



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

Résumés non techniques des projets autorisés (44)

4401. Les cancers figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. Les origines du cancer sont multiples et font intervenir à la fois des facteurs génétiques et des agents extérieurs. Il a été démontré que la suractivation et/ou la surexpression de la protéine Rac1 (membre de la superfamille de protéines Ras) entraîne l'initiation de différentes étapes de l'oncogenèse telles que la progression, l'invasion tumorale et la formation de métastases. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'activité de Rac1 serait une nouvelle stratégie thérapeutique contre la progression tumorale et des métastases.

L'objectif de ce projet est donc de développer des nouveaux inhibiteurs de Rac1. Après un programme de recherche dédié à l'identification de nouveaux inhibiteurs, nous avons sélectionné une molécule « lead », codifiée A4.1, qui inhibe spécifiquement la protéine Rac avec une efficacité et une affinité supérieure aux molécules commerciales (EHT1864 et NSC23766). Une série chimique issue de la molécule lead a été générée et 2 d'entre elles présentent des caractéristiques prometteuses pour une utilisation thérapeutique. Ces nouvelles molécules seront tout d'abord testées pour leur tolérance en administration unique et répétée sur souris saines. Leur efficacité anti tumorale sera ensuite testée dans différents modèles de tumeurs humaines (tumeurs du sein et du poumon) chez des souris immunodéprimées.

Ce projet utilisera au maximum 1780 souris sur 5 ans

Tolérance en administration unique : 12 souris par molécule testée, 2 molécules maximum testées par an sur 5 ans : 120 souris

Tolérance en administration répétée : 24 souris par molécule testée, 2 molécules maximum testées par an sur 5 ans : 240 souris

Modèle de tumeur mammaire :

1- Pour évaluer la supériorité de l'inhibiteur par rapport à la molécule commerciale 30 souris par molécule testée : (3 groupes de 10 souris : contrôle, Inhibiteur commercial, molécule à tester), 2 molécules maximum testées par an sur 5 ans : 300 souris

2- Pour tester l'effet synergique de l'inhibiteur avec une molécule de référence : 40 souris par molécule testée (4 groupes de 10 souris : contrôle, molécule de référence, molécule à tester, association), 2 molécules maximum testées par an sur 5 ans : 400 souris

Modèle de tumeur poumons :

1 Pour la mise au point du modèle orthotopique : 20 souris

2 Pour évaluer la supériorité de l'inhibiteur par rapport à la molécule commerciale 30 souris par molécule testée : (3 groupes de 10 souris : contrôle, Inhibiteur commercial, molécule à tester), 2 molécules maximum testées par an sur 5 ans : 300 souris

3- Pour tester l'effet synergique de l'inhibiteur avec une molécule de référence : 40 souris par molécule testée (4 groupes de 10 souris : contrôle, molécule de référence, molécule à tester, association molécule de référence et molécule à tester), 2 molécules maximum testées par an sur 5 ans : 400 souris

Afin de répondre à la règle des 3 R, les souris sont suivies quotidiennement selon une grille de score permettant d'évaluer le degré de douleur et d'y remédier avec un traitement analgésique approprié. L'apport de l'imagerie permet de réduire le nombre d'animaux utilisés et de mieux évaluer l'état d'envahissement tumoral. Par ailleurs les souris sont groupées de 3 à 5 par cage avec des petits morceaux de papiers leur permettant de faire un nid.

4402. Le mélanome est le plus agressif des cancers de la peau avec 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 celle que nous proposons dans cette saisine. Depuis des années, l'objectif principal de notre équipe de recherche est de développer de nouveaux traitements contre le cancer.

