leur vie et de prendre les mesures nécessaires afin d'en limiter au maximum les effets.

4250. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant de lutter contre l'épilepsie qui se caractérise par la présence d'une activité épileptique au niveau cérébrale accompagnée dans certains cas par la présence de symptômes convulsifs. Ces tests sont également utilisés pour évaluer l'innocuité de nouveaux produits pharmaceutiques à induire des crises épileptiques.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et est mise en œuvre à grande échelle au sein des laboratoires de pharmacologie. Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs (souris, gerbille ou rat) ou de chiens, dans certains cas, 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'activité cérébrale et sur le comportement animal de façon à prédire leur efficacité clinique ou leur

innocuité sur le système nerveux central. 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 pour les 5 prochaines années, nous utiliserons environ 32920 rongeurs et 90 chiens. Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

4251. Dans la plupart des cas, le problème clinique en oncologie n'est pas la tumeur primaire, car elle peut être enlevée chirurgicalement, mais la propagation métastatique qui est la principale cause de mortalité des patientes atteintes de cancer du sein. Par des tests *in vitro* (cellules cancéreuses mammaires humaines), notre équipe a montré qu'une enzyme est impliquée dans la modulation de l'agressivité des cellules cancéreuses mammaires peu agressives qui expriment cette enzyme. En effet, l'inhibition de son expression par une approche génétique (siRNA) induit une augmentation de la croissance cellulaire et de la capacité invasive de ces cellules. Par ailleurs nous avons montré dans le cadre d'étude clinique que l'expression de cette enzyme est un marqueur de bon pronostic dans les tumeurs mammaires et que son expression diminue progressivement de la glande mammaire normale à la métastase.

Nous avons maintenant développé, à partir de cellules cancéreuses mammaires plus agressives n'exprimant pas l'enzyme à l'état sauvage et permettant d'obtenir des métastases expérimentales chez la souris immunodéficiente, des cellules génétiquement modifiées pour réexprimer cette enzyme ou son mutant sans activité enzymatique. Nous avons dans un premier temps montré que la surexpression de l'enzyme sauvage inhibe l'agressivité de ces cellules *In vitro* (test de migration et d'invasion *in vitro*). Pour valider ces résultats en conditions physiologiques notre objectif est d'utiliser *in vivo* ce modèle cellulaire sur 209 souris pour mesurer le rôle de cette enzyme sur le développement de tumeurs (100 souris : greffe dans le coussinet adipeux mammaire) et étudier son effet sur le développement de métastases (109 souris : injection dans la veine caudale).

Les avantages attendus sont la validation *in vivo* du rôle inhibiteur de métastase de cette enzyme qui pourrait alors être un nouveau gène cible pour de nouvelles approches thérapeutiques visant à inhiber la propagation métastatique des tumeurs mammaires. Les dommages attendus sur les animaux vont être le développement de tumeurs (liés aux greffes de cellules cancéreuses) ou de métastases.

Lors de ce projet nous appliquons les 3R de la façon suivante:

Remplacer: les premières études ont été réalisées *in vitro* sur plusieurs lignées cellulaires humaines de cancer du sein afin de valider notre hypothèse.

Réduire: Seule l'enzyme dont le rôle *in vitro* a été démontré sera testée, le développement de cellules génétiquement modifiées nous permet de réduire la variabilité entre les cellules et donc le nombre de type cellulaire à tester *in vivo*.

Raffiner: grâce à l'enrichissement du milieu mis en place au sein de notre établissement et en choisissant des points limites suffisamment précoces. Ces points limites nous permettront d'obtenir des résultats scientifiquement valides tout en réduisant au maximum la durée de l'expérimentation et ainsi le développement des tumeurs.

4252. Les communications inter-ventriculaires (CIV) représentent la malformation cardiaque la plus fréquente chez l'enfant. Leur traitement a longtemps consisté en une fermeture chirurgicale. Ce traitement, bien que donnant de très bons résultats, est tout de même associé à une morbidité importante liée à la chirurgie ainsi qu'à plusieurs complications comme les shunts résiduels ou les ré-interventions multiples. Depuis environ 20 ans, le développement des techniques de cathétérisme interventionnel permet l'occlusion de la majorité des shunts, notamment inter-auriculaires de manière sûre et peu invasive dès l'enfance (à partir de 10-15 kg). Cependant, les prothèses développées jusqu'ici pour la fermeture des CIV péri-membraneuses ont été associées à une morbidité significative, notamment du fait de la survenue tardive de troubles de conduction de type bloc auriculo-ventriculaire (BAV) mais aussi du fait d'embolisation, d'infection ou de thrombose des prothèses.

Une société a mis au point une nouvelle prothèse de fermeture de CIV péri-membraneuse, fabriquée en nitinol, dont le design et la conformation devraient permettre d'éviter les complications précédemment observées avec les autres dispositifs. Ces données sont théoriques et doivent être validées *in vivo*.

Ce projet a pour but de évaluer la faisabilité, l'innocuité et l'efficacité de la nouvelle prothèse et de fournir une base expérimentale en vue de son utilisation clinique.

Ce projet sera développé autour d'un modèle animal porcin de CIV. En effet, afin de nous permettre de répondre aux questions d'ordre clinique, des modèles animaux de pathologies humaines et des tissus animaux sont nécessaires. Le porc a été choisi en raison de la proximité de son anatomie avec l'homme, notamment au niveau du septum inter-ventriculaire de sa croissance accélérée. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans cette étude et dans le but d'obtenir un plus grand bénéfice de l'utilisation de ces animaux, nous avons fixé une limite maximale de 7 cochons au total. Il s'agit, de par notre expérience, du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité optimale et permettant une analyse statistique fiable. Si les objectifs expérimentaux peuvent être atteints par l'utilisation de moins d'animaux, alors plus aucun animal supplémentaire ne sera utilisé. D'autre part, nous sommes en mesure de pratiquer la plupart des différentes investigations à la suite les unes des autres (recherche de BAV, thrombose ou infection ainsi qu'étude de biocompatibilité,) ce qui nous permettra d'accroître la quantité d'informations obtenues à partir d'un animal et ainsi de limiter l'utilisation globale d'animaux. Les résultats de cette étude seront précieux quant à la validation de cette nouvelle prothèse permettant de diminuer le nombre de complications survenant après

fermeture de CIV chez l'enfant. Afin de prendre en compte les 3R, le raffinement sera mis en place par différentes mesures tout au long des différentes étapes du projet. Des mesures de raffinement seront mises en place lors de l'opération pour éviter leur angoisse par l'utilisation d'une prémédication adaptée ainsi qu'une anesthésie générale durant toute la procédure, lors de l'hébergement pour favoriser leur bien-être au sein de l'établissement agréé notamment par la mise en place de jouets, de pierre à sel, de box favorisant le contact des congénères) et l'entretien des animaux sera réalisé par des personnes compétentes.

4253. Le système endocannabinoïde (SEC) joue un rôle majeur dans la régulation de la balance énergétique. Le SEC est impliqué dans la régulation de l'équilibre énergétique à travers des mécanismes centraux mais aussi périphériques. La dérégulation de ce système, caractérisée par une augmentation du taux d'endocannabinoïdes dans les tissus et le plasma, est liée à l'obésité et d'autres maladies métaboliques associées (maladies cardiovasculaires, diabète de type 2). Parmi les deux récepteurs cannabinoïdes connus, le CB1 (de l'anglais « cannabinoid receptor type 1 ») a été largement étudié pour son rôle dans la balance énergétique et représente une cible potentielle dans le traitement de l'obésité et des maladies métaboliques associées.

Dans ce projet, nous évaluerons des composés qui sont de nouveaux antagonistes du récepteur CB1 (composé X et composé Y) et leurs effets sur le poids, la prise alimentaire ainsi que le métabolisme glucidique et lipidique dans différents modèles de pathologie métabolique. Le composé X agit au niveau central car il est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique tandis que le composé Y ne passe pas cette barrière et n'agit donc qu'à la périphérie. La toxicité de ces composés a été évaluée et leur innocuité aux doses administrées a été démontrée.

Nous utiliserons 300 souris C57BL/6J mâles pour trois études :

- Modèle d'animal obèse induit par l'alimentation : Analyser les effets des composés sur la prise de poids, le comportement alimentaire et le métabolisme sur des souris obèses.

- Modèle de pathologie métabolique induite par les glucocorticoïdes : Étudier le rôle préventif des composés sur une prise de poids induite par une prise chronique de corticostéroïde.

- Modèle de fibrose hépatique : Tester le rôle préventif des composés sur ce modèle dont les lésions du foie sont induites par une administration chronique de CCl4.

Nous utiliserons 200 souris CD-1 Swiss femelles pour une étude :

- Modèle d'obésité induite par l'olanzapine: Démontrer le rôle préventif des composés sur une prise de poids induite par une prise chronique de l'antipsychotique olanzapine.

L'ensemble des procédures proposées est en conformité avec les directives européennes 2010/63/UE et françaises, dans le respect des standards de soin et de bien-être des animaux, appliqués dans notre unité INSERM : hébergement en cages individuelles, régulation de la température et de l'hygrométrie et enrichissement des cages en conformité avec la réglementation d'une animalerie conventionnelle et sous le contrôle d'un vétérinaire. Les recherches seront réalisées en accord avec les recommandations institutionnelles de traitement humanitaire des animaux. Nous prendrons aussi en compte la règle des 3 R (réduire, raffiner et remplacer). Le maximum d'efforts sera fourni pour réduire le nombre et la souffrance des animaux utilisés afin d'éviter les répétitions inutiles. Des calculs statistiques de puissance ont été effectués afin de réduire le nombre d'animaux (taille des échantillons n=10 animaux) permettant d'obtenir une différence significative et de rejeter l'hypothèse nulle. Les études in vitro ne pourraient cependant pas remplacer l'utilisation d'animaux, étant donné l'aspect comportemental du projet. Enfin, le modèle animal a été choisi en accord avec la bibliographie scientifique.

4254. Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde, aussi bien dans les pays développés que dans ceux en voie de développement. De plus, l'incidence de la mortalité cardiovasculaire augmente avec l'âge, du fait, au moins en partie, d'une augmentation de l'incidence des facteurs de risques cardiovasculaire avec l'âge.

Les maladies cardiovasculaires et leurs facteurs de risques sont associés précocement à un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire. Cette monocouche cellulaire située sur la face interne de l'ensemble des vaisseaux sanguins joue un rôle central dans le maintien d'un état vasculaire optimal, notamment grâce à la formation des facteurs vasoprotecteurs comme le monoxyde d'azote. La fonction endothéliale diminue avec l'âge, ce qui se traduit entre autre par une diminution de la dilatation artérielle dépendante de l'endothélium progressive au cours du vieillissement physiologique. La dysfonction endothéliale liée à l'âge, caractérisée par une diminution de la formation des facteurs vasoprotecteurs, va favoriser le développement des facteurs de risques cardiovasculaires pouvant à terme aboutir à des événements adverses tels que l'infarctus du myocarde ou l'AVC. La plupart des thérapeutiques actuelles pour la prise en charge des facteurs de risque cardiovasculaires n'ont peu ou pas d'effet sur la fonction endothéliale. Le développement d'une nouvelle approche visant à améliorer la fonction endothéliale présente donc un intérêt majeur.

Plusieurs études épidémiologiques et cliniques ont montré un intérêt des acides gras polyinsaturés oméga 3 dans la prévention primaire et secondaire des maladies cardiovasculaires. En effet, la consommation d'oméga 3 sous forme de poisson, d'huile de poisson ou de composés purifiés a été associée à une diminution du risque cardiovasculaire dans diverses populations à risques. Ainsi, l'étude italienne GISSI-prevenzione a montré une diminution de la mortalité cardiovasculaire de l'ordre de 30 % chez des patients post-infarctus du myocarde recevant une formulation d'oméga 3.

Le but du présent projet est d'étudier l'effet d'une formulation optimisée d'acides gras polyinsaturés omégas 3 sur la dysfonction endothéliale liée à l'âge. Pour ce faire, des rats âgés respectivement de 12 semaines, de 7 mois et d'environ 20 mois recevront quotidiennement par voie orale une formulation optimisée en oméga 3, une huile contrôle ou de l'eau pendant 14 jours. Après euthanasie, les tissus seront prélevés afin de déterminer la (dys) fonction endothéliale et les répercussions vasculaires dans divers

organes (reins, cœur, poumons, aorte, artères et veines fémorales, etc.) en utilisant des techniques de réactivité vasculaire ex vivo, de biochimie, de biologie moléculaire et d'histologie.

Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est de 140 rats du fait de l'application de la règle des 3R. Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible du fait que le vieillissement physiologique est un processus complexe issu des interactions multi-tissulaires dans l'organisme. Toutefois, la mise au point de la formulation optimisée en oméga 3 et l'identification de certains mécanismes moléculaires ont été faits à l'aide de méthode alternative. La réduction des effectifs est liée à l'utilisation de techniques et à une approche statistique adaptée (ANOVA et/ou test non-paramétriques). Enfin, le raffinement se fait par une prise en compte du bien-être animal (enrichissement du milieu et soins quotidiens aux animaux).

4255. La capacité des organismes vivants à percevoir les contraintes environnementales est cruciale pour interagir avec le monde qui nous entoure. De nombreux récepteurs cutanés existent au niveau de la peau, ainsi que des structures plus complexes capables de recevoir et de traduire l'information d'un stimulus sensoriel en signal électrique. Ces récepteurs comprennent les mécanorécepteurs, les thermorécepteurs et les nocicepteurs retrouvés dans les couches superficielles ou profondes de la peau.

Notre thématique vise à comprendre les mécanismes d'ajustement de la microcirculation de la peau face à des stimulations extérieures, comme la pression ou la chaleur.

Les TRP (« transient receptor potential ») sont des canaux ioniques fortement impliqués dans la transmission d'informations du monde extérieur vers le domaine cellulaire. Les thermo TRP sont une sous famille de ces canaux et de par leur nom sont thermosensibles, répondant à des températures modérées (environ 33°C pour TRPV4).

La microcirculation cutanée et les défenses de protection de la peau face aux pressions en particulier, dépendent de la température cutanée. Le but de cette étude est donc d'identifier le rôle de TRPV4 dans les capacités d'ajustement de la microcirculation cutanée face aux pressions et à la chaleur. Nos travaux devraient enrichir la compréhension des mécanismes impliqués dans les mécanismes de défense de la peau face aux contraintes mécaniques et thermiques, jouant un rôle prédominant dans la prévention de l'escarre et la thermorégulation.

Notre projet inclut la règle des 3R.

La réactivité vasculaire cutanée repose sur une interaction fonctionnelle des systèmes nerveux et vasculaires nécessitant une approche in vivo. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert une approche intégrée. Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Les souris seront suivies avec un soin particulier et des points limites sont clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance. Ce projet concernera 810 souris au maximum.

4256. Des études récentes indiquent un lien étroit entre l'obésité, l'insulino-résistance et la composition de la microflore intestinale. Plusieurs auteurs décrivent également une relation entre obésité, diabète et infections bactériennes parodontales de type parodontites qui affectent les tissus de soutien de la dent. De manière intéressante, la prise en charge thérapeutique de la parodontite chez des sujets diabétiques permet de diminuer l'inflammation systémique et d'améliorer la sensibilité à l'insuline. Par ailleurs, selon des données récentes, une administration orale de la bactérie *Porphyromonas gingivalis* représentative des bactéries parodontales, ou de son endotoxine LPS, chez un modèle de souris obèse aggrave l'inflammation systémique et l'insulino-résistance. Néanmoins, aucune étude n'a démontré la contamination du tissu adipeux par des bactéries parodontales. Or, un état pro-inflammatoire du tissu adipeux en réponse à cette contamination pourrait entretenir voire initier l'état d'insulino-résistance.

Notre projet a pour objectifs (i) de rechercher une contamination bactérienne du tissu adipeux et (ii) d'évaluer le statut inflammatoire chez des souris obèses et diabétiques exposées à la bactérie parodontale *Porphyromonas gingivalis*. Pour ce faire, dans un 1er temps, nous rechercherons la présence d'ADN bactérien dans le tissu adipeux de souris génétiquement obèses et diabétiques (C57BL/6 homozygotes db/db) ou témoins (C57BL/6 hétérozygotes db/+) qui seront exposées à la bactérie ou à la solution véhicule. Dans un 2nd temps, nous comparerons les niveaux de production de marqueurs métaboliques et inflammatoires au niveau tissulaire et systémique chez des souris exposées à la bactérie ou à son endotoxine LPS, et vérifierons la capacité du LPS à contribuer aux effets inflammatoires de la bactérie. De plus, nous évaluerons l'activité anti-inflammatoire d'un extrait riche en polyphénols de la plante médicinale *Antirhea borbonica*, inscrite à la Pharmacopée Française et utilisée pour ses propriétés anti-diabétiques dans la médecine traditionnelle réunionnaise. Nos précédentes études in vitro ont identifié cette plante comme une source abondante en polyphénols non cytotoxiques et capables d'exercer un effet antioxydant et anti-inflammatoire sur le modèle adipocytaire murin 3T3-L1 exposé au LPS.

Ici, il est nécessaire d'utiliser un modèle animal pour rechercher la contamination bactérienne du tissu adipeux. En effet, les études sur des modèles cellulaires in vitro constituent une approche mécanistique essentielle à réaliser mais ne permettent pas de voir la capacité des bactéries à atteindre le tissu adipeux en condition in vivo et à exercer un effet pro-inflammatoire au niveau tissulaire et systémique dans un contexte d'obésité et de diabète. Le projet prévoit 72 animaux randomisés en 8 lots de 9. Ce nombre minimal d'animaux par lot est nécessaire pour observer une augmentation significative du critère de jugement principal (taux plasmatique d'IL-6). Les animaux seront maintenus dans un environnement contrôlé, dans des cages équipées d'enrichissement suffisant pour limiter le stress. Leur santé sera évaluée par un suivi visuel général et comportemental au minimum 2 fois par jour. Lors de la procédure, une anesthésie avec une valence analgésique sera pratiquée pour supprimer la douleur. Une lampe chauffante ainsi qu'un plateau chauffant permettront d'assurer l'homéostasie des animaux pendant la durée de leur anesthésie.

4257. La peau est une interface essentielle dans les maladies transmises par les tiques comme la maladie de Lyme. La transmission des bactéries responsables de la maladie induisent une inflammation cutanée, l'érythème migrant chez l'homme. Récemment, il a été montré que le microbiome cutané constitué principalement de bactéries commensales influence l'inflammation cutanée, en la réduisant notamment. Nous souhaitons analyser si ce microbiome cutané joue un rôle dans la transmission de la maladie notamment en diminuant l'inflammation au point de piqure voire en neutralisant l'infection bactérienne. En effet, toutes les personnes piquées par des tiques infectées ne développent pas une maladie de Lyme. Le microbiome cutané peut être très variable d'une personne à l'autre.

Chez certaines personnes, ce microbiome cutané pourrait faciliter la transmission de la maladie et son développement chez certaines personnes voire certains animaux, ou au contraire il pourrait empêcher la transmission de la maladie.

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

Remplacement: Notre modèle est infectieux, nous travaillons sur la peau au point de piqure et à l'interaction microbiome bactérie infectieuse, il faut donc que nous travaillions sur un modèle animal entier pour que le système immunitaire de celui-ci soit impliqué dans la réponse immunitaire.

Raffinement : Une attention particulière sera apportée aux animaux traités afin de limiter leur inconfort. Les animaux sont observés quotidiennement par du personnel compétent mais si un animal commence à avoir du mal à se déplacer, un traitement avec du paracétamol sera mis en place de suite. L'animal sera observé plusieurs fois dans la journée. Si malgré le traitement il n'y a pas d'amélioration de son état alors l'animal sera euthanasié.

Les animaux seront hébergés seuls par cage mais à proximité olfactive et visuelle de leurs congénères. Ils sont nourris ad libitum et dans leur cage il y a des enrichissements qui leur permettent de se distraire.

Réduction : le nombre de souris prévu pour le projet est réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Pour que les données soient publiables, il nous faut au moins 5 souris par point de cinétique en deux cohortes d'animaux. L'analyse statistique utilisée est student T test.

Le nombre de souris utilisées au cours de cette étude est de 1330.

4258. CD146 est une protéine de la jonction endothéliale 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 et de la péritonite. L'expression de CD146 n'étant pas restreinte aux cellules endothéliales mais retrouvée également sur les péricytes et les leucocytes, il est utile de connaître la contribution du CD146 non endothélial dans ces pathologies. Pour cela, nous utiliserons des souris chimériques qui expriment CD146 dans leurs vaisseaux mais qui n'expriment pas CD146 sur leurs cellules circulantes. Dans une optique de stratégie thérapeutique, il est nécessaire de mieux cibler CD146 et d'étudier le rôle du CD146 porté spécifiquement par les leucocytes dans ces pathologies grâce à l'utilisation de modèles chimériques. 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 tenir compte des statistiques obtenues précédemment 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). Puis, nous utiliserons le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de tests statistiques selon les résultats obtenus dans un protocole précédemment accepté, soit un total de 180 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.

4259. Ce projet a pour objectif d'étudier les conséquences d'un syndrome d'Apnées Obstructives du Sommeil (SAOS) sur les fonctions cognitives. Pour cela les effets isolés et conjoints d'une insuffisance respiratoire intermittente (hypoxie chronique intermittente, ou HCI) ainsi que d'une fragmentation du sommeil, sur l'apprentissage et la mémorisation spatiale chez un modèle animal non anesthésié (Rat) seront évalués, de même que le niveau de stress au niveau cellulaire (stress oxydatif).

Dans l'étude cet effet conjoint sera comparé aux effets isolés de chacune des interventions (Hypoxie chronique intermittente ou fragmentation du sommeil) ainsi qu'aux résultats d'un groupe contrôle.

L'objectif principal de l'étude est de pouvoir préciser les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les troubles cognitifs du SAOS et de développer un modèle animal encore plus proche de la situation réaliste du SAOS chez l'Homme en associant fragmentation du sommeil et hypoxie chronique intermittente.

Ce travail de recherche s'inscrit un cadre de recherche intégrée à l'étude des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les conséquences du SAOS. Ne pouvant être réalisé chez l'Homme il ne peut être fait que chez l'animal entier afin d'intégrer les interrelations entre les différents systèmes de régulation et fonctions.

Le nombre d'animaux à étudier a été établi de façon optimale, correspondant à celui qui permet une première significativité des résultats. Aussi, 4 groupes de 10 rats seront étudiés.

- groupe Hypoxie Chronique Intermittente isolée
- groupe Fragmentation du Sommeil Isolée
- groupe Hypoxie Chronique Intermittente ET + Fragmentation du Sommeil groupe contrôle

L'hypoxie chronique intermittente sera réalisée par variation de la fraction inspirée d'O<sub>2</sub>, de 10 à 21%, toutes les 90 secondes. Elle sera maintenue durant 14 jours puis seulement 10 heures par jour pendant 4 jours pour permettre l'évaluation concomitante de l'apprentissage et de la mémorisation spatiale. La fragmentation du sommeil sera réalisée par l'association d'une percussion mécanique des parois du compartiment contenant les animaux et d'un signal auditif selon le même calendrier que l'hypoxie chronique intermittente.

L'évaluation de l'apprentissage sera réalisée au moyen du test du Labyrinthe de Morris qui consiste à apprendre à chaque rat à localiser une plateforme immergée dans une piscine circulaire. Chaque rat aura 4 essais par séance d'entraînement (une séance par jour) pour trouver la plate-forme avec un intervalle de temps de 10 minutes entre chaque essai. Le rat aura un temps maximal de recherche de 120 secondes et lorsqu'il ne trouvera pas la cible dans le délai imparti il sera délicatement guidé ou déposé sur la plate-forme pour y rester au moins 30 secondes. Chaque essai sera enregistré par une caméra numérique installée au plafond et surplombant la piscine et les séquences seront analysées par un logiciel de localisation, repérage et suivi des trajectoires. Le dernier essai du quatrième jour sera remplacé par un test de rétention (« probe test ») durant lequel la plate-forme est retirée et la mémorisation de l'orientation spatiale est évaluée formellement par mesure de la latence pour trouver une première fois l'endroit où se trouvait la plate-forme, le nombre de fois où il va y retourner, le temps cumulé passé à cet endroit et la distance pour y parvenir. À côté de cette évaluation quantitative, une évaluation qualitative des parcours de recherche sera aussi réalisée puisqu'il est possible d'établir une classification de ceux-ci permettant une gradation de la mémorisation spatiale, depuis son absence totale à son acquisition complète.

À l'issue de ces études cognitives, l'animal sera mis à mort dans le respect des recommandations nationales et internationales pour prélèvement du tissu cérébral et son analyse ultérieure.

À chaque étape, une attention particulière sera prodiguée aux animaux pour vérifier qu'ils ne souffrent pas et qu'ils ne sont pas en mauvaise santé car ces conditions pourraient nuire à leur apprentissage. Ainsi leurs comportements général, alimentaire et social seront évalués, répertoriés et pris en compte quotidiennement.

4260. L'abus de cannabis durant l'adolescence est à l'origine de déficits cognitifs très invalidants et insuffisamment pris en charge. Ces déficits présentent des similitudes importantes avec ceux observés dans la schizophrénie, suggérant des mécanismes pathologiques communs. Sur la base de nos résultats ayant révélé une nouvelle stratégie thérapeutique pour traiter les déficits cognitifs de la schizophrénie, reposant sur l'inhibition de la voie de signalisation mTOR sous le contrôle d'un récepteur de la sérotonine, le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, les objectifs de ce projet sont de : 1) déterminer si cette voie de signalisation est à l'origine des déficits cognitifs dans un modèle de consommation chronique de cannabis durant l'adolescence chez la souris et 2) rechercher si l'administration précoce de composés bloquant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> ou la voie mTOR préviendrait l'apparition des symptômes cognitifs au stade adulte dans le modèle de consommation chronique de cannabis durant l'adolescence et le modèle développemental de schizophrénie (traitement néonatal avec la phencyclidine, PCP) .

Ce projet prévoit l'utilisation de 876 souris sauvages. Nous tâcherons d'appliquer au mieux la règle des 3R :

Remplacer: Une recherche approfondie sur Pubmed et Google Scholar (période 2005-2015) a été réalisée afin de nous assurer qu'il n'existait aucune approche alternative *in vitro* qui aurait pu être utilisée pour reproduire les altérations de développement ou de maturation corticale provoquées dans nos 2 modèles d'étude. Aucune solution alternative n'a pu être mise en évidence pour notre étude. En effet, les méthodes *in vitro* essentiellement basées sur les cultures cellulaires, ne permettent pas de maintenir l'intégrité des réseaux cellulaires et ne présentent donc pas les systèmes de communication multicellulaires nécessaires pour la réalisation de ce projet.

Réduire: nous essaierons au mieux de réduire le nombre d'animaux utilisés grâce à une approche rationnelle.

Raffiner: Nous vérifierons que les sujets soient utilisés de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales.

Plusieurs informations seront obtenues grâce à différentes mesures possibles sur le même animal: i) analyses comportementales; ii) puis fixation des tissus par perfusion intracardiaque pour l'analyse immunohistochimique. En cas de circonstances imprévues dans lesquelles un des sujets montrerait des signes de détresse, souffrance ou une perte >15% de son poids corporel, l'animal sera sacrifié par inhalation d'un anesthésique suivi d'une décapitation.

Les souris utilisées seront hébergées d'une animalerie. Les portées seront maintenues avec leur mère jusqu'au sevrage. Puis les mâles et les femelles seront séparés et hébergés dans des cages avec couvercle filtrant et contenant du coton. Les cages seront changées une à deux fois par semaine.

4261. Les déchets plastiques qui se déversent dans les océans ne peuvent se dégrader totalement. L'accumulation des particules résiduelles de plastique préoccupe l'opinion publique d'autant plus que les effets de cette accumulation sur les écosystèmes marins sont encore peu documentés. Moins visibles que les gros déchets qui flottent à la surface, les microparticules peuvent être ingérés par les organismes de petite taille et s'accumuler dans la chaîne trophique. En plus des effets physiques (blessures, obstruction, occlusion, satiété) inhérents à l'ingestion de la particule plastique, les effets chimiques liés à la composition des microplastiques (additifs) sont redoutés ; d'autant plus que ces additifs plastiques sont susceptibles d'être relargués dans le tractus digestif. Le caractère toxique de ces additifs peut ainsi être néfaste pour les organismes marins ainsi que pour l'homme s'il consomme des

produits de la mer contaminés. Parmi ces additifs, les polybromodiphényléthers (PBDE) figurent parmi les plus abondants dans le milieu naturel.

Dans ce contexte, notre projet s'attachera à évaluer, chez le bar commun *Dicentrarchus labrax*, les effets de l'ingestion de particules de microplastiques et/ou d'additifs PBDE sur (i) la teneur en contaminants des tissus, (ii) les paramètres métaboliques au niveau tissulaire et (iii) la physiologie générale au niveau individuel.

Ce projet prendra en compte la règle des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement). En ce qui concerne la règle de remplacement, ce projet nécessite l'utilisation de poissons vivants aux vues des phénomènes biologiques (contamination par voie trophique, tâche 1) et des niveaux d'organisation biologique étudiés (niveau individuel et tissulaire tâches 3 et 4). Concernant la règle de réduction, ce projet nécessite un minimum de 600 animaux. Ce nombre tient compte du nombre de poissons qui seront prélevés au cours des phases d'exposition et post-exposition. En dessous de ce nombre, les résultats ne sont plus exploitables du fait de la variabilité interindividuelle. L'espèce choisie est le bar commun *Dicentrarchus labrax*, un poisson dont la biologie et la zootechnie sont bien connues et qui est fréquemment utilisé en expérimentation. Pour respecter la règle de raffinement, l'ensemble du projet se déroulera dans des locaux dédiés et isolés, dans des conditions d'élevage respectant les besoins physiologiques des poissons et en utilisant des protocoles qui auront pour objectif de répondre à la question scientifique posée tout en limitant autant que possible le mal-être des animaux.

4262. Une perturbation de la balance entre neurones excitateurs et neurones inhibiteurs dans le cerveau est à l'origine de maladies neuro-développementales associées à un retard mental et à l'épilepsie. Ces maladies sont invalidantes et entraînent une perte d'autonomie importante avec des conséquences pour les familles et la société.

Des mutations du gène *DYRK1A* entraînent un syndrome de retard mental associé à une diminution de la taille du cerveau et de l'épilepsie. Afin d'évaluer le rôle du gène *DYRK1A* dans la perturbation de la balance entre neurones excitateurs/neurones inhibiteurs et dans l'épilepsie, nous avons généré un modèle murin avec inactivation du gène *Dyrk1a* dans les neurones excitateurs. Nous utiliserons ce modèle pour évaluer la susceptibilité des souris mutantes aux crises épileptiques induites par l'injection d'une substance pro-convulsivante, le pentylène tétrazol (PTZ).

Dans cette étude, des souris adultes mutantes *Dyrk1a* et leurs contrôles seront évaluées pour leur susceptibilité aux crises induites par le PTZ. Il faudrait en théorie entre 20 et 25 souris mutantes et 20-25 contrôles pour avoir une puissance de test suffisante pour le test statistique *Chi2* nécessaire dans l'analyse PTZ basée sur l'observation du nombre de souris faisant des convulsions. Nous prévoyons donc d'utiliser au maximum 50 souris. Toutefois, si l'effet du gène *Dyrk1a* est important, ce nombre de souris pourra être revu à la baisse. Afin d'appliquer la règle des 3R, nous utiliserons des souris qui seront déjà passés dans des tests d'analyses comportementales auparavant. Il ne nous est pas possible de remplacer les souris pour cette étude car l'évaluation de la susceptibilité aux crises épileptiques peut se faire uniquement *in vivo*.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux.

4263. Depuis quelques mois, le virus ZIKA transmis par des moustiques du genre *Aedes* représente un problème majeur de Santé Publique à l'échelle mondiale. Ce virus est un arbovirus appartenant à la famille des *Flaviviridae* du genre *Flavivirus*. L'expansion rapide du ZIKA en Amérique centrale et en Amérique du Sud est associée à une forte incidence de microcéphalies au Brésil ainsi qu'à des complications neurologiques comme le syndrome de Guillain-Barré. Cependant, les données concernant le passage du ZIKA au niveau central et la vulnérabilité du cerveau à ce virus sont pauvres, voire inexistantes.

Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons étudier l'effet de l'hyperglycémie/inflammation et de l'infection par le ZIKA sur la physiologie de la barrière hémato-encéphalique, la neuroinflammation induite et la perturbation de la neurogenèse adulte. Aujourd'hui, un nombre croissant d'études met en avant des liens entre les maladies métaboliques, comme le diabète ou l'obésité, et des troubles du système nerveux central. En effet, les personnes diabétiques et/ou obèses semblent présenter un risque accru (1) de développer (1) des troubles cognitifs (2) des démences comme la maladie d'Alzheimer ou encore (3) des accidents vasculaires cérébraux. L'inflammation et le stress oxydatif induit par ces pathologies endommageraient la barrière hémato-encéphalique (BHE : une interface complexe entre la circulation sanguine et le tissu cérébral) et perturberaient l'homéostasie cérébrale.

Cette étude sera réalisée sur 210 poissons zèbre maximum qui présentent l'avantage d'être un modèle simplifié pour la compréhension de nombreuses pathologies humaines et qui est un excellent modèle de neurogènes. Cette étude répond entièrement à la règle des 3R :

Remplacement : Afin de comprendre l'impact de la virose ZIKA au niveau central, il semble indispensable de passer au modèle animal pour étudier son passage au niveau du système nerveux central.

Réduction : les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible, tout en permettant de réaliser des études statistiques (student t-test).

Raffinement : les poissons seront placés dans des conditions optimales (cycle jour/nuit : 14h/10h ; température : 28.5°C ; oxygénation). Les animaux seront nourris 2 fois par jour avec des aliments adaptés (paillettes), et toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale.

Ces expérimentations seront réalisées en laboratoire P2+ avec toutes les précautions de rigueur.