Pour cela, notre stratégie est de produire un radiopharmaceutique qui doit cibler préférentiellement la cellule tumorale par rapport aux tissus sains. La cible à détruire est la cellule tumorale, l'arme est un vecteur associé à un radioélément qui va émettre un rayon « toxique » pour cette cellule. Nous disposons de différents vecteurs et de plusieurs radioéléments. Ce projet a pour objectif de tester un nouveau vecteur dans 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. Ces expériences seront faites sur des souris immunodéficientes NOD-SCID-IL-2Rg qui seront greffées par voie sous cutanée avec 4 lignées de mélanome humain. Ce projet prévoit 5 groupes constitués chacun de 20 souris. Quand les tumeurs se seront développées à J10, ces souris, par groupes de 20, recevront les différents traitements par voie intra veineuse dans un volume de 0,1mL:

A) groupe témoin

B) groupe RIT anti-PD-L1 radiomarqué

C) groupe LT spécifiques de mélanome

D) groupe RIT anti-PD-L1 radiomarqué puis LT spécifiques de mélanome

E) groupe contrôle anti-PD-L1 non radiomarqué

Pour chaque groupe, 3 études seront réalisées:

- 1) traitement et survie des animaux : 10 souris
- 2) imagerie Tomographie par Émission de Positrons (TEP) : 10 souris
- 3) impact du traitement sur la tumeur et le microenvironnement tumoral

Les études 2 et 3 se feront sur les mêmes souris.

1) Des traitements par radioimmunothérapie (RIT)

La RIT cible la tumeur grâce à un anticorps spécifique de PD-L1.

Dans nos études, en associant l'anticorps anti-PD-L1 à un radioélément, nous voulons évaluer si nous pouvons augmenter l'efficacité anti-tumorale par rapport à celle qui peut être obtenue avec l'anticorps non radiomarqué.

Pour cela, nous testerons cet anticorps associé à 3 radioéléments alpha différents (RIT- α). Ces radioéléments alpha sont cytotoxiques car ils ont des énergies importantes et des parcours d'émissions très courts.

Le traitement par RIT- α avec un anticorps anti-PD-L1 radiomarqué, sera comparé au traitement avec le même anticorps anti-PD-L1 non radiomarqué.

D'autre part, un traitement d'immunothérapie avec des lymphocytes T (LT) humains cytotoxiques spécifiques du mélanome, dans ce même modèle animal ayant déjà été initié (APAFIS 2468), nous testerons un traitement associant RIT- α anti-PD-L1 et immunothérapie par l'injection de LT spécifiques de mélanome afin d'évaluer si cette combinaison thérapeutique engendre une meilleure réponse anti-tumorale.

2) Des études d'imagerie

L'imagerie est une procédure qui permet de suivre dans un animal, la distribution d'un radiopharmaceutique à différents temps.

Elle permet également de suivre la progression tumorale et l'efficacité d'un traitement.

Nous disposons d'une micro TEP (Tomographie par Émission de Positrons) Scan qui est quantitative.

Pour réaliser cette imagerie, l'anticorps anti-PD-L1 sera radiomarqué avec un radioélément différent de ceux utilisés pour la RIT : un émetteur de positrons, qui sera injecté aux animaux par voie intra-veineuse.

3) Etudes d'impact du traitement sur la tumeur et le microenvironnement tumoral

Ces études seront faites sur chacune des 4 lignées tumorales de mélanome humain choisies.

Une étude avec une lignée tumorale et un radioélément comporte 50 souris.

Les 3 études nécessitent 100 souris, (50 pour l'étude 1 et 50 pour les études 2 et 3)

Pour 4 lignées tumorales, il faudra 400 souris.

Pour tester 3 radioéléments, il faudra 3x 400 soit 1200 souris.

Nous ajoutons 10 souris pour la mise au point de l'imagerie.

Ce projet nécessitera 1210 souris.

1) Le suivi des études de survie se fera avec des pesées, des mesures de la taille de la tumeur et une observation attentive des animaux 3 fois par semaine.

L'étude de survie se fera dans chaque groupe sur 10 souris.

Nous pratiquerons une euthanasie dès l'apparition des points limites classiques ou spécifiques.

2) L'imagerie se fera sur les groupes A, B, C, D et E à différents temps après la greffe : J10, J17, J24, J40 et J150. Les souris seront anesthésiées à l'isoflurane et placées dans une micro TEP Scan.