L'utilisation du modèle poisson apparaît tout à fait pertinente pour étudier l'effet de la virose ZIKA.

4264. Ce protocole de phénotypage vise à mettre en évidence d'éventuels phénotypes observés chez des souris génétiquement modifiées et dont la mutation du gène d'intérêt (cible) n'a pas été étudiée d'un point de vue comportemental.

En effet, de nombreux projets liés à d'autres pathologies (diabète, maladies cardio-vasculaires) se concentrent sur les phénotypes liés à ces pathologies.

Lorsqu'une cible présente un intérêt scientifique, il est utile de mettre en évidence d'éventuelles altérations phénotypiques dans des tests liés au système nerveux central (SNC).

Pour cela, une série de procédures simples est mise en œuvre afin de caractériser les conséquences majeures de l'effet de la mutation génétique.

La finalité du protocole est de déterminer de manière rapide et efficace le devenir de la cible d'intérêt pour orienter les études suivantes ou encore pour mettre un terme au projet.

Ce protocole pourra s'appliquer à différents mutants dont la caractérisation au niveau du SNC n'a pas été effectuée.

Dans le cas d'une mutation inductible, une série d'injection de tamoxifène ou l'adjonction de doxycycline dans la nourriture/boisson pourront être utilisées, afin d'induire la mutation sous contrôle d'un promoteur de type CRE recombinase.

Selon le type de mutation, 24 à 48 animaux seront donc utilisés, afin de disposer de l'ensemble des contrôles nécessaires à la bonne interprétation des résultats.

Ainsi, dans le cadre d'une mutation non inductible, il y aurait deux groupes de 12 animaux. Pour une mutation inductible, nous pouvons utiliser quatre groupes de 12 animaux recevant le traitement d'induction ainsi :

- Groupe contrôle
- Groupe porteur de la séquence d'induction
- Groupe porteur du transgène porteur de la mutation du gène, mais sans séquence d'induction
- Groupe porteur du de la séquence d'induction et de la mutation. Il s'agit du groupe exprimant la mutation lorsque l'induction est faite.

Ainsi, nous utiliserons 12 animaux par groupe expérimental dans ce protocole, Avec un maximum de 4 groupes dans un même protocole.

REDUCTION: Un nombre limité de tests est défini ainsi que le nombre suffisant d'animaux pour obtenir une puissance statistique suffisante.

Notre expérience des tests pratiqués nous a permis de confirmer que ces effectifs étaient suffisants mais nécessaires pour obtenir des résultats interprétables statistiquement. Par ailleurs, il n'est pas possible de REMPLACER ces expériences avec des méthodes alternatives puisque nous utilisons les données générées par ce projet pour caractériser l'impact d'une mutation d'un récepteur dans un organisme complexe.

Ce protocole respecte ainsi les exigences de raffinement, de réduction. Tous les tests étant nécessaires et suffisants à la prise de décision.

RAFFINEMENT: lors de la réalisation de procédures stressantes tels qu'une échographie ou une prise de sang, les animaux seront anesthésiés afin d'éviter tout inconfort. Le reste des procédures repose principalement sur l'observation des animaux, ainsi, aucun dommage particulier n'est attendu. Cependant, les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien et des points limites éthiques seront appliqués au besoin.

Les tests utilisés se focaliseront sur le système nerveux central. De manière optionnelle, une étude de la fonction cardiaque sera aussi effectuée sur les animaux, afin de compléter l'analyse et de disposer d'un ensemble de données complet sur les mêmes animaux.

Les tests comportementaux cibleront leur analyse sur le rythme jour/nuit, le rythme alimentaire, le comportement émotionnel (type anxiété et dépression), la force musculaire, la coordination motrice et la mémoire.

Pour la partie cardiaque, une échographie et un électrocardiogramme pourront être effectués.

Ce protocole pourra être effectué sur plusieurs lignées pour lesquelles nous aurons au préalable une information sur l'absence de phénotype dommageable, de la part de notre fournisseur d'animaux.

Potentiellement, ce protocole pourrait être utilisé sur 3 lignées par an, sur l'ensemble de la durée du projet.

En considérant tous les effectifs maximum possibles, 48 animaux par protocole, 3 lignées par an et 5 ans de durée d'autorisation, nous atteignons un maximum théorique de 720 animaux utilisés dans ce cadre.

Il convient de mentionner que ce protocole a déjà été effectué sous le couvert d'une autorisation précédemment établie mais dont la validité arrive à terme, et que 4 projets ont été réalisés sans noter d'atteintes de points limites, ou de faiblesse liée à un effectif insuffisant.

4265. La Pyrimidine est un nucléotide essentiel dans un grand nombre de processus biologiques tels que la synthèse d'ARN et ADN. Afin d'éviter une trop forte accumulation dans l'organisme elle est dégradée par la dihydropyrimidine dehydrogenase, enzyme codé par le gène Dpyd. La mutation de ce gène va entraîner une altération de la dégradation de la pyrimidine pouvant avoir des effets toxiques sur les fonctions neurologiques (retards psychomoteurs, des convulsions, des retards de croissance, des microcéphalies, des dysmorphies, de l'autisme, des hypotonies, ou encore des anomalies oculaires), ou pouvant favoriser la génération de mutation génétique et donc le développement de tumeurs.

Afin d'étudier l'impact d'une augmentation de la concentration en pyrimidine dans l'organisme ou l'absence de dihydropyrimidine dehydrogenase sur certaines pathologies humaines, un modèle de souris KO pour le gène Dpyd a été généré. A ce jour, il a été montré que cette mutation affecte certains organes et tissus de l'organisme mais aucune conséquence pathologique n'a été mise en évidence. Le projet consiste donc à inactiver le gène dans tout l'organisme ou de manière tissu spécifique et à observer les conséquences que cela peut avoir.

Remplacement: L'approche animale se justifie par l'existence de plusieurs souris invalidées des gènes d'intérêt et réaliser une étude sur l'animal nous permettra de se rapprocher de la physiopathologie humaine.

Réduction: Nous allons utiliser 10 animaux mutants et 10 animaux contrôles. Ce nombre est réduit à son minimum nous permettant d'avoir des résultats interprétables.

Raffinement: les animaux feront l'objet d'un suivi rapproché afin d'éviter toute souffrance.

4266. Dans les élevages de petits ruminants, les parasites du tube digestif, et notamment les nématodes gastro-intestinaux (NGIs), peuvent être responsables de troubles sanitaires graves chez les animaux au pâturage et de pertes économiques majeures.

La maîtrise de ces parasitoses a longtemps reposé sur l'emploi quasi-exclusif de molécules chimiques anthelminthiques (AH) de synthèse. Cependant, les résistances à ces AHs chez les populations de vers rendent aujourd'hui ces traitements de moins en moins efficaces. Par ailleurs, la demande sociétale est forte pour réduire les intrants chimiques en élevage, ce qui se traduit par des contraintes réglementaires de plus en plus sévères, notamment l'allongement de certains délais d'attente pour le lait chez les petits ruminants. Cette combinaison d'éléments imposent de chercher des solutions alternatives ou complémentaires aux AHs de synthèse pour gérer ces parasitoses.

De nombreuses données acquises depuis près de 20 ans ont souligné les potentialités offertes par des ressources riches en tanins. Parmi celles-ci, l'emploi de légumineuses fourragères comme le sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) ou *Sericea lespedeza* (*Lespedeza cuneata*) en tant que nutriments a été validé de manière répétée. L'ensemble des données actuelles suggèrent que 1) les composés responsables de l'activité AH sont des métabolites secondaires des plantes = les tanins condensés et polyphénols associés ; 2) les effets (in vitro ou in vivo) répondent à des lois dépendantes de la dose. Par ailleurs, plusieurs résultats in vitro suggèrent qu'un seuil de concentrations en tanins dans la ration est à atteindre afin d'obtenir des effets anthelminthiques optimaux. Cependant, très peu d'études in vivo ont exploré l'influence du temps de traitement (durée de distribution des nutriments) sur l'importance des effets AH observés.

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est de déterminer l'influence de la quantité de tanins apportée dans la ration et de la durée de distribution sur leur activité AH chez des ovins infestés expérimentalement par 2 espèces de NGIs : une espèce abomasale (*Haemonchus contortus*) et une espèce intestinale (*Trichostrongylus colubriformis*). Ce projet fait suite à une première étude réalisée en 2015 qui portait sur les populations adultes de vers. Ici, le stade cible est différent : il s'agit des larves infestantes (L3) au moment de leur installation initiale chez l'hôte, phénomène qui conditionne le succès des infestations. Comme pour l'étude précédente, l'utilisation d'animaux est nécessaire car, actuellement, il n'existe pas de méthodes permettant de reproduire dans sa totalité le cycle de ces nématodes in vitro. En pratique, 36 agneaux seront répartis équitablement en 3 groupes expérimentaux, tous hébergés sur aire paillée. Les animaux des 2 premiers groupes seront nourris avec des granulés déshydratés de sainfoin contenant respectivement 4,2 et 2 % de tanins, et, au sein de chaque groupe, cette ration sera distribuée avant infestation expérimentale, soit pendant 5 jours (n=6 agneaux), soit pendant 12 jours (n=6 agneaux). Quant aux animaux du dernier groupe, ils recevront une ration sans tanins. Les effectifs au sein des différents groupes et sous-groupes, ont été calculés de manière à permettre une comparaison statistique des résultats tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Durant les 10 jours suivant l'infestation, l'état de santé des agneaux sera évalué grâce à une surveillance clinique quotidienne et à un suivi de l'hématocrite. Après euthanasie et autopsie, le nombre de vers présents dans la caillette et l'intestin des animaux des différents groupes ainsi que leur stade de développement seront déterminés.

4267. Les biofilms bactériens sont généralement définis comme des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice visqueuse. La formation d'un biofilm se fait selon un modèle bien établi et suit différentes étapes (adhésion, croissance, maturation et dispersion). On estime que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm. Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. Les bactéries du biofilm peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte et sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants que les cellules bactériennes planctoniques (non adhérentes). Ainsi, la présence de biofilm dans les infections est particulièrement redoutée en clinique (ex : sondes de ventilation mécanique, prothèses, cathéters veineux...). Parmi les espèces bactériennes largement retrouvées dans les biofilms figurent les espèces du genre *Staphylococcus* sp.

La plupart des antibiotiques n'ont qu'une activité très modérée sur un biofilm en cours de constitution (biofilm précoce) et une activité quasi nulle sur un biofilm déjà constitué (biofilm mature), ce qui conduit le plus souvent, soit à l'utilisation d'antibiotiques au long cours et à fortes doses, soit à la dépose du matériel infecté. De nouvelles pistes de développement sont actuellement explorées et certains composés tels que le composé DEB semblent présenter une activité « anti-biofilm » in vitro intéressante. Dans ce projet, nous nous proposons d'évaluer l'activité du composé DEB (en comparaison avec d'autres antibiotiques de référence) dans un modèle in vivo d'infection sur cathéter à *Staphylococcus aureus* chez la souris. Ce projet a déjà fait l'objet d'une soumission et acceptation par le comité d'éthique (Novembre 2015). L'expérience doit être répétée une seconde fois à la demande de l'industriel. Deux modèles seront testés : un modèle de biofilm précoce (utilisant 54 souris) et un modèle de biofilm mature (utilisant 36 souris). Au total, 90 souris seront utilisées. L'hébergement des animaux sera pratiqué dans un milieu enrichi, le nombre d'animaux a été réduit à 6 souris par groupe au lieu de 10 et la procédure chirurgicale a fait l'objet de différentes mises au point, permettant d'optimiser le temps et la récupération des animaux.

4268. Les addictions comportementales sont un véritable problème de santé publique, décrites par l'Association Américaine de Psychiatrie. L'étude des causes et des traitements de ce phénomène est balbutiante, entres autres en raison de l'absence de modèle

animal. L'une des addictions comportementales les plus fréquentes est le jeu pathologique, et en particulier les jeux d'argent. Notre équipe envisage la mise au point d'un modèle animal de la pratique de jeux d'argent pouvant conduire à une addiction comportementale.

Le but de cette expérience est la mise au point d'un protocole de conditionnement instrumental amenant le rongeur à associer la manipulation d'un renforçateur secondaire (un jeton) avec l'obtention de stimulations sensorielles (des sons agréables de nature musicale ou des stimuli visuels de nature agréable) occasionnellement associées à l'obtention d'autres jetons. La finalité du projet est d'étudier l'impact du stress dans le mécanisme d'addiction au jeu et les conséquences cérébrales qui en découlent

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude:

Raffinement : le protocole utilisé est basé sur un conditionnement instrumental. Il est donc très proche de la situation humaine où les joueurs ont également effectué un conditionnement instrumental pour apprendre à utiliser la machine à sous

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée car il repose sur l'étude du comportement animal.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité interindividuelle (n=32 sujets, soit 4 lots de 8 souris).

4269. Dans le contexte de diminution de la disponibilité des protéines de sources animales & végétales pour les animaux de compagnie, il est nécessaire de développer des sources de protéines alternatives et durables pour permettre d'assurer un approvisionnement en ressources adéquat pour fournir des aliments sains pour les animaux de compagnie.

L'objectif de ce nouveau protocole est de réaliser une première présentation aux chiens & chats de nouveaux ingrédients qui ont été soumis à une évaluation de risques et sont présumés sains mais où la connaissance n'est pas suffisante pour exclure l'apparition d'effets imprévus défavorables avec une certitude de 100%.

Ce protocole est désigné pour fournir l'évidence de la sécurité pour l'espèce cible tout en exposant aussi peu d'animaux que possible. Les ingrédients sont évalués à des niveaux d'incorporation dans les produits finis qui ne sont pas censés induire des effets néfastes. Cette stratégie vise à confirmer la sécurité de l'ingrédient et non pas à évaluer la toxicité ou bien à induire des courbes de doses-réponses.

Les sources de protéines alternatives incluent une large gamme d'ingrédients potentiels, incluant ceux déjà utilisés dans l'industrie agroalimentaire mais non-utilisés par notre entreprise et des ingrédients comme de nouvelles plantes, protéines d'origine microbiennes (algues, levures) ou animales (insectes,...) qui ne sont pas encore utilisés dans l'industrie d'alimentation du chien & du chat.

L'étude dure jusqu'à 3 mois selon les besoins. Pendant l'étude les chiens et les chats sont suivis cliniquement pour le poids corporel, la qualité de leurs selles, l'acceptance du repas, les vomissements, les changements de comportements ou neurologiques ainsi que pour leurs paramètres sanguins et urinaires. Par étude, un maximum de 18 animaux adultes et en bonne santé peut être réquisitionné (maximum de 54 chiens et 54 chats utilisés au total sur l'ensemble du projet).

L'utilisation de chiens et de chats spécifiquement entraînés et adaptés à nos installations et faisant l'objet d'un suivi régulier permet de réduire significativement le nombre d'individus nécessaire.

Les chiens et les chats participants à ce projet suivent des programmes spécifiques d'entraînements, d'éducation, de socialisation et d'activités quotidiennes. Ces programmes, revus par le comité éthique bien-être, permettent d'optimiser le bien-être de nos animaux.

4270. Le cortex préfrontal médian et l'hippocampe sont des aires cérébrales majeures dans les processus neurobiologiques de la mémoire. Les interactions entre ces deux structures sont essentielles pour la création et le stockage à long terme des souvenirs. Les connaissances anatomiques montrent que l'hippocampe envoie des projections sur le cortex préfrontal médian. Mais de façon surprenante, le cortex préfrontal médian n'a pas de projection directe en retour sur l'hippocampe. Le noyau Reuniens du Thalamus médian lui, envoie et reçoit des connections de ces 2 structures. Ce noyau thalamique est donc particulièrement bien placé pour assurer la communication neuronale entre l'hippocampe et le cortex préfrontal médian lors de la consolidation de la mémoire. Des données issues de tests comportementaux ont montré l'implication du noyau Reuniens dans les processus de consolidation des souvenirs. Des résultats plus récents laissent même envisager un rôle précoce du noyau Reuniens dès l'encodage d'une information.

Le but de ce projet est de mettre en évidence, s'il y a lieu, l'importance du noyau Reuniens dans l'encodage de l'information et dans les étapes les plus précoces de la consolidation. Pour cela nous allons inhiber temporairement l'activité des neurones du noyau Reuniens au moment de la création d'un souvenir dans une tâche de mémoire et tester le souvenir à court ou à long terme. Les animaux utilisés seront des rats males de souche Long Evans, âgés de 2,5 mois en début d'expérience, pour un total de 252 rats pour les 5 ans.

Ce projet respectera au mieux la règle des 3 R :

- Remplacement : les animaux utilisés sont des rats, car c'est le modèle le plus adéquate et de loin le plus fréquemment utilisé pour étudier l'implication du noyau Reuniens dans la mémoire.

- Réduction : Nous utiliserons seulement le nombre d'animaux nécessaire pour que les résultats soit valides d'un point de vue statistique. D'autres parts, nous réutiliserons des animaux pour plusieurs tests de mémoire chaque fois que c'est possible, comme pour les animaux démonstrateurs de l'information à retenir.

- Raffinement : Les rats, animaux grégaires, seront hébergés par trois afin d'éviter le stress provoqué par l'isolement et avec un bâtonnet à ronger. Les procédures chirurgicales nécessaires pour injecter dans le noyau Reuniens le système viral qui permet

l'inhibition temporaire des neurones au moment voulu, seront réalisées sous anesthésie générale. Des soins antibiotiques et anti-inflammatoires avant, pendant et juste après la chirurgie seront effectués. Les animaux opérés seront soigneusement surveillés pendant les jours qui suivent la chirurgie. D'autre part, le test de mémoire utilisé sera la transmission sociale de préférence alimentaire, test considéré particulièrement éthologique car il s'appuie sur un comportement naturel du rat et n'utilise pas une forme de conditionnement aversif.

D'un point de vue fondamental, il s'agit de comprendre l'influence précoce du noyau Reuniens dans les processus qui sous-tendent la mémoire. D'un point de vue médical, ces recherches permettront de mieux comprendre, pour pouvoir les traiter, les déficits de mémoire qui s'expriment lors d'accidents vasculaires cérébraux au niveau du thalamus, ou encore de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer.

4271. La fibrose pulmonaire idiopathique est une maladie fréquente et grave où le poumon est progressivement remplacé par une cicatrice rigide n'assurant pas les échanges gazeux.

Une famille de cellules appelées « cellules mésenchymateuses » joue un rôle de premier plan dans le développement de la fibrose. Nos travaux préalables réalisés *in vitro* et à partir de prélèvements humains suggèrent qu'un groupe de protéines appelé « complexe Arp2/3 » joue un rôle très important dans l'activation des cellules mésenchymateuses et dans le développement de la fibrose pulmonaire idiopathique.

L'objectif principal de ce projet est de faire la preuve que l'inactivation du complexe Arp2/3 protège du développement de la fibrose pulmonaire induite par une administration dans le poumon d'un médicament anticancéreux, la bléomycine, chez la souris (mâle).

Afin de nous assurer de la validité de nos résultats, Arp2/3 sera inhibé par deux méthodes différentes, une petite molécule chimique administrée par des injections sous-cutanées, et par un produit de synthèse appelé « ARN interférent » administré par voie pulmonaire.

Nous projetons également de démontrer que l'effet protecteur de l'inhibition d'Arp2/3 est lié au blocage des signaux par lesquels les cellules perçoivent la rigidité de leur environnement.

Ces résultats feront la preuve de concept d'une nouvelle famille de traitements, applicables à la fibrose pulmonaire idiopathique mais aussi à de nombreuses autres maladies fibrosantes atteignant d'autres organes.

Le nombre total de souris nécessaires pour mener à bien ce projet est de 172.

Les expérimentations ont été planifiées selon la règle des « 3R ». Remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité d'un organisme entier, par conséquent des modèles animaux sont nécessaires pour faire la preuve de l'intérêt d'une approche thérapeutique. Le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine est établi et permet de reproduire le phénomène observé chez l'homme. Réduire : les expériences ont été planifiées dans un ordre précis pour réduire le nombre d'animaux. Le nombre minimal d'animaux pour obtenir des résultats robustes a été calculé en fonction des tests statistiques utilisés et de la survie attendue des animaux. Raffiner : les administrations seront réalisées sous anesthésie. Les animaux seront élevés en communauté dans des cages enrichies avec du papier absorbant et des fragments de boîtes à œufs, et surveillés quotidiennement.

4272. Les anticorps sont des molécules qui ont la propriété de se "mouler" sur leur cible (antigène). Ils sont très largement utilisés comme outils dans de nombreux tests diagnostiques, mais également

comme médicament à "action ciblante". Ils sont par conséquent employés dans des domaines très variés allant de l'agronomie à la santé humaine.

Depuis plus de 30 ans, leurs productions *in vitro* se sont considérablement améliorées, notamment grâce aux développements de milieux spécifiques et l'apparition de bioréacteurs de plus en plus performants. Cependant, ces méthodes de culture ne sont pas toujours exploitables pour obtenir de grandes quantités d'anticorps avec certains hybridomes. En cas d'échec de ces méthodes, la plate-forme souhaite pouvoir réaliser des lots pilotes de 5 à 10 mg d'anticorps par injection d'hybridome dans la cavité péritonéale de souris. Ces quantités sont nécessaires pour caractériser ces molécules et évaluer leurs potentiels thérapeutiques ou diagnostiques.

Cette procédure qui a fait ses preuves est malheureusement très sévère pour l'animal, c'est pourquoi nous ne prévoyons le recours à cette méthode que pour un nombre limité d'hybridome, de 8 à 10 par an pendant 3 ans, soit 50 souris SCID au totale dans le respect de la règle des 3R :

- Réduire : Seulement deux animaux seront utilisés par production d'un hybridome. Les quantités théoriques d'anticorps produites seront suffisantes pour la purification et la caractérisation des anticorps monoclonaux.

- Raffiner : L'état de santé des animaux sera contrôlé tous les jours après l'injection des hybridomes, et deux uniques ponctions seront réalisées avant l'euthanasie des animaux. De plus, l'administration de morphine est prévue dans le protocole pour réduire la souffrance.

- Remplacer : Cette procédure sera employée lorsque toutes les méthodes de culture auront échouées.

4273. Nous avons développé un vaccin thérapeutique cellulaire anti-cancéreux. Le but de ce vaccin est de stimuler les défenses immunitaires des patients atteints d'un cancer, afin que celles-ci détruisent les cellules tumorales. Ce vaccin est composé d'une lignée de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), irradiée et chargée avec des antigènes tumoraux. L'irradiation des cellules prévient leur prolifération *in vivo*. Suite à celle-ci, les cellules entrent en apoptose (mort cellulaire programmée) et sont éliminées

par l'organisme. Pour des questions réglementaires, nous devons évaluer la biodistribution des cellules post injection au cours du temps, et déterminer leur persistance in vivo. Pour cela, les pDC seront radiomarquées et injectées chez la souris afin de réaliser de l'imagerie in vivo non invasive SPECT/CT (imagerie nucléaire) et des études de biodistribution ex vivo.

Au total, 54 souris NOD-SCID IL-2R $\gamma$ <sup>-/-</sup> (NSG) seront incluses dans ce protocole. Tout au long des protocoles in vivo, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme indispensables chez l'animal. En effet des tests in vitro ont déjà été réalisés pour déterminer la cinétique d'entrée en apoptose des cellules vaccinales. Il est maintenant nécessaire d'étudier leur distribution in vivo, et vérifier que ces cellules finissent bien par être éliminées dans un organisme vivant. Ceci est un prérequis réglementaire qui contribuera à l'obtention d'une autorisation d'essai clinique chez l'Homme.

Les animaux seront hébergés par groupe, avec enrichissement du milieu de vie. Un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé. Le protocole mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, stress ou souffrance en dehors du stress bref et modéré lié aux injections des cellules vaccinales, réalisées selon les bonnes pratiques vétérinaires. Les sessions d'imagerie seront réalisées sous anesthésie. Les animaux seront placés sur un lit thermostaté le temps de l'imagerie et la fréquence respiratoire sera enregistrée en continu afin de contrôler le degré d'anesthésie et de l'ajuster si nécessaire.

4274. Les troubles de la fertilité, tant chez la femme que chez l'homme, sont en constante augmentation et constituent actuellement une réelle préoccupation de santé publique. Dans son rapport publié en 2009, « The Endocrine Society » considère qu'il existe des preuves fortes en faveur d'un effet délétère des perturbateurs endocriniens sur la fonction de reproduction (fertilité, cancers, malformations) et aussi sur d'autres fonctions endocriniennes, incluant la thyroïde, l'axe neuroendocrinien, l'homéostasie de l'insuline et de la glycémie.

Le projet « anti-fractions sériques et perturbateurs endocriniens » s'inscrit dans le programme d'évaluation d'une méthode de protéomique fonctionnelle (bilan Proteomis) et la mise au point de nouveaux outils thérapeutiques dérivés des tests de floculation en tant que régulateurs neuro-immuno-endocriniens.

A l'aide de modèles pathologiques de la fonction de reproduction décrits dans la littérature, nous étudierons l'activité thérapeutique potentielle d'anti-fractions sériques administrées à très faibles doses. Leur effet biomodulateur sera évalué à différents niveaux de l'axe neuro-immuno-endocrinien, en particulier sur la rythmicité du cycle œstral et certaines cibles préférentielles des stéroïdes sexuels (par ex. taux circulants des gonadotropines).

Cette étude utilisera 140 rats, essentiellement de sexe femelle mais également quelques mâles.

Sur le plan des 3R, les précautions suivantes seront appliquées :

- remplacement : aucune méthode substitutive in vitro n'existant pour l'étude simultanée des effets complexes des perturbateurs endocriniens sur différentes fonctions physiologiques, le recours à l'expérimentation animale est indispensable
- réduction : le nombre d'animaux a été réduit au minimum en tenant compte des impératifs expérimentaux et statistiques
- raffinement : les animaux seront hébergés en groupes sociaux sur litière. Un enrichissement acoustique à une intensité modérée sera réalisé ainsi qu'un enrichissement via la présence d'un abri cartonné.

4275. Une technique d'imagerie optique en plein essor, pouvant guider l'acte chirurgical de manière très précise prend le nom de imagerie par fluorescence. La chirurgie guidée par la fluorescence nécessite une source de lumière spéciale, le plus souvent dans le spectre proche-infrarouge, et l'administration au patient d'une substance capable d'émettre un signal de fluorescence, après avoir été excitée. La fluorescence peut alors montrer au chirurgien en temps réel, des structures qui ne sont pas visibles à l'œil nu ainsi que l'état fonctionnel des organes. Cette technique permet de visualiser, par exemple, des structures anatomiques qui ne doivent pas être endommagées par le chirurgien évitant ainsi des complications ou, autre exemple, aider le chirurgien dans l'identification de la localisation idéale pour effectuer une résection digestive après avoir apprécié par fluorescence, le degré d'apport sanguin dans cette zone. De surcroît, il est possible d'administrer au patient des substances capable de reconnaître de manière spécifique le tissu tumoral et le rendre fluorescent. Ainsi, il sera possible pour le chirurgien de visualiser et retirer la tumeur dans son intégralité et donc réduire grandement le risque de récurrence.

Nous avons construit une unité de recherche au sein de l'Institut Hospitalo-Universitaire (IHU) de Strasbourg entièrement dédiée au développement de la chirurgie guidée par la fluorescence (IHU-SPECTRA).

Plusieurs essais cliniques (sur l'Homme) et précliniques seront entamés à l'IHU pour valider le rôle de la chirurgie guidée par fluorescence dans le traitement des cancers de l'appareil digestif.

Notamment, pour 1) l'évaluation de la perfusion de l'appareil digestif, 2) pour évaluer le ganglion sentinelle dans le cancer de l'appareil digestif, 3) pour évaluer les sites de biopsie lors de la surveillance d'Esophage de Barrett à travers l'utilisation d'anticorps fluorescents spécifiques, 4) pour évaluer l'amélioration du rendu diagnostique de l'endoscopie par l'utilisation d'anticorps fluorescents spécifiques pour le cancer, 5) pour l'évaluation des marges de résection dans le cancer du côlon, 6) pour évaluer les performances de nouveaux fluorophores,

En plus, nous allons tester des solutions hardware et software pour pouvoir sélectionner les systèmes les plus performants en termes de précision chirurgicale. Nous allons développer un système d'analyse d'image par ordinateur permettant une quantification du signal de fluorescence.

Le projet ELIOS remplit les conditions des 3R :

Remplacement : Pour pouvoir valider l'impact de la chirurgie guidée par fluorescence le recours à l'animal vivant est nécessaire, car les substances fluorescentes doivent être administrées en présence d'un métabolisme actif. Le Porc est un modèle de choix, par sa

taille, permettant de tester des dispositifs de taille adaptée à l'Homme, et par conséquent, un transfert de technologie plus rapide vers l'application en clinique.

**Réduction :** Ce projet ressemble une série d'applications. Pour chacune d'entre elles, quand il a été possible, un calcul de l'échantillon nécessaire et suffisant nous a permis d'établir le nombre de cochons par groupe et par application nous permettant d'obtenir des résultats significatifs. Le nombre total de sujets d'expérimentation à utiliser dans le projet ELIOS est variable entre 580 et 790 cochons sur 48 mois, distribués sur 7 procédures. Toute mesure sera appliquée pour tenir ce nombre au minimum.

**Raffinement :** le projet prévoit des procédures mini-invasives engendrant des douleurs post-opératoires modérées. Toutefois, les animaux recevront un protocole de soins post-opératoires comprenant une évaluation clinique quotidienne, des antidouleurs et des anti-inflammatoires et un régime standardisé. Des critères d'arrêt anticipé de l'expérimentation en cas de survenue d'une complication ont été identifiés

4276. La période périnatale est une fenêtre critique du développement au cours de laquelle différents stress (nutritionnel, inflammatoire, infectieux...) pourraient conditionner la survenue de pathologies à l'âge adulte. Ainsi, la malnutrition durant cette période triple le risque de survenue à l'âge adulte de pathologies métaboliques (obésité, dyslipidémie, diabète de type 2), et augmenterait la susceptibilité à développer des pathologies intestinales. L'axe de communication intestin-cerveau est un acteur majeur de la régulation de la prise alimentaire et du contrôle des fonctions digestives. Cet axe est constitué de quatre composantes principales : 1) les cellules épithéliales de la paroi intestinale dont les cellules entéro-endocrines (CEE) qui sont impliquées dans le « sensing nutritionnel » ; 2) le système nerveux entérique (SNE), régulateur des fonctions digestives ; 3) la voie vagale qui intègre les signaux neuro-endocrines vers le système nerveux central et 4) les circuits neuronaux du cerveau impliqués dans la motivation et la récompense.

#### Objectifs

Par l'étude des interactions entre les quatre composants de l'axe « intestin-cerveau », l'objectif principal de ce projet est de mieux comprendre l'effet à long terme d'une malnutrition périnatale sur les troubles de la prise alimentaire et la susceptibilité à développer des pathologies intestinales.

#### Résultats attendus

Ce projet devrait permettre de mieux comprendre les interactions entre les différents acteurs de l'axe intestin-cerveau et les mécanismes impliqués dans les modifications de ces interactions dans un contexte physiopathologique de malnutrition périnatale. Ces études pourraient permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour des pathologies métaboliques (obésité, diabète de type 2) et intestinales (le syndrome de l'intestin irritable, SII).

#### Méthodologie

Nous utiliserons au maximum 1490 animaux (294 mères gestantes et 1184 rats conservés en post-sevrage, 2 fondateurs rats CCK-GFP et 10 reproducteurs). Sur des rats Sprague-Dawley et des rats CCK-GFP génétiquement modifiés.

Nous utiliserons 2 modèles d'empreintes nutritionnelles :

1) des rats nés avec un retard de croissance intra-utérin (RCIU) obtenu par restriction protéique de l'alimentation des femelles gestantes.

2) des rats nés de mères ayant eu une alimentation riche en graisses et en sucres pendant la gestation et la lactation.

Sur ces modèles nous étudierons l'évolution des préférences alimentaires par l'utilisation de différents tests comportementaux (bottle-tests et physiocage) réalisés à différents stades (J25 : enfance, J50 : adolescence et J100 : jeune adulte).

Des enregistrements électrophysiologiques sur tranches de cerveaux (après mise à mort des animaux) seront réalisés sur des animaux juvéniles (J15-25) dont les mères ont eu une alimentation déséquilibrée (soit restriction protéique vs contrôle soit régime Western Diet vs contrôle).

Pour étudier l'Interactions CEE/SNE et l'effet des peptides de la satiété sur différents circuits cérébraux (circuits de la récompense, hypothalamus) nous procéderons à des injections intra-péritonéales (i.p.) de peptides gastro-intestinaux et de gavage de nutriments sur nos rats à différents temps.

#### Application de la règle des 3R :

**Réduire :** Nous avons calculé le nombre d'animaux minimum nous permettant d'obtenir des résultats statistiquement interprétable (n=12 pour les comportements, tenant compte de la variabilité interindividuelle sur ce genre de test, et n=8 par groupe pour les expériences CCK sur rats transgéniques). L'utilisation d'un tel nombre devrait nous éviter de devoir répéter l'expérience. Nous utiliserons le même animal, autant que possible, pour les analyses comportementales, synaptosomes, prélèvements de sang portal et périphérique, ganglions plexiformes, intestin, cerveau...

**Raffiner :** Les animaux sont au moins 2 par cages (sauf phase expérimental de mesure de préférence) avec un tunnel en plastique leur permettant de jouer et de se cacher. L'ensemble des protocoles ne devrait pas entraîner de souffrance pour les animaux, cependant ils feront l'objet d'une visite quotidienne, y compris le week-end (procédure mise en place depuis septembre 2013). Une grille comportementale pour chaque animal sera complétée avec des points limites à partir desquels les animaux seront pris en charges pour supprimer leur souffrance ou seront mis à mort si cette souffrance est trop importante.