2 souris de chaque groupe seront imagées à chaque temps.

Après les images, ces souris seront euthanasiées pour réaliser l'étude 3).

3) Impact de ces traitements sur la tumeur et le microenvironnement tumoral

Les tumeurs seront prélevées sur 2 souris/temps après l'imagerie et nous pourrons visualiser et comparer sur des coupes de tissu tumoral l'impact de ces traitements sur la tumeur et le microenvironnement tumoral.

La durée de cette étude est de 150 jours. Le modèle animal est indispensable et non substituable pour déterminer l'efficacité thérapeutique (détection et destruction de la tumeur) et la toxicité pour les organes vitaux (foie, reins, moelle osseuse) de la RIT- α anti-PD-L1 ainsi que de nouvelles approches thérapeutiques combinées (RIT- α anti PD-L1 + ACT), dans le traitement du mélanome, avant de commencer des études chez l'homme.

L'ensemble de ce protocole prend en compte la règle des 3R :

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

Le nombre d'animaux nécessaires à cette saisine prend en compte cette règle.

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

Raffiner en hébergeant les souris dans des cages de 5 avec enrichissement.

4403. 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 celle que nous proposons dans cette saisine.

L'objectif principal de notre équipe de recherche est de développer de nouveaux traitements contre le cancer.

La cible à détruire est la cellule tumorale, l'arme est le radioélément qui va émettre un rayon « toxique » pour cette cellule.

Il faut accrocher le radioélément à un vecteur afin de former 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 dans 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.

En associant l'anticorps anti-PD-L1 à un radioélément, nous voulons évaluer si nous pouvons encore plus augmenter l'efficacité anti-tumorale de cet anticorps.

C'est un traitement d'immunothérapie dont la première étape consiste à connaître la biodistribution de cet anticorps dans la tumeur et les organes vitaux.

L'immunoconjugué anti-PD-L1-radiomarké sera injecté aux souris immunodéficientes NOD-SCID-IL-2Rg greffées par voie sous cutanée avec 4 lignées de mélanome humain.

L'objectif de cette étude consistera à étudier la distribution de l'immunoconjugué anti-PD-L1-radiomarké dans la tumeur et les organes des animaux à 6 temps différents après l'injection sur des groupes de 5 souris/ temps.

Nous pourrons ainsi comparer la fixation du vecteur sur les 4 lignées tumorales et les organes normaux avec chaque radioélément et ainsi choisir pour l'imagerie et les radioimmunothérapies le meilleur radioélément.

Ce projet devrait nécessiter l'utilisation de 480 souris NSG.

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

Règle des 3R: Réduire le nombre d'animaux utilisés en réalisant préalablement des tests in vitro sur les cellules tumorales.

Le nombre d'animaux nécessaires pour ces études 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.

4404. Les lésions cérébrales post traumatiques représentent l'une des principales causes de mortalité de la population active et l'une des premières causes d'invalidité chez les personnes de moins de 35 ans en Europe et aux Etats-Unis. Avec ses conséquences socio-économiques et sa fréquence élevée chez l'adulte jeune, le traumatisme crânien (TC) demeure une préoccupation sociale majeure à l'échelle mondiale et constitue un véritable défi de santé publique. Il n'existe pas, pour le moment, de traitement neuroprotecteur qui offrirait un meilleur pronostic fonctionnel aux patients TC. La prise en charge initiale actuelle consiste essentiellement en une lutte contre l'augmentation de la pression intracrânienne causée par l'œdème cérébral. Le mannitol et le sérum salé hypertonique constituent la base des traitements antioedémateux disponibles. Récemment, il a été décrit que l'utilisation de lactate de sodium comme traitement antioedémateux à la phase initiale du traumatisme crânien permettait de contrôler les poussées d'hypertension intracrâniennes survenant chez les patients. L'utilisation de ce produit en prophylaxie chez les patients traumatisés crâniens graves permet également une diminution significative de l'incidence des poussées de pression intracrânienne présentées au décours de l'hospitalisation. Cet effet s'accompagne d'une diminution de la balance hydrique et de la balance chlorée. Des données expérimentales et cliniques suggèrent également que le lactate est un substrat énergétique préférentiel pour le cerveau en particulier en période de stress ou dans des périodes d'augmentation importante de la demande énergétique comme après une lésion cérébrale aigüe par exemple. Ce produit pourrait donc avoir une action multiple intéressante au décours de la phase aigüe du traumatisme. Alors que des hypothèses sont déjà proposées concernant son action métabolique, les mécanismes de son action antioedémateuse ne sont actuellement pas connus.