En ce qui concerne les tests comportementaux, dès le sevrage les animaux sont manipulés, caressés individuellement (30 secondes à 1 minutes / rat / jour) pour les habituer à la présence de l'expérimentateur. Le but est qu'ils soient non stressés lors de la phase expérimentale garantissant des résultats reproductibles associés à un meilleur bien-être animal.

**Remplacement :** Il s'agit d'une étude in vivo et ex vivo de l'axe intestin cerveau dans le cadre d'une alimentation périnatale perturbée. Hélas, il n'existe pas de méthode alternative permettant de rendre compte de la complexité des mécanismes mis en place et du remaniement de cet axe, comme des modélisations mathématiques ou des modèles in vitro. L'utilisation du modèle de rat né avec un retard de croissance intra-utérin est un excellent modèle d'étude de la nutrition périnatale couramment utilisé dans

le monde et à l'UMR 1280 depuis des années. Notre UMR utilisent déjà en routine un grand nombre d'outils d'analyse (biologie moléculaire, biologie cellulaire, études des fonctions digestives, comportements...) spécifiquement adaptés aux rats.

4277. La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements et la compréhension des mécanismes sous-jacents. Certains de ces mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant l'utilisation de techniques d'immunohistochimie par exemple. Ces méthodologies ne peuvent être réalisées qu'au travers d'une approche préclinique.

C'est la raison pour laquelle nos travaux se basent sur l'utilisation du modèle du stress chronique léger imprédictible (SCI). De façon intéressante, il s'agit du seul modèle pour lequel il existe une signature moléculaire commune entre la dépression humaine et celle existant après stress chronique imprédictible chez la souris. Ce modèle de stress chronique imprédictible a également été validé pharmacologiquement, et semble le mieux adapté et le plus pertinent pour étudier la pathophysiologie de la dépression et le mécanisme d'action des antidépresseurs (ADs).

Le but de cette expérience est d'évaluer les effets d'une augmentation de la neurogenèse adulte sur la vulnérabilité au stress traumatique en réalisant une batterie de tests comportementaux usuels.

Pour cette expérience, 60 souris sont requises soit 4 lots de 15 souris.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude:

Raffinement : les stress appliqués aux animaux peuvent être qualifiés de léger à moyen, sans stress physique de type nociceptif. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes).

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chronique chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire in vitro n'est disponible. Les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité interindividuelle (n=15 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

4278. L'objectif de ce projet est de mieux comprendre le ressenti émotionnel des chevaux lors d'une pratique à laquelle les chevaux sont régulièrement soumis (le brossage et la mise en place de la selle) et de tester l'intérêt d'une pratique optimisée en termes de bien-être pour l'animal. Trente-deux juments, réparties en deux lots de 16 juments de 2 et 3 ans (race Welsh) seront étudiés. Les chevaux seront manipulés quotidiennement pendant quatre semaines, 10 min/jour.

Dans le lot « pratique standard », les animaux seront brossés et sellés selon la pratique la plus fréquemment observée dans les centres équestres (en accord avec une étude préliminaire réalisée dans 11 centres équestres).

Dans le lot « pratique optimisée » les animaux seront brossés et sellés, selon une pratique améliorée (ajout de caresses aux zones préférées pendant le brossage, et distribution de récompenses alimentaires pendant la pose de l'équipement).

Afin d'évaluer le ressenti émotionnel des chevaux, le comportement, la posture et les expressions faciales des animaux seront analysés lors de chaque séance de manipulation. Des dosages hormonaux seront réalisés à partir de prises de sang et de prélèvements de salive en début, milieu et fin de protocole. En fin d'expérimentation des tests dits de « choix » entre le manipulateur et un humain inconnu, ainsi que des tests de « réunion/séparation avec le manipulateur » seront réalisés afin de comparer les lots.

Prise en compte de la règle des 3R

Remplacement : Compte tenu de l'objectif du projet qui est de mieux comprendre le ressenti émotionnel de l'espèce équine et d'améliorer les pratiques équestres, le modèle animal ne peut être substitué par un autre type de modèle.

Réduction : Aucune étude n'a jamais précisément comparé les deux types de manipulations que nous envisageons, nous n'avons donc pas de données pour envisager les écarts attendus entre les lots. Néanmoins, une étude publiée en 2008 qui comparait deux procédures de manipulation sur une vingtaine de chevaux au total avait néanmoins montré quelques différences statistiques entre lots. Nous avons décidé d'étudier davantage d'animaux que dans cette étude et d'avoir un effectif de départ de 32 chevaux au total. Ce nombre nous permettra d'envisager d'éventuels cas de retrait (2/lots), et d'être certain d'avoir au moins 14 animaux / lot pour les tests statistiques, ce qui nous paraît un effectif adapté pour envisager des différences significatives.

Raffinement : Les chevaux seront hébergés en stabulation en groupe. Les animaux disposeront de litière de paille, de foin et d'eau à volonté. Aucun animal ne sera isolé au cours des manipulations ou des prélèvements. Lors des manipulations ou des prélèvements, en cas d'agitation trop importante ou de signes excessifs de nervosité, l'animal sera sorti du dispositif expérimental et remis en contact avec ses congénères. Toutes les manipulations se feront sans aucune douleur pour les animaux.

4279. Thème de Recherche :

Développement d'un modèle animal de pathologie des voies biliaires pour l'apprentissage en chirurgie laparoscopique, endoscopique et percutanée.

Le traitement des maladies bénignes et malignes du tractus gastro-intestinal et des complications des traitements, chirurgicaux ou autres, fait de plus en plus appel aux techniques guidées par l'image, la laparoscopie, la robotique, l'endoscopie flexible et la radiologie interventionnelle.

Utilité et nécessité des expériences sur l'animal :

Ces modalités thérapeutiques sont exigeantes sur un plan technique et requièrent un apprentissage ciblé qui utilise des mannequins, des simulateurs et des modèles ex-vivo, pour un apprentissage des gestes et manœuvres élémentaires. Lorsque ceux-ci sont maîtrisés, l'apprentissage doit être poursuivi sur des modèles animaux vivants, dont l'anatomie est proche de celle des humains, qui permettent de placer l'étudiant dans des conditions très proches de la réalité clinique. Ces différentes étapes sont indispensables avant de passer à l'activité clinique sous supervision.

Ce processus de formation des opérateurs a été validé depuis l'émergence de la chirurgie laparoscopique à l'IRCAD de Strasbourg, dont les protocoles d'éducation ont été approuvés par le Comité d'Éthique National (ref : aaa.2015.01.074). Le développement des techniques et technologies en endoscopie flexible et en imagerie interventionnelle en élargissent chaque jour les champs d'actions, leur permettant d'être utilisées dans des pathologies de plus en plus complexes.

Cette évolution impose une adaptation continue des méthodes et des modèles d'apprentissage.

Le but de ce projet est de développer un modèle animal de pathologie des voies biliaires (dilatation, sténose) qui permettra l'apprentissage de la chirurgie guidée par l'image utilisant l'endoscopie flexible et les techniques d'imagerie médicale couplées à la chirurgie percutanée (dilatation, stents, drainage interne ou externe). En effet, l'exploration laparoscopique, endoscopique ou par imagerie des voies biliaires intra- et extra-hépatiques est difficile à simuler en raison du manque de modèles disponibles. La voie biliaire non obstruée des animaux expérimentaux est insuffisante en raison de son étroitesse. Pour résoudre ce problème, nous visons à développer et à évaluer des modèles de formation pour la chirurgie des canaux biliaires.

Ce modèle est différent de ceux approuvés dans le protocole validé parce qu'il implique une phase de préparation, suivie d'une courte période de survie avant la session d'apprentissage. Le projet sera réalisé en 2 phases, impliquant 30 animaux, le succès de la première conditionnant la seconde. La première phase (12 animaux) consistera en le développement du modèle et son essai, la seconde phase (18 animaux) consistera en la validation du rôle éducatif du modèle.

Justification du choix de l'espèce :

Le porc fermier est l'animal de référence pour différentes raisons : son anatomie présente tous les éléments nécessaires à la reproduction des procédures humaines ; l'approche chirurgicale est très réaliste par rapport aux conditions de la chirurgie humaine, son coût est raisonnable par rapport aux bénéfices escomptés.

Ce projet remplit les conditions des 3R :

- Remplacement : les simulateurs et les pièces anatomiques sont utilisés pour les apprentissages élémentaires. L'animal permet seul de contrôler la viabilité et l'efficacité chirurgicale d'une procédure évoluée. Il sera substitué chaque fois qu'un simulateur permettra de valider un apprentissage.
- Réduction : Un animal est utilisé de façon prolongée par deux chirurgiens, qui peuvent réaliser différentes procédures, dont celle proposée dans cette étude, au cours de chaque séance. Si une même procédure peut être répétée chez le même animal au cours de la même séance, le nombre d'intervenants sera augmenté pour limiter le nombre d'animaux utilisés.
- Raffinement : Cette étude prévoit une phase de préparation du modèle, réalisée sous anesthésie générale, suivie d'une courte période de survie (3 jours) avant la session d'apprentissage des procédures effectuées également exclusivement sous anesthésie générale. La courte période de survie n'inclut pas de gestes diagnostiques ou thérapeutiques et un suivi journalier des animaux sera assuré. Le sacrifice après apprentissage est effectué sans réveil pour ne pas engendrer de souffrances animales.

Le projet prévoit des procédures mini-invasives engendrant des douleurs post-opératoires modérées. Toutefois, les animaux recevront un protocole de soins post-opératoires comprenant une évaluation clinique quotidienne, des antidouleurs et des anti-inflammatoires et un régime standardisé. Des critères d'arrêt anticipé de l'expérimentation en cas de survenue d'une complication ont été identifiés.

4280. Afin de répondre aux exigences réglementaires pour la constitution d'un dossier de demande d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) ou d'extension d'AMM pour un produit déjà enregistré, l'évaluation de l'immunogénicité d'une formulation vaccinale doit être réalisée chez les espèces cibles dans les conditions réelles d'utilisation préconisées par le fabricant.

Ces études consistent à démontrer la durée de l'immunité des vaccins testés. L'évaluation de ces produits ne peut se faire que sur les espèces cibles en respectant la voie d'administration, la dose vaccinale injectée et le programme de vaccination. La durée de ces études peut varier de 1 à 24 mois. Un suivi sérologique est réalisé afin de s'assurer de la présence d'anticorps après vaccination. Suite à la vaccination, les animaux pourront présenter de légères réactions locales au site d'injection et une augmentation de la température corporelle. Au cours de ces études, plusieurs prélèvements sanguins seront réalisés sur les animaux afin de suivre la prise vaccinale. A l'issue de ces essais, selon le cas, les animaux seront soit transportés vers un autre établissement pour être soumis à une épreuve, soit mis à mort afin de respecter le principe de précaution, soit gardés en vie.

Conformément à la pharmacopée européenne, la durée d'immunité des vaccins doit être démontrée in vivo. Ces études sont conduites, en règle générale de la façon suivante : environ 16 animaux par groupe sont inclus avec au minimum 2 groupes. En effet, en fin d'étude, une partie des animaux (environ 8) est maintenue sur site pour une revaccination et l'autre (environ 8) est transférée vers un autre établissement utilisateur afin de poursuivre l'étude. En moyenne, il est réalisé une étude par an sur chaque espèce d'où l'utilisation de 160 bovins, 160 porcins, 160 ovins, et 160 caprins sur 5 ans.

Afin de permettre aux animaux de s'adapter à leur environnement et de s'assurer de leur bon état de santé, une période d'acclimatation sera dispensée avant traitement.

Tout au long de leur hébergement, les animaux auront des conditions d'hébergement adaptées et optimales (logement, environnement, alimentation, apport en eau, soins). Afin de les maintenir, les paramètres d'ambiance, l'aliment, l'abreuvement seront vérifiés quotidiennement. De plus, afin d'augmenter leur bien-être, les animaux seront hébergés collectivement et disposeront d'un environnement enrichi.

Dans le but de repérer rapidement toute anomalie, les animaux seront suivis quotidiennement. Ainsi, si un animal montre des signes de pathologie, de souffrance ou de douleur, le vétérinaire (ou tout autre personne compétente) interviendra pour mettre en place un traitement thérapeutique et/ou des soins divers dans le but de le soigner ou de le soulager.

4281. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont les polluants environnementaux les plus fortement représentés en milieu urbain avec des sources d'exposition quasi-inévitables. Ils sont capables d'entraîner la mort des hépatocytes, des cellules du foie. Or, l'agression répétée du foie peut conduire au développement de cancers hépatiques, dont la survie à 5 ans est faible (moins de 20 %). L'objectif de ce projet est donc de rechercher des biomarqueurs précoces, permettant de dépister un risque accru de développement de ce cancer et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques en amont de l'apparition de la maladie afin de la prévenir. Dans ce contexte, nous allons nous intéresser aux vésicules extracellulaires libérées par les hépatocytes agressés et étudier les modifications de leurs caractéristiques physicochimiques en fonction de l'agression. L'objectif ultime sera de rechercher ces mêmes biomarqueurs dans les fluides biologiques de l'Homme. Par la suite, nous déterminerons comment ces vésicules sont capables d'exercer une toxicité sur d'autres cellules du foie ce qui nous permettra d'identifier de nouvelles cibles de prévention du cancer en cas de risque avéré. Ceci fera ultérieurement l'objet d'une demande en complément. L'obtention des hépatocytes à partir de foie de rat adulte de sexe masculin est une procédure sans réveil, sans douleur, sous anesthésie et de courte durée (10 à 15 minutes). La durée du projet est programmée à 3 ans. L'obtention des cellules, des vésicules et leur analyse nécessitera 136 rats.

Le projet cherche à respecter au maximum le principe des 3R. Remplacement : notre volonté est de travailler sur cultures de cellules pour limiter au maximum l'usage des animaux ; cependant, le risque pour les hépatocytes issus de lignée cellulaire (sans usage d'animaux) est la perte des enzymes nécessaires à la transformation des contaminants environnementaux en métabolites toxiques et donc une mise en évidence de biomarqueurs invalides ; c'est la raison pour laquelle nous souhaitons travailler avec des hépatocytes issus de foie de rat, pour lesquels la présence de l'ensemble des enzymes est assurée. Réduction : nous avons choisi de traiter uniquement les cellules et pas les animaux par les contaminants de l'environnement ; cela permet d'éviter d'une part, une éventuelle souffrance de ces animaux par exposition aux contaminants de l'environnement, et d'autre part une multiplication des conditions de traitement des animaux ; en outre, les expériences sur les cellules seront organisées de façon à utiliser la totalité des cellules isolées d'un foie de rat pour réduire le nombre d'animaux. Raffinement : les animaux seront maintenus en groupes sociaux dans un environnement enrichi.

4282. L'anxiété est un état émotionnel déclenché en réponse à un stimulus non spécifique perçu comme potentiellement dangereux dans un futur plus ou moins incertain. Deux types d'anxiété peuvent être distingués : l'anxiété-état variant en fonction des stimuli environnementaux et l'anxiété-trait caractéristique permanente et stable d'un sujet donné existant en dehors de tout événement menaçant. Bien que l'anxiété soit une réaction émotionnelle normale, elle peut devenir pathologique et interférer avec la capacité d'adaptation aux différents événements de la vie, voire altérer l'intégrité de l'organisme. Avec une prévalence au cours de l'existence d'approximativement 15 à 30 % de la population adulte, l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires qui régulent l'anxiété physiologique, aussi bien que leurs dysfonctions en condition pathologique, est essentielle puisqu'elle relève du domaine de la santé publique. L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une sérine protéase synthétisée par les cellules endothéliales, initialement décrite pour sa capacité à cliver le plasminogène en plasmine. La plasmine, protéine active, permet alors la dégradation de la fibrine, constituant majeur des caillots sanguins. Des études ultérieures ont également démontré la présence de tPA au niveau du système nerveux central (SNC) où il est capable de dégrader la matrice extracellulaire (MEC) lui conférant ainsi une implication dans la migration neuronale au cours du développement ainsi que dans les phénomènes de potentialisation et dépression à long terme chez l'adulte. Cependant, le tPA est bien plus qu'une simple protéase de la MEC. Synthétisé par les neurones, il est ensuite stocké dans des vésicules pré-synaptiques. A la suite d'une dépolarisation, il est libéré de manière calcium-dépendante dans la fente synaptique par exocytose et peut alors être recapté par les astrocytes. Au niveau de la synapse, plusieurs mécanismes d'action autres que la dégradation de la MEC ont été décrits et pourraient expliquer son rôle dans les processus de plasticité. Nous pouvons citer entre autres son interaction avec le récepteur N-méthyl-D-Aspartate (NMDA) assurant une modulation positive de la signalisation glutamatergique et l'activation de facteurs neurotrophiques tel que le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor).

Quelques rares études se sont intéressées à l'implication du tPA dans l'anxiété-état et suggèrent que le tPA est nécessaire au déclenchement de la réponse comportementale face à un événement menaçant l'intégrité de l'organisme. Cependant, il n'existe à ce jour aucune étude décrivant l'implication du tPA dans l'anxiété-trait. Par ailleurs, le rôle des principaux inhibiteurs du tPA (PAI-1 : inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène de type 1 ; NS : neuroserpine) dans l'anxiété-trait et/ou état n'a jusqu'alors jamais été exploré.

Notre projet de recherche consiste donc à approfondir et étendre les connaissances actuelles sur l'implication des axes tPA / PAI-1 et tPA / NS dans les comportements de type anxieux (anxiété-trait et anxiété-état).

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-après.

-La souris est l'espèce animale la plus utilisée dans les études des troubles émotionnels. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que les tests comportementaux largement décrits dans la littérature pour quantifier les états anxieux. La

communauté scientifique dispose pour ces études de modèles déficients en tPA, en PAI-1 et en NS et de leurs homologues de type sauvage.

-Les données de la littérature relatant, entre autres, la forte variabilité interindividuelle des comportements de type anxieux, nous avons consulté un biostatisticien avant de procéder au plan expérimental de ce projet afin de nous assurer de l'utilisation d'un nombre minimal d'animaux. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est de 40 par génotype, soit un effectif total de 320.

-L'état de chaque souris sera contrôlé quotidiennement afin de s'assurer de son bien-être. L'animal sera immédiatement soigné (ex. administration d'un agent antiseptique) s'il présente des blessures légères (causées par exemple par un congénère dominant au sein de la cage d'hébergement). En revanche, si un animal montrait des signes cliniques de souffrance (ex. perte de poids > 5% du poids initial, absence de réaction...), celui-ci serait immédiatement retiré du protocole et euthanasié selon les procédures décrites dans le paragraphe 4.2.

4283. La coordination des fonctions exercées par l'organisme repose sur des systèmes de communication qui maintiennent l'équilibre fonctionnel indispensable à la vie. L'un d'eux, le système neuroendocrinien, agit en sécrétant des substances chimiques, les hormones, dans la circulation sanguine où elles diffusent jusqu'à leurs tissus cibles afin d'exercer leur action.

Nous cherchons à déterminer l'influence de la testostérone sur le contrôle de la sécrétion des hormones exercé par l'EphB6, un des membres de la famille des éphrines, car nous avons récemment observé des modifications de la libération des catécholamines uniquement chez les mâles dans un modèle murin n'exprimant plus l'EphB6. L'utilisation des cellules chromaffines in vitro pour tester l'effet de la testostérone n'est pas possible car les cellules ne peuvent être maintenues en culture plus de quelques jours.

Nous souhaitons comparer la libération des catécholamines mesurée sur cellules chromaffines de la glande médullo-surrénale isolées à partir de souris mâles n'exprimant pas EphB6 castrées (orchidectomie chez la souris mâle) ou non et mises en culture 2-3 jours. Nous envisageons que l'absence de testostérone chez les individus castrés prévienne l'effet observé sur les mâles déficientes en EphB6. Une douzaine d'individus par groupe (castré ou non castré) devrait permettre de réaliser un nombre de mesure suffisant afin d'obtenir des différences statistiquement (test Mann-Whitney) différentes entre les groupes. Cette étude nécessitera donc l'utilisation de 24 souris. Les mesures de raffinement consisteront en la mise en place d'une couverture analgésique per et postopératoire de la chirurgie et le maintien des souris en groupes sociaux dans des cages enrichies (nids végétaux, barreaux à ronger).

4284. L'ataxie spinocérébelleuse 7 (SCA7) est une maladie héréditaire dégénérative rare affectant principalement le système nerveux, tels que le cervelet et la rétine. SCA7 est causée par une mutation dans la protéine ataxine-7, une protéine dont la fonction reste inconnue. Une étude préliminaire sur le poisson zèbre a été réalisée, afin de faciliter les analyses grâce à sa transparence et à sa reproduction massive, mais aussi par soucis de substituer le modèle mammifère classique, la souris, par un modèle vertébré. Pour étudier la pathophysiologie de SCA7, nous avons récemment obtenu un nouveau modèle souris Knock-in SCA7, qui récapitule les caractéristiques principales de la maladie humaine.

L'objectif principal de ce projet est de faire une analyse des symptômes sur le long terme afin d'établir l'âge de début et le niveau de progression de la pathologie. A terme, ces informations vont permettre de mieux comprendre les atteintes fonctionnelles en corrélation avec les anomalies histologiques et moléculaires, et de préparer des protocoles expérimentaux adéquats dans le but de tester des stratégies thérapeutiques.

Dans cette optique, avec un groupe de 20 animaux maximum, nous allons effectuer une analyse longitudinale à 4 âges différents, établis selon les données de nos études préliminaires, afin de raffiner l'aspect qualitatif et quantitatif de l'étude, et de réduire le nombre d'animaux requis.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante: (1) Le nombre d'animaux utilisé sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. (2) Le projet vise à étudier l'effet d'une protéine mutée sur la fonction, la morphologie et la survie des organes, ce qui ne peut pas être modélisé in vitro avec des cellules en culture. (3) Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes. Les animaux seront logés dans les meilleures conditions possibles, avec un raffinement dans chacune des cages. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie.

4285. La variante de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (v-MCJ) est liée à la transmission de l'agent (le prion) responsable de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) à l'Homme, vraisemblablement par voie orale. Des cas de contamination secondaire inter-humaine par transfusion sanguine ont été décrits en Grande-Bretagne, et la récente découverte d'une proportion importante de porteurs sains (apparemment près de 200 fois plus que de cas cliniques détectés) impose d'évaluer ce risque expérimentalement pour proposer des solutions de sécurisation adaptées.

Lors d'une contamination par voie périphérique (voie orale ou parentérale, notamment intraveineuse), les prions se répliquent dans un premier temps au niveau des organes lymphoïdes avant d'envahir le système nerveux. Cette réplification a lieu notamment au niveau des cellules folliculaires dendritiques situées au centre des follicules lymphoïdes. Dans le cadre de contaminations expérimentales par transfusion sanguine dans un modèle de primate non humain, une maladie neurologique inattendue centrée sur une atteinte de la moelle épinière a été observée de façon reproductible au laboratoire. Cette maladie est associée à une accumulation du prion dans la rate en dehors des follicules lymphoïdes, plus précisément au niveau des structures parenchymateuses. Cette nouvelle forme de maladie à prion est également transmissible expérimentalement aux rongeurs.

Le but de ce projet est de déterminer si la phase de réplication périphérique de certaines souches de prion peut avoir lieu en dehors des structures lymphoïdes, donc en impliquant des mécanismes pathologiques différents de ceux connus. Aucun modèle alternatif *in vitro* (amplification en milieu acellulaire ou modèle cellulaire) ne permettant à ce jour d'étudier cette question, nous envisageons d'exposer des rongeurs immunodéficients (dépourvus desdites structures lymphoïdes fonctionnelles) à différents isolats de prion par voie intraveineuse. Ces mêmes isolats seront administrés par voie intracérébrale à d'autres animaux à titre de contrôles. Un total de 16 isolats sera administré à 224 rongeurs immunodéficients (nés et élevés en captivité) afin d'optimiser le nombre d'animaux utilisés et d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Après inoculation, les rongeurs seront surveillés cliniquement tout au long de l'expérience, ce qui nous permettra d'intervenir de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. A l'installation de signes neurologiques évidents, les animaux seront euthanasiés et la présence du prion sera recherchée dans différents organes cibles (cerveau et organes lymphoïdes principalement) par des techniques biochimiques et immunohistologiques.

Les protocoles expérimentaux ont été validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux hébergés permettent de garantir le bien-être des animaux. Les animaux sont hébergés selon les règles en vigueur dans l'animalerie incluant un enrichissement de leur cage.

4286. Suite à un traumatisme (hémorragie, trauma crânien,...), un phénomène d'immunosuppression apparaît chez les personnes admises dans les services de réanimation aboutissant à une augmentation de la probabilité de survenue d'une infection secondaire comme une pneumopathie.

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sont les 2 bactéries fréquemment responsables de ces infections. Ces bactéries expriment différents systèmes de virulence qui affectent la réponse immunitaire de l'hôte. Cette réponse immunitaire de l'hôte fait intervenir différents acteurs cellulaires tels que les polynucléaires neutrophiles et les macrophages alvéolaires. Récemment, il a été montré un rôle croissant des cellules NK ou natural killer dans la réponse de l'hôte à une infection bactérienne. Les cellules NK ont un rôle direct contre les bactéries et indirect en régulant l'activité du système immunitaire de l'hôte.

Le but de notre étude est :

- 1-de caractériser le rôle des cellules NK dans un modèle de pneumonie aiguë chez la souris ;
- 2-d'évaluer l'impact des facteurs de virulence sur la physiologie des cellules NK et la réponse de l'hôte ;
- 3-d'évaluer l'impact de la déplétion des cellules NK dans la souris préalablement à l'infection.

Pour cela, 1372 souris Swiss femelles vont être utilisées. Après avoir induit une pneumopathie (infection des poumons) aux souris, les poumons des souris sont prélevés afin de réaliser diverses analyses (bactériologiques et inflammatoires).

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'utilisation d'animaux pour l'évaluation du rôle des cellules NK et l'influence des facteurs de virulence des bactéries nous permet d'appréhender les interactions intercellulaires (cellules NK-neutrophiles, cellules NK-macrophages) et permet leur étude au sein d'un microenvironnement infectieux très difficile à reproduire fidèlement *in vitro*. Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. Et le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude.

4287. Les personnes accueillies à l'hôpital suite à un choc hémorragique (par exemple : accidents de la route, plaie ouverte) développent très fréquemment des pneumonies (infections nosocomiales) suite à une baisse transitoire des défenses de l'organisme (système immunitaire) et l'apparition d'un état d'immunosuppression.

Les cellules de l'immunité innée telles que les cellules NK et les cellules dendritiques jouent un rôle primordial dans le contrôle de l'état d'activation du système immunitaire.

Afin d'éviter un emballement de notre système de défense et éviter ainsi l'apparition de maladies inflammatoires chroniques, les cellules NK ont la capacité d'éteindre l'activation des cellules de l'immunité (rôle anti-inflammatoire).

Suite au choc hémorragique on observe un changement phénotypique de ces cellules NK qui tendent vers une fonction anti-inflammatoire excessive. Cette réponse anti-inflammatoire excessive pourrait être à l'origine de l'incapacité des malades dans les services de réanimation à réagir contre une contamination bactérienne expliquant ainsi l'augmentation de leur susceptibilité à l'infection.

Le but de notre étude est de comprendre les mécanismes impliqués dans le changement phénotypique des cellules NK (1ère Partie) et de comparer l'effet de 2 glucocorticoïdes couramment utilisés aux urgences sur l'évolution d'une pneumonie bactérienne post-hémorragique (2ème Partie).

Pour cela nous aurons besoin de 1452 souris, soit 524 souris pour la 1ère Partie (constituée de 5 sous-groupes), pour comprendre le changement phénotypique des cellules NK observé pendant le choc hémorragique. Et 928 souris pour la 2ème Partie (constituée de 9 sous-groupes) où on pourra comparer l'effet des deux glucocorticoïdes utilisés aux urgences et voir comment ils pourraient agir directement sur les cellules d'intérêt et restaurer leur fonctionnalité. L'effet de ces traitements sera évalué en fonction de l'évolution de la pneumonie post hémorragique.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduite, Raffiner).

Le nombre de souris a été réduit au minimum possible tout en permettant une analyse statistique fiable. Enfin, le bien-être des souris est surveillé tout au long de l'étude.

4288. Parvenir à une acceptation du greffon à long terme, sans traitement immunosuppresseur, et sans rejet chronique, constitue un but majeur, mais encore inaccessible en transplantation d'organe en clinique. Le foie est un organe au statut immunologique particulier. Cela se traduit en clinique par une fréquence élevée de tolérance spontanée après allotransplantation, puisqu'environ 20% des patients transplantés tolèrent un greffon hépatique après arrêt de leur traitement immunosuppresseur, mais aussi au niveau préclinique, par une capacité à induire une tolérance au produit d'un transgène exprimé dans le foie, après transduction par des vecteurs de thérapie génique. Au cours de nos précédents travaux, nous avons mis au point une stratégie d'induction de tolérance par transfert de gène dans le foie. Nous avons montré qu'un protocole de thérapie génique consistant à exprimer spécifiquement dans le foie de souris receveuses, des alloantigènes de souris donneuses permet d'induire une tolérance immunologique à une greffe allogénique. Les mécanismes immunologiques impliqués ont été identifiés et font intervenir l'expansion d'une population de lymphocytes T régulateurs hépatiques. Ces résultats sont en cours de publication. Nous souhaitons maintenant évaluer la robustesse de la tolérance induite. En effet, le transfert de gène permet l'expression d'une molécule de CMH I allogénique à la membrane plasmique des hépatocytes de la souris receveuse. Que se passe-t-il en cas d'inflammation hépatique ? Y a-t-il un risque de rupture de la tolérance, ce qui aboutirait à une hépatite fulminante, ou bien la tolérance est-elle dominante ? La réponse à cette question est nécessaire avant d'envisager un développement plus avancé vers l'application clinique de notre stratégie.

Le but de ce projet est d'évaluer la stabilité de la tolérance allogénique induite par transfert de gène hépatique à la suite de perturbations par des signaux proinflammatoires de 3 types : la concanavaleine A qui mimera une attaque du parenchyme hépatique par des cellules immunitaires, le LPS/D-galactosamine, qui mimera une attaque résultant d'un choc septique, et enfin l'acétaminophène qui mimera une hépatotoxicité médicamenteuse.

Le nombre d'animaux utilisé sera de 945 souris pour combiner un nombre réduit d'animaux (optimisation des groupes contrôles et des temps de sacrifice des animaux) avec une pertinence statistique. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher.

4289. Depuis plusieurs années, l'intérêt pour la conception et le développement de systèmes de délivrance de médicament de taille nanométrique (<1µm) a augmenté de façon spectaculaire. Nous développons des nanocapsules lipidiques qui permettent d'encapsuler des principes actifs. Ces nanovecteurs présentent un intérêt majeur pour l'administration par voie orale de principe actif présentant une faible biodisponibilité. De plus, ces nanovecteurs présentent de nombreux avantages dans la prise en charge des pathologies cancéreuses après administration intraveineuse. Le projet faisant l'objet de cette demande d'autorisation est donc dédié à l'évaluation chez des rongeurs de ces nanovecteurs administrés par voie orale et par voie intraveineuse. Un maximum de 206 rats seront inclus dans ce projet pour répondre aux problématiques explorées. Les tests statistiques dépendront des résultats obtenus (Mann et Whitney ou Student). Ce nombre d'animaux a été réduit au maximum pour que les résultats obtenus soient exploitables, statistiquement significatifs afin d'éviter d'avoir à refaire les manipulations et non critiquables. Des points limites liés au comportement de l'animal (état général et masse de l'animal) ont été fixés et les animaux les atteignant seront euthanasiés. De plus, Les animaux seront hébergés dans des cages enrichies en tenant compte de la réglementation en vigueur concernant la densité d'animaux par cage ainsi que les conditions nécessaires à leur bien-être. Ce projet s'inscrit donc dans une démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale en respectant la «règle des 3R ».

4290 Le glioblastome (GBM) humain est une tumeur cérébrale de haut grade caractérisée par une croissance rapide et une invasion importante dans le cerveau. Ce caractère diffus est un des facteurs expliquant l'échec thérapeutique actuel. Un des nouveaux enjeux est de développer de nouvelles approches thérapeutiques ciblées capables de réduire cette diffusion à travers le cerveau sain. Nous avons récemment montré que la molécule CD90, une protéine membranaire, contrôle l'invasion tumorale dans des modèles in vitro. Cette expression est également corrélée à un caractère très invasif de la masse tumorale observée par IRM chez les patients GBM. Nous avons démontré que le dasatinib, est capable d'inhiber la migration des cellules tumorales exprimant CD90.

L'objectif de l'étude présentée ici est de tester l'effet du dasatinib sur l'invasion tumorale dans un modèle in vivo de xénogreffe orthotopique chez la souris immunodéprimée NOD-SCID.

Pour cela, nous utiliserons un modèle murin immunodéprimé afin d'y implanter des cellules tumorales humaines, pour reproduire au mieux les conditions de formation de ces tumeurs chez l'homme. Les animaux sont produits à cet effet dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure l'élevage et le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation et la règle des 3R. De notre côté nous veillons à bien définir le projet et sa pertinence comme le stipule la règle des 3R.

En effet avant de réaliser les procédures des études de préliminaires ont été réalisées afin de remplacer chaque fois que cela est possible le modèle in vivo par des modèles in vitro. A ce stade du projet, l'utilisation de modèles animaux reste inévitable puisqu'aucun modèle suffisamment précis n'est disponible pour étudier le glioblastome et sa réponse aux traitements. L'efficacité d'un nouveau traitement passe nécessairement par ces études in vivo et l'intérêt d'avoir un modèle reproductible est essentiel pour bien appréhender l'efficacité de nouvelles molécule et ce dans le même environnement. Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochables. Au total 42 souris au maximum seront nécessaires pour cette étude. Afin de raffiner les conditions de vie des souris, un suivi adapté des animaux a été instauré afin

de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, mais aussi la détresse ou l'anxiété qu'ils pourraient éprouver. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'un enrichissement adapté. Pour cela des soins pré-, per- et postopératoires adéquats seront réalisés. Toutes les interventions sont réalisées sous anesthésie générale et des traitements analgésiques sont systématiquement utilisés pour prévenir toute douleur.