L'imagerie cérébrale et plus particulièrement l'IRM cérébrale constitue actuellement un outil indispensable pronostique mais également d'évaluation lésionnel. Les séquences conventionnelles ou les plus récentes (tenseur diffusion, perfusion) apportent des éléments nouveaux permettant de définir au mieux les lésions présentées. L'imagerie pondérée en diffusion et particulièrement l'étude du coefficient de diffusion apparent (ADC) apporte des informations concernant la structure et la physiopathologie des lésions. Cette séquence permet de faire la part entre l'origine vasogénique et cytotoxique de l'œdème.

L'objectif de notre projet est de caractériser ces mécanismes. Notre travail permettra de comparer l'efficacité des différents traitements utilisés chez l'Homme selon leurs actions anti-oedémateuses, hémodynamiques et neuroprotectrices. Nous espérons comprendre ainsi les mécanismes mis en jeu lors des effets observés en pratique clinique afin d'en tirer le meilleur parti possible dans le futur.

L'utilisation des données de l'IRM nous permettra de définir et de caractériser de manière non invasive l'œdème cérébral post traumatique. Nous pourrons comparer ainsi l'effet des différentes molécules anti œdémateuses utilisées. Nous étudierons dans le même temps l'hémodynamique cérébrale et l'effet des différents produits sur celle-ci.

Dans le cadre de ce projet, nous utiliserons un modèle de traumatisme crânien par percussion liquidienne latérale sur rats Sprague Dawley. La pression appliquée sur le cerveau sera de 2,4 atmosphères, permettant de mimer un traumatisme crânien de gravité modérée.

Un nombre de 40 rats est prévu pour cette expérimentation afin de limiter le nombre de rats nécessaires. Tous les animaux sont sacrifiés à J7 après le TC après anesthésie par Isoflurane et administration de barbiturique.

Nous avons conçu notre plan expérimental dans le souci de la règle des 3R. Nous avons réduit nos effectifs autant qu'une analyse statistique de qualité puisse le permettre. L'obligation de remplacement lorsque cela est possible a été appliquée sur l'ensemble du projet puisque l'influence du lactate sur les échanges transmembranaires sera évaluée sur des cultures cellulaires. Le raffinement comprend l'imagerie IRM (qui permet intrinsèquement de réduire le nombre d'animaux par le fait qu'on peut faire un suivi longitudinal), les conditions d'élevage et la prise en charge de la souffrance des animaux tout au long des procédures prévues. Leur

souffrance potentielle sera très régulièrement estimée de manière à adapter les traitements antalgiques prévus et, en cas de nécessité, à recourir à une euthanasie d'urgence.