4291. La mucoviscidose est la maladie génétique humaine la plus fréquente et dont la médiane de survie des malades n'a pas encore atteint 30 ans. Cette maladie est caractérisée par une anomalie du gène CFTR. Chez les personnes atteintes, l'absence du gène CFTR fonctionnel se traduit par une augmentation de la viscosité du mucus dont l'accumulation dans les voies respiratoires et digestives. Elle entraîne des pathologies telles que bronchite ou des obstructions digestives. D'autres pathologies débilitantes pour lesquelles les solutions thérapeutiques sont sub-optimales affectent les poumons. Elles incluent l'asthme sévère, la fibrose pulmonaire et les métastases de divers types de cancers. Pour ces maladies, la thérapie génique pourrait fournir de nouvelles approches thérapeutiques. Notre projet vise à développer de nouveaux vecteurs synthétiques dans lesquels des acides nucléiques (ADN ou ARN modifiés) sont associés à des composés organiques pour former des particules capables de promouvoir un transfert de matériel génétique dans les poumons. La caractérisation *in vitro*, ainsi que les tests *in vivo* visant à sélectionner de meilleurs vecteurs est effectuée chez la souris. La deuxième étape effectuée consiste à tester les vecteurs synthétiques de transfert de gène sélectionnés chez des animaux dont la pathologie et la taille sont plus proches de l'homme. Pour cette pré-étude, nous utiliserons 8 porcelets sains nouveau-nés qui seront anesthésiés et auxquels nous administrerons la formulation en une seule fois par voie intratrachéale. Un suivi sanguin sera régulièrement effectué pour examiner les réponses immunitaires (dans le sérum) et cellulaires (cellules blanches du sang) sur une période de 48 heures. Après 48h, différents prélèvements pulmonaires seront réalisés afin d'évaluer l'intégration du matériel thérapeutique dans le poumon. Remplacement : le projet portant sur une nouvelle thérapeutique à visée humaine et déjà validé *in vitro* et chez le modèle souris, il nous est impossible de remplacer le modèle animal proche du modèle humain. Les animaux utilisés sont des porcelets qui proviennent d'élevages autorisés. Réduction : le projet prévoit une pré-expérimentation sur 8 animaux afin de valider l'efficacité thérapeutique sur un nouveau modèle animal. Le nombre a été réduit au minimum pour permettre une analyse statistique fiable. Raffinement : il y aura un enrichissement social (vie en groupe et visites toutes les 2 heures) et de structure (mise en place de tapis de sol, de couvertures et de lampes chauffantes).

4292. Franchissement de la barrière d'espèce par le virus rabique (EBLV-1a) de chauve-souris

Ce projet est une demande de prolongation de la durée de l'agrément d'un projet accepté dont seule la première procédure a déjà été réalisée.

La rage est une maladie due à l'infection par un virus. Tous les mammifères sont sensibles à la rage et peuvent la transmettre par morsure, le virus étant excrété dans la salive. De plus certaines espèces domestiques (chiens) ou sauvages (renards, chiens viverrins, certaines espèces de chauves-souris) sont à la fois vectrices et réservoirs de "souches" virales qui leur sont très bien adaptées. La rage est une maladie toujours mortelle dès que les signes cliniques sont apparus, elle est à l'origine de 50 000 à 75 000 décès annuels dans le monde, principalement en Afrique et en Asie, le plus souvent suite à une morsure de chien. Le traitement antirabique administré chez les personnes exposées au virus est une vaccination dont le but est de rendre résistant l'individu contaminé avant que le virus n'atteigne le système nerveux central. Dans le monde, 12 des 14 espèces reconnues de virus rabique ont été isolées chez des chauves-souris. En Europe, 3 virus différents ont été isolés chez des chauves-souris : EBLV-1 (European Bat Lyssavirus type-1), EBLV-2 et BBLV (Bokeloh Bat Lyssavirus). La majorité de ces cas de rage chez les chauves-souris est causée par un des 2 variants du virus EBLV-1. Huit cas de franchissement de la barrière d'espèce ont été observés en Europe: 3 cas humains avec EBLV-2 et EBLV-1 et 2 moutons, 1 fouine et 2 chats avec le variant EBLV-1a. La majorité des études épidémiologiques, moléculaires et de pathogénicité concerne RABV, à l'origine des cas humains. Peu d'études expérimentales ont été menées i) sur des carnivores sauvages et domestiques avec les virus isolés des chauves-souris, ii) sur le franchissement de la barrière d'espèce par les virus EBLV.

Nous nous proposons d'utiliser le modèle renard afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec les études publiées et le variant EBLV-1a qui a seul franchi, de manière naturelle, la barrière d'espèce. L'étude préliminaire a montré que ce virus est pathogène pour le renard. Cette procédure correspond à une étude dose-effet entreprise sur 15 animaux. Après inoculation, l'excrétion salivaire et le titre en anticorps seront suivis régulièrement. Tous les animaux qui développeront la maladie seront examinés au moyen des techniques de diagnostic de référence et des techniques moléculaires. Les animaux survivants seront euthanasiés à la fin de la période d'observation car pour montrer l'absence de réplication du virus, le diagnostic se fait sur le cerveau. Cette expérimentation ne peut être entreprise que chez l'animal, le renard étant le modèle de choix. A partir du moment où les signes cliniques seront fortement évocateurs de la rage, les animaux seront euthanasiés. Le personnel impliqué dans la manipulation des animaux est formé et entraîné, ce qui garantit à la fois la maîtrise du risque d'accident et des manipulations dans de bonnes conditions pour les animaux.

4293. Les bactéries résidant dans le gros intestin (microbiote intestinal) utilisent les constituants alimentaires qui n'ont pas été digérés dans l'estomac et l'intestin grêle. Elles les transforment en molécules susceptibles d'interagir avec les cellules de la muqueuse intestinale et d'influencer l'activité de ces dernières. Parmi ces cellules se trouvent des cellules entéro-endocrines qui, stimulées par des molécules présentes dans l'intestin (ex : molécules issues de l'aliment, des bactéries ou des sécrétions digestives telles que la bile), sécrètent des hormones dont certaines régulent le métabolisme du glucose dans l'ensemble de l'organisme. Des travaux récents conduits *in vitro*, dans des cultures de cellules entéro-endocrines, ont montré que l'indole, molécule que les

bactéries intestinales fabriquent à partir d'un constituant des protéines, le tryptophane, influençant la production d'une hormone régulant le métabolisme du glucose, le peptide GLP-1. L'objectif du projet est de vérifier l'existence de l'action de l'indole in vivo, dans les conditions réelles d'un tube digestif, permettant de prendre en compte la complexité de cet organe et de ses interactions avec l'ensemble de l'organisme. L'expérimentation in vivo permettra aussi de déterminer si l'influence de l'indole sur les cellules entéro-endocrines a des répercussions sur le métabolisme du glucose. Nous comparerons des rats dont le microbiote ne produit pas d'indole à des rats dont le microbiote en produit beaucoup. Ces modèles animaux miment les extrêmes retrouvés chez l'Homme, dont la production intestinale d'indole est extrêmement variable, selon la composition du microbiote intestinal et le régime alimentaire. En premier lieu, nous étudierons s'il existe une différence de concentration sanguine du peptide GLP-1, et d'un autre peptide ayant la même fonction, le peptide YY, entre les rats producteurs d'indole et les rats non producteurs. Puis nous étudierons si une augmentation aiguë de la production d'indole modifie la concentration sanguine de ces peptides. Pour provoquer cette augmentation aiguë, nous administrerons aux rats par voie orale une dose de tryptophane. Nous étudierons ensuite si une augmentation chronique de la production d'indole modifie sur le long terme la sécrétion de ces peptides par les cellules entéro-endocrines et dans quelle mesure cette modification a des répercussions sur le métabolisme du glucose. Pour ce faire, la nourriture des rats sera enrichie en tryptophane pendant plusieurs semaines. Dans ces nouvelles conditions alimentaires, la concentration sanguine des peptides YY et GLP-1 et la glycémie seront comparés chez les rats producteurs et non producteurs d'indole, quelques jours puis plusieurs semaines après le début du régime enrichi. Enfin, pour savoir si l'indole pourrait interférer avec l'action d'autres constituants intestinaux sur la sécrétion des cellules entéro-endocrines, les rats seront gavés avec certains de ces constituants : de l'huile alimentaire et de la bile. La validation et l'extension in vivo des résultats obtenus au préalable in vitro permettront de mieux documenter la nature des interactions entre microbiote intestinal et cellules entéro-endocrines, phénomène important dans la régulation du métabolisme du glucose et, par conséquent, dans l'équilibre métabolique de l'organisme.

Le protocole a été conçu au mieux pour respecter la règle des 3 R :

- Remplacer : des travaux in vitro, en cultures cellulaires, ont été conduits au préalable, comme preuve de concept. - Réduire : deux groupes de rats aux propriétés extrêmes, ne produisant pas d'indole ou en produisant beaucoup, ont été conçus pour faciliter la mise en évidence de l'action de l'indole. Dans ces conditions, un nombre de 10 rats par groupe a été estimé nécessaire et suffisant pour pouvoir mettre en évidence des différences statistiquement valides, soit un total de 20 rats. De plus, nous utiliserons les mêmes animaux pour conduire les différentes phases du protocole (comparaisons de base, puis après augmentation aiguë de la production d'indole, puis après augmentation chronique). - Raffiner : les rats seront hébergés par 2 dans des cages contenant une litière de copeaux de bois, enrichie de papier à déchet et de buchettes à ronger. L'eau et la nourriture seront accessibles à volonté et les paramètres ambiants seront contrôlés régulièrement (température, etc.). Les administrations orales de produits (tryptophane, glucose, huile, bile) seront effectuées par des personnes expérimentées à l'aide de sondes œsophagiennes conçues pour éviter tout traumatisme (profil lisse, forme incurvée, embout en forme de boule) ; les volumes administrés seront adaptés au poids de chaque animal. Les prises de sang consécutives à ces administrations orales seront aussi effectuées par des personnes expérimentées ; elles se feront par une piqûre à l'aide d'une aiguille à la veine de la queue et le volume de sang adapté au poids de l'animal et strictement nécessaire aux analyses sera récolté. Un intervalle de deux semaines sera respecté entre chaque série d'administrations orales et prises de sang.

4294. La production d'anticorps polyclonaux est un projet d'immunisation consistant à la production d'un nouvel anticorps grâce à l'utilisation de peptides innovants. Les anticorps produits seront utilisés notamment pour la recherche (immunologie, immunohistochimie, biomédicale), en médecine, pour la réalisation de test de diagnostic... Ce projet respecte la réglementation relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques en vigueur.

La production d'anticorps polyclonaux consiste à produire des anticorps par injection à un animal d'un antigène cible, couplé le plus souvent à un adjuvant dans le but d'amplifier la réponse immunitaire. Des injections de rappels de l'antigène peuvent avoir lieu pour obtenir une réponse humorale plus importante.

Suite aux administrations, des réactions locales (gonflement, abcès...) et générales (augmentation de la température corporelle, perte de poids, diminution d'activité...) peuvent être observées. De plus, des prélèvements de sang réguliers sont effectués pour évaluer le titre d'anticorps. Lorsque celui-ci est jugé suffisant, un prélèvement sanguin plus conséquent est réalisé afin d'obtenir les anticorps polyclonaux recherchés. Dans certains cas, les animaux pourront être euthanasiés afin de récupérer la quasi-totalité du volume sanguin circulant.

La production d'anticorps polyclonaux nécessite l'utilisation d'animaux puisqu'il n'existe aucune méthode substitutive pour cette production. Environ deux peptides innovants par an sont à administrer aux camélidés dans le but de produire des anticorps indispensables à l'avancement de la recherche et de la médecine et le développement de test de diagnostic. Le nombre d'animaux est choisi en fonction des volumes de sang que l'on peut prélever afin d'obtenir une quantité d'anticorps satisfaisante. Le lama permet d'obtenir des quantités de sérum suffisantes à l'atteinte des objectifs du projet, sans porter atteinte au bien être de l'animal. Ainsi, un seul lama sera immunisé par étude permettant ainsi d'obtenir une quantité de sérum suffisante. Comme deux peptides innovants par an sont développés, deux études par an pourront être réalisées d'où l'utilisation de 10 lamas sur 5 ans.

Dans le cadre de ces études, le lama inclus aura une période d'acclimatation de 7 jours lui permettant de s'adapter à son environnement et de s'assurer de son bon état de santé. De plus, tout au long de son hébergement, l'animal disposera de conditions d'hébergement adaptées. Ainsi, il bénéficiera d'un logement, d'un environnement, d'une alimentation, d'un apport en eau et en soins appropriés à sa santé et à son bien-être. Dans cette optique, bien qu'un seul animal soit inclus par étude, le lama inclus sera hébergé avec au minimum un autre de ses congénères et/ou avec d'autres espèces compatibles, dans un environnement enrichi. Afin de maintenir des conditions optimales d'hébergement, les paramètres d'ambiance, l'aliment, l'abreuvement seront vérifiés quotidiennement.

Dans le but de repérer rapidement toute anomalie, l'animal inclus sera suivi quotidiennement. Ainsi, si un animal montre des signes de pathologie, de souffrance ou de douleur, le vétérinaire (ou tout autre personne compétente) interviendra pour mettre en place un traitement thérapeutique et/ou des soins divers dans le but de le soigner et de le soulager.

4295. Les personnes prises en charges à l'hôpital suite à traumatisme sévère comme par exemple une blessure de la colonne vertébrale (= traumatisme médullaire), suite à un accident de la route, développent très fréquemment des pneumonies (infections pulmonaires) suite à une baisse transitoire des défenses de l'organisme (système immunitaire) dite d'immunosuppression. Il est connu que le système nerveux module et influence le système immunitaire. Par différentes études, il a été découvert que les patients ayant un traumatisme médullaire (SCI) ont une phase d'immunosuppression (« défaillance » du système immunitaire) dans laquelle les lymphocytes T du système immunitaire sont dans un processus dit d'exhaustion. C'est un processus où les lymphocytes T perdent leur habilité à tuer des cellules cancéreuses, ou des cellules infectées par des microbes. Ces cellules ont alors une augmentation de l'expression du récepteur 1 de mort programmée (PD-1), contribuant à cet état d'immunosuppression. Cette réponse du système immunitaire par l'expression excessive de PD-1 pourrait être à l'origine de l'incapacité des malades dans les services de réanimation, à réagir contre une infection bactérienne, expliquant ainsi l'augmentation de leur susceptibilité à l'infection. En cancérologie, l'immunothérapie par anti-PD1 est d'actualité et montre dans le mélanome des résultats prometteurs, et des études similaires sont effectuées dans d'autres cancers. En traumatologie, l'immunothérapie a été pour le moment effectuée sur des modèles de septicémie (infection d'un microbe dans l'ensemble du corps). A l'arrivée de nos nouveaux résultats, l'immunothérapie par anti-PD1 sera testée sur notre modèle de murin de traumatisme médullaire (SCI). Les objectifs de cette étude seront de poursuivre notre étude de l'immunosuppression (IS) dans un modèle murin de traumatisme médullaire en mettant en place une immunothérapie précoce, afin d'éviter une infection de ses animaux et donc éviter qu'ils ne meurent d'infection opportuniste. Cette étude se divise en 2 parties : 1-Evaluer la dose d'anti-PD1 à injecter pour une meilleure survie des animaux SCI, suite à une pneumonie à *Staphylococcus aureus* ; 2- Rôle et modulation du système immunitaire suite au traitement avec l'anticorps anti-PD1, dans notre modèle murin. Pour cela, 484 souris seront utilisées au cours de ce projet qui se divise en 2 parties. Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Le nombre de souris a été réduit au minimum possible tout en permettant une analyse statistique fiable (Réduire). Afin de limiter toutes sources d'angoisse et de souffrance la réalisation du modèle de lésion médullaire est effectuée sous anesthésie générale. Les animaux du modèle reçoivent de l'analgésique avant l'opération, puis 1 fois par jour pendant 3 jours, pour éviter toute souffrance. Les souris sont conservées dans des cages de taille suffisante, et avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Le bien-être des souris est surveillé tout au long de l'étude tous les jours, avec un remplacement journalier de la litière et une mise en place d'un enrichissement par frisos, et en évaluant l'état général des animaux, et des points limites sont mis en place. En cas d'éventuels signes de souffrance les animaux sont euthanasiés (Raffiner). La corrélation in vitro-in vivo n'étant pas satisfaisante, le recours à l'utilisation de modèles animaux est indispensable dans notre étude.

4296. Les infections sont une des premières causes de mortalité infantile évitable. Dans une étude rétrospective menée sur la population des enfants admis en réanimation pour une infection communautaire sévère les experts ont diagnostiqué un taux de 76% de prise en charge sub-optimale chez les enfants décédés (DIABACT I). Il a été montré également que les soins sub-optimaux étaient significativement plus fréquents chez les enfants décédés que chez les survivants (DIABACT II).