4405. Les allergies sont très répandues au sein de notre société et ont été classées comme la quatrième pathologie en termes de morbidité par l'OMS. La prévalence des allergies est en constante augmentation, en particulier dans les pays développés. Elles constituent ainsi un vrai problème de santé publique. Coûteuses, les allergies altèrent aussi la qualité de vie des patients. Par ailleurs, l'allergie alimentaire, très courante peut évoluer vers des manifestations respiratoires plus graves à l'âge adulte, c'est ce qu'on appelle la marche atopique. Des lacunes existent sur les mécanismes de la progression de l'allergie et de son évolution lors de la marche atopique. La flore intestinale ou microbiote intestinal est une pièce maîtresse de l'immunité: sa composition influe sur la qualité et l'efficacité du système immunitaire. Des déséquilibres du microbiote intestinal (dysbioses) ont été mis en cause dans les dysfonctionnements associés aux allergies. Des différences dans la composition de la flore intestinale ont été observées chez des patients allergiques (dermatite atopique, allergie alimentaire, rhinite allergique). Ainsi il existerait bien une relation entre microbiote intestinal et allergie. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'impact du microbiote intestinal sur l'évolution de l'atopie. En modulant ou en supprimant totalement la flore intestinale nous analyserons alors l'effet sur les différentes populations de cellules immunitaires et sur le développement de l'allergie. La recherche dans ce domaine implique l'utilisation de modèles animaux. Ainsi l'utilisation de souris est nécessaire pour étudier de façon optimale la réaction in vivo. Au cours de cette étude, le principe des 3R sera appliqué de façon à réduire, remplacer ou perfectionner l'utilisation de l'expérimentation animale. Il est impossible de reproduire efficacement l

Les systèmes biologiques très complexes et en particulier le système immunitaire uniquement par des études in vitro. Dans l'allergie, de nombreuses cellules immunitaires sont impliquées, telles que les lymphocytes ou les cellules épithéliales et leurs interactions ont un rôle fondamental dans le développement de la maladie. De plus, l'allergie est caractérisée par le déclenchement de symptômes, uniquement observables chez l'animal. Ainsi l'expérimentation animale est un élément clé de ce projet. Toutefois, chaque fois que possible, l'étude sur l'animal sera substituée par une étude in vitro et seul le personnel qualifié et expérimenté participera aux manipulations. Ainsi, afin d'éviter toutes souffrances dues au modèle d'allergie ou au protocole de détection du microbiote, les souris seront systématiquement euthanasiées si leur état se dégrade ou si elles subissent une perte de poids de 10% par rapport à leur poids de départ.

Enfin, le modèle d'allergie est bien établi au sein du laboratoire ce qui permet de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Le nombre de souris sera au total de 320 souris pour la totalité du projet sur trois ans. Les animaux seront logés dans un environnement adéquat, avec une humidité et une température contrôlée et bénéficieront d'un enrichissement.

4406. Les cancers du poumon sont les cancers les plus mortels, avec en France plus de 33 000 décès par an. Les adénocarcinomes pulmonaires sont le sous-type de cancer du poumon le plus fréquent. Les mutations d'un gène, appelé KRAS, sont trouvées dans 30 à 50% des adénocarcinomes. La très grande majorité (90%) des cancers bronchiques est due au tabac. Il est démontré que la nicotine contenue dans la fumée est responsable de la dépendance au tabac. Cependant, ce sont les autres composants de la fumée, tels que les goudrons ou les métaux lourds qui favorisent le développement du cancer.

Les récepteurs à la nicotine sont exprimés au niveau du cerveau, mais également au niveau du poumon. Le rôle éventuel du récepteur à la nicotine dans la formation du cancer du poumon reste débattu. L'utilisation de cultures de cellules, montre un effet de l'activation de ces récepteurs sur la multiplication des cellules et la formation de nouveaux vaisseaux. Des recherches complémentaires sont nécessaires pour étudier l'impact de ce récepteur dans le cancer du poumon dans des modèles animaux ou chez l'homme.

Récemment, plusieurs larges études de génétique ont identifié chez l'homme un endroit sur le chromosome 15 qui présente des variations, appelées polymorphismes, associées aux cancers du poumon. Dans cette zone, se situent les gènes qui codent pour des sous-unités des récepteurs à la nicotine appelés $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 4$. Cependant, différentes études ont identifié ces mêmes polymorphismes comme étant associés à la dépendance à la nicotine. Si l'implication de ces gènes dans le risque de cancer du poumon est liée à la dépendance à la nicotine, et en conséquence à l'exposition accrue aux agents cancérigènes de la fumée du tabac, reste débattue.