Afin de préciser les déterminants des soins sub-optimaux et d'identifier des pistes d'amélioration, une étude prospective (DIABACT III) a été menée dans 6 CHU du Grand Ouest, incluant, entre août 2009 et décembre 2013, 270 enfants dont 64 infections à pneumocoque.

Dans le cadre d'une infection 3 déterminants sont fondamentaux : l'hôte, l'environnement et la bactérie. Les nombreux éléments de l'évolution de la maladie recueillis au cours de DIABACT 3 sont en cours d'analyse pour déterminer si la prise en charge de l'enfant a été optimale. De même, les prédispositions génétiques des enfants sont aussi étudiées, à la recherche de facteurs de susceptibilité aux infections bactériennes sévères. Enfin, le rôle de la bactérie et de ses facteurs de virulence est aussi en cause dans l'évolution des patients, nous les étudierons dans ce travail.

Dans le monde en 2012 on estime à 1,3 millions le nombre de décès d'enfant imputable aux pneumopathies dont le pneumocoque est le principal agent.

De nombreux travaux ont déjà décrit les mécanismes d'action des facteurs de virulence du pneumocoque lors d'infections invasives, essentiellement sur des souches isolées chez des adultes. Dans ces études l'infection invasive est définie par la présence du pneumocoque dans le LCR ou des hémocultures, sans notion de contexte clinique. On ne retrouve aucune étude dans la littérature étudiant la virulence de souches isolées sur une grande cohorte d'enfants atteints d'une infection invasive sévère comme dans le cadre de DIABACT 3. On sait que les facteurs de virulence de *S. pneumoniae* jouent sur son interaction avec le système immunitaire, notamment en induisant une réponse inflammatoire disproportionnée. Il est prouvé que les différents sérotypes n'ont pas le même potentiel de conduire à une infection invasive, et que l'expression des facteurs de virulences ainsi que la réponse inflammatoire induite varient selon le type de souche. En France en 2012, chez l'enfant de moins de 15 ans les sérotypes 1, 24F, et 12F prédominent dans les infections invasives.

Connaître le sérotype des souches de DIABACT 3 et étudier la réponse inflammatoire qu'elles induisent semble donc une des clés pour comprendre leur virulence.

Afin de limiter la réaction inflammatoire excessive, différentes thérapeutiques anti inflammatoires (corticoïdes, statines, macrolides) sont en cours d'évaluation. En parallèle il a récemment été montré que le linézolide avait des propriétés anti-inflammatoires propres dans les pneumopathies à staphylocoque. Il serait intéressant de l'étudier dans les pneumopathies à

pneumocoque, en le comparant aux antibiotiques de référence : l'amoxicilline et la ceftriaxone, afin de déterminer s'il permet de diminuer les lésions pulmonaires par un meilleur contrôle de la réponse inflammatoire.

Le modèle animal de prédilection pour étudier le pneumocoque est la souris. Il permet d'analyser la survie, la dissémination des souches et la réaction inflammatoire. Cette dernière peut être étudiée via la détermination de marqueurs de gravité pulmonaire : taux de cytokines pro-inflammatoires, mesure de l'activité myéloperoxidase, étude histologique et immunologique, et taux de perméabilité vasculaire. Ces paramètres ont été validés dans plusieurs études de pneumopathies murines à pneumocoque et à staphylocoques.

Objectif principal de l'étude :

Caractériser, sur un modèle murin de pneumopathie, les facteurs de virulence de souches de pneumocoque isolées dans un contexte d'infection invasive sévère de l'enfant. Une fois l'infection pulmonaire installée, évaluation de la dissémination des souches bactériennes testées et de la réponse inflammatoire. Enfin, ce travail s'intègre de manière plus générale dans l'étude DIABACT 3 dont l'objectif est d'améliorer la prise en charge des enfants atteints d'infections bactériennes communautaires sévères.

Objectifs secondaires :

Evaluer la réponse inflammatoire sous traitement par les antibiotiques par l'étude anatomo-pathologique de coupes de poumons infectés, par détermination de l'activité myéloperoxidase des polynucléaires neutrophiles, et dosage des cytokines pro-inflammatoires.

Le nombre de souris nécessaires à la réalisation de l'étude est de 1332. Ce sont des Swiss femelles de 6 semaines de vie.

La première partie du travail consistera à déterminer la dose létale 50 et 100% de 2 souches de pneumocoques isolées dans DIABACT III et d'une souche témoin. Durant la seconde partie, pour chaque souche, après avoir induit une pneumopathie (infection des poumons) avec la dose létale 50%, nous évaluerons 4 groupes : trois en monothérapie (linézolide, amoxicilline et ceftriaxone) et un ne recevant pas de traitement (animaux contrôles). Après l'induction de l'infection, et les traitements par antibiotiques, les poumons et la rate des souris sont prélevés à différents temps afin de réaliser diverses analyses.

Cette étude sera menée en appliquant la règle des 3R. Le nombre de souris par groupe a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable (Réduire). Afin de limiter les sources d'angoisse ou de souffrance, la réalisation du modèle infectieux ainsi que l'euthanasie sont faites sous anesthésie générale. Les souris sont conservées dans des cages de taille suffisante et avec accès libre à l'eau et à la nourriture. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude en évaluant l'état général des souris deux fois par jour avec analyse des signes généraux et des points limites seront mis en place. En cas d'éventuels signes de souffrance avec symptômes non réversibles, l'animal est euthanasié (Raffinement). La corrélation in vitro - in vivo n'étant pas satisfaisante, le recours à l'utilisation de modèles animaux est indispensable (Remplacer).

4297. L'épilepsie est l'une des affections neurologiques les plus fréquentes (plus de 60 millions de personnes dans le monde) dont l'expression clinique se manifeste par des crises le plus souvent pendant toute la vie des patients. Lors du développement de cette maladie (épileptogénèse), une réaction neuro-inflammatoire a été décrite qui participe à l'établissement de la maladie. Des études ont montré que cette réaction se maintient pendant la durée de la maladie sans que son rôle soit clairement établi.

Le présent projet s'intéresse au rôle de certaines populations cellulaires impliquées dans la réaction neuro-inflammatoire (astrocytes, microglie) qui se développe à différents stades de l'épilepsie et en particulier la phase chronique. Le rôle de ces différentes populations cellulaires semblent en effet être différent selon les phases de la maladie et la structure nerveuse impliquée. L'objectif de ce projet est d'étudier le rôle de la réaction neuro-inflammatoire présente lors de l'épilepsie en utilisant des souris transgéniques conditionnelles chez lesquelles il est possible de supprimer sélectivement une population cellulaire à un moment donné et dans une région définie.

Nous utiliserons un modèle d'épilepsie mésiotemporale (MTLE) chez la souris qui reproduit plusieurs caractéristiques de cette forme d'épilepsie chez l'homme. La MTLE est en effet généralement pharmaco-résistante et il est nécessaire de développer de nouveaux traitements chez l'homme. La souris MTLE constitue le modèle animal le plus adapté pour répondre au besoin de ce projet car plusieurs études ont montré sa similitude avec la pathologie humaine aussi bien sur le plan histologique, électrophysiologique, comportemental que pharmacologique. Lors des différentes étapes du protocole, les souris seront manipulées et surveillées minutieusement par des expérimentateurs habilités et compétents. Le nombre de souris adultes utilisées pour ce projet sera de 48, réparti en 4 groupes de 12 souris. L'utilisation de ce modèle prédictif et d'analyses statistiques appropriées, permet de réduire le nombre d'animaux sans compromettre la validité des résultats.

Cette étude devrait permettre de déterminer le rôle des populations cellulaires impliquées dans la neuroinflammation dans l'épilepsie mésiotemporale.

4298. L'ostéomyélite est une infection osseuse d'origine bactérienne caractérisée par une réponse inflammatoire aigüe ou chronique menant à une perte osseuse. *Staphylococcus aureus* est, dans à 60% des cas, la bactérie responsable avec un taux de résistance à la méticilline en constante augmentation. Ces infections nécessitent des traitements longs et des actes chirurgicaux afin de retirer les tissus nécrosés.

Le problème est d'autant plus compliqué lorsque l'infection est due à des bactéries persistantes. Ce phénomène, différent de la résistance bactérienne due à des mutations génétiques, montre que sur une même population bactérienne, une partie sera détruite par l'agent anti-infectieux tandis que l'autre partie des bactéries va cesser de se multiplier, restant simplement à l'intérieur de la cellule. Ces bactéries persistantes peuvent toutefois se retransformer en agent infectieux à croissance rapide, provoquant une rechute dès l'arrêt de l'antibiotique.

La vancomycine, la daptomycine, la rifampicine et le linézolide sont les antibiotiques les plus prescrits dans les infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM).

Le but de cette étude serait donc, à l'aide d'un modèle animal murin d'ostéomyélite à *S. aureus*, d'évaluer l'efficacité des agents anti-SARM de référence sur un couple de bactéries persistantes. Cela nous permettrait d'obtenir un modèle reproductible sur petits animaux pour la recherche de nouvelles pistes thérapeutiques.

Ce travail s'effectuera en plusieurs temps.

Le modèle sera en premier lieu validé avec deux souches de SARM responsables d'une infection initiale, puis récidivante, et isolées chez un même patient. L'objectif sera de comparer leur capacité respective à induire une ostéomyélite chez la souris à J7 et J14.

Après exposition du fémur droit de la souris sous anesthésie générale, un défaut osseux de 1mm de diamètre est réalisé par trépanation. L'infection est ensuite induite par injection dans le canal intramédullaire de 2 $\mu$ L de suspension bactérienne. Sept jours et quatorze jours après infection, les animaux seront euthanasiés et le fémur et la rate seront prélevés. Afin de déterminer les charges bactériennes, des numérations seront réalisées sur les rates et une partie des os, les autres étant destinés à des analyses histologiques.

La deuxième phase consistera à évaluer et comparer l'efficacité thérapeutique in vivo des agents anti-infectieux de référence (rifampicine, vancomycine, linézolide et daptomycine) dans le modèle murin à *S. aureus* préalablement validé. Après numération des bactéries survivantes dans la rate et dans le tissu osseux, les résultats obtenus pour les différents groupes seront comparés par un test statistique approprié.

Afin de mener à bien ce projet, un nombre de 688 souris sera nécessaire. La souche de souris utilisée pour l'ensemble de l'étude dépendra des résultats obtenus lors de la première phase. En effet, d'une souche à une autre, les résultats de l'induction bactérienne peuvent diverger énormément. Le modèle d'intérêt dans ce projet serait sur la souris Swiss mais certains essais seront également réalisés sur souris C57BL/6JRj avant de choisir définitivement le fond génétique. Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable et reproductible. Enfin le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude et des points limites seront mis en place.

4299. Lors d'une transplantation hépatique, le foie prélevé subit un grave traumatisme dû à l'arrêt total d'apport sanguin. Cet état, appelé ischémie, induit un manque d'oxygène et de nutriment et la nécrose du foie, causant de nombreux échecs de greffe. L'adénosine est considérée comme un candidat prometteur pour le traitement des ischémies hépatiques. Cependant, son utilisation clinique est extrêmement limitée car, si cette molécule est injectée par voie intraveineuse, elle est dégradée en quelques secondes dans la circulation sanguine.

Ce problème peut être résolu grâce au concept de « squalénisation ». Ce concept consiste à protéger l'adénosine en le couplant à un dérivé lipidique, le squalène et former ainsi des nanoparticules. Ces nanoparticules peuvent ensuite être administrées par voie intraveineuse et relarguent progressivement la molécule d'intérêt dans l'organisme. Dans notre cas, l'adénosine est protégée de la dégradation lorsqu'elle est sous forme de nanoparticules (NPs).

Récemment, il a été montré que la squalénisation de l'adénosine permettait de soigner des lésions consécutives à une perturbation de l'oxygénation cérébrale. Or, à l'occasion de cette étude, il a été observé que le traitement par les NPs d'adénosine-squalène (AdSQ) entraînait une accumulation de la molécule dans le foie. Ces résultats amènent à penser que ces NPs pourraient avoir une action protectrice sur les cellules hépatiques subissant une ischémie. Dans ce contexte, nous formulons l'hypothèse que la « squalénisation » de l'adénosine permettra d'améliorer de manière notable la régénération du foie endommagé.

Ainsi, le but de cette étude est d'évaluer l'activité des nanoparticules d'adénosine squalène sur le système hépatique, plus précisément l'action protectrice de cette molécule sur le foie suite à une ischémie hépatique totale.

La cible thérapeutique de notre hypothèse est le foie ischémié du fait de chirurgie (sur un organisme humain entier). Il est donc indispensable de reproduire des conditions analogues (organisme entier) pour déterminer le potentiel de cette stratégie déjà prometteuse dans le cerveau. De plus, dans leur transport depuis le site d'administration, les nanomédicaments passent à travers et sont potentiellement modifiés par plusieurs organes et systèmes, tels les systèmes humoraux et immunitaires : ces multiples processus ne peuvent pas être reproduits in vitro. De telles études doivent donc être menées chez l'animal.

Une planification statistique minutieuse a permis de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité de l'étude.

Une première procédure comparera les effets des NPs d'AdSQ à ceux du dextrose, le placebo. Nous testerons différentes doses injectées à différents temps d'administration. En cas d'absence d'effet, l'expérience prendra fin à cette étape. Sinon, les doses et les temps d'administration ayant donné les meilleurs résultats seront sélectionnés et l'effet des NPs d'AdSQ sera comparé à celui du dextrose (placebo), de l'adénosine libre (non liée au squalène) et des NPs de squalène pur (non lié à l'adénosine). Ceci permettra de vérifier que l'effet protecteur est bien dû à l'adénosine et que celle-ci n'est efficace que lorsqu'elle est squalénisée.

Ces procédures seront réalisées chez la souris adulte mâle. Les animaux seront hébergés dans des groupes stables formés d'animaux socialement compatibles. La chirurgie consiste à bloquer la circulation sanguine en amont du foie pendant 15min, puis à la relâcher. Elle sera pratiquée sous anesthésie générale et un anti-douleur sera administré avant le réveil puis 24h et 48h post-chirurgie. De l'enrichissement sera présent en permanence dans les cages et de la nourriture gélibifiée sera mise à disposition après la chirurgie. Les animaux seront pesés et surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress.

Le nombre total d'animaux prévu pour ce projet sera de 400.

4300. Le traumatisme crânien est un problème majeur de santé publique, fréquent, et potentiellement grave, tant à court terme (risque vital) qu'à long terme : handicap moteur, cognitif et émotionnel. Ces conséquences tardives sont en grande partie reliées à des lésions jusqu'ici peu étudiées : les lésions de la substance blanche, qui s'étendent dans les mois et les années qui suivent le traumatisme crânien. Plus tardivement encore, les patients ont une propension augmentée à déclarer une maladie neurodégénérative tel que la maladie d'Alzheimer, la démence ou encore la maladie de Parkinson.

L'évaluation des patients en clinique se base principalement sur les déficits neurologiques, émotionnels et cognitifs. Or, depuis des années, la recherche préclinique s'est davantage attachée aux lésions histologiques cérébrales plutôt qu'aux conséquences comportementales. Ceci, parmi d'autres causes, explique les échecs des stratégies de traitement des patients, montrées bénéfiques chez l'animal, mais sans réel effet thérapeutique en clinique. Ainsi, il n'existe toujours pas de traitement pour les patients atteints de traumatisme crânien.

Par ailleurs, s'il est connu, grâce à des études épidémiologiques, qu'un traumatisme crânien chez un jeune adulte, entraîne une augmentation du risque de développer par la suite une maladie neurodégénérative, aucune étude préclinique ne s'est penchée sur cette problématique. Or, il est probable que les conséquences lésionnelles du traumatisme crânien (e.g. inflammation, lésions cérébrales) accélèrent le vieillissement cérébral des patients traumatisés et augmentent le risque de maladie neurodégénératives.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les modifications histologiques (e.g. atrophies des aires cérébrales et marqueurs spécifiques de maladies neurodégénératives) ainsi que les modifications comportementales (e.g. déficits neurologiques, émotionnels et cognitifs) chez des souris vieillissantes, ayant subi un traumatisme crânien dans leur jeune âge. Cette étude permettra la validation d'un modèle préclinique, transrationnel d'un point de vue clinique, et donc l'étude ultérieure de nouvelles stratégies pharmacologiques, sur l'ensemble des conséquences d'un traumatisme crânien.

Les expériences seront réalisées sur des souris dont l'analgésie et l'anesthésie seront monitorées durant toute la durée de l'induction du modèle expérimental de traumatisme crânien. La bonne reproductibilité et le faible taux d'échec (10%) de ce modèle expérimental permettent de limiter le nombre d'animaux par groupe (141 souris au total). La mise en place de points-limites ainsi que l'observation quotidienne du comportement des animaux permettront d'identifier toute souffrance et douleur. Les tests comportementaux effectués, reposent sur l'évaluation de comportements spontanés, naturels ou motivés par une récompense. Par ailleurs, les animaux seront hébergés en groupes sociaux stables afin de limiter tout stress et modification de hiérarchie.