Toutefois, certaines études indiquent un risque accru de cancer du poumon, même chez les non-fumeurs. Ceci suggère la possibilité d'un effet direct des récepteurs à la nicotine au niveau du poumon sur le développement du cancer du poumon, indépendamment de la consommation du tabac. Ces polymorphismes génétiques pourraient expliquer les cancers du poumon chez les non-fumeurs.

Même si la réduction de la consommation de tabac reste la stratégie la plus appropriée pour réduire le risque de cancer du poumon, il faut étudier les mécanismes de prédisposition génétique associés au cancer du poumon.

Le variant génétique qui semble le plus intéressant dans le cancer du poumon est le polymorphisme génétique rs16969968 du gène de la sous-unité nicotinique $\alpha 5$. Ce polymorphisme présente la plus forte corrélation avec le risque de cancer du poumon.

Pour comprendre l'effet du polymorphisme $\alpha 5$ sur la formation du cancer du poumon, nous proposons d'utiliser un modèle animal murin original de cancer pulmonaire muté pour KRAS (K-rasLA1). Dans ce modèle, toutes les souris développent spontanément des cancers du poumon. Ces souris seront croisées avec des souris exprimant (KI) ou non (KO) le polymorphisme $\alpha 5$ du récepteur à la nicotine.

Notre objectif est de comparer la survie et les conséquences de ce polymorphisme sur la formation d'adénocarcinomes pulmonaires chez les souris KRAS mutantes présentant une sous-unité $\alpha 5$ activée (Knock in) ou inactivée (Knock out).

Des études in vitro ont été réalisées préalablement avant d'utiliser le modèle murin pour obtenir des informations en termes de mécanismes de prolifération, activation de voies de signalisation. L'utilisation de culture de cellules tumorales in vitro ne permet pas l'étude de l'impact du polymorphisme $\alpha 5$ sur la progression tumorale et la survie car l'impact du microenvironnement n'est pas pris en compte.

Nous utiliserons 924 souris. De la naissance au 6ème mois, les souris ne présentent aucun symptôme ni aucune douleur en rapport avec le cancer du poumon. Au-delà du 6ème mois, la surveillance est renforcée et les animaux sont sacrifiés dès qu'ils présentent un signe de souffrance que cela concerne l'état général ou l'état respiratoire. Les conditions de stabulations adaptées, l'enrichissement du milieu, la surveillance quotidienne par le personnel permettent en plus de nos observations de prévenir toute forme de souffrance des animaux.

4407. Les populations vivant sur les territoires contaminés par un accident nucléaire majeur (Tchernobyl, Fukushima) sont exposées à la fois aux radionucléides présents dans leur environnement et aux polluants chimiques utilisés dans l'agriculture en particulier. Cependant, l'examen de la littérature montre une quasi absence de données sur les effets sanitaires des mélanges de radionucléides ou des mélanges de radionucléides et de polluants chimiques.

Ce projet est destiné à faire une évaluation des interactions potentielles du mélange de deux radionucléides majeurs en situation post-accidentelle, le césium-137 et le strontium-90, et un insecticide largement utilisé dans l'agriculture et connu pour son activité de perturbateur endocrinien (comme par exemple la perméthrine). Le modèle utilisé est un modèle de souris contaminées via l'eau de boisson, depuis la période d'accouplement des parents jusqu'à l'âge adulte des descendants. Les polluants seront utilisés à des concentrations faibles, inférieures aux seuils de concentrations pour lesquels ces polluants ont des effets délétères observables.

Les objectifs de ce projet sont :

De définir si un mélange de radionucléides et d'un polluant chimique modifie la biocinétique de chacun de ces polluants. Pour ceci, des expériences comparatives de suivi de la bioaccumulation et de décorporation seront réalisées avec l'ensemble des combinaisons possibles de polluants.

De déterminer si le mélange de polluants induit des effets sanitaires simplement additifs, supra-additifs ou antagonistes. Pour ceci, les animaux contaminés selon toutes les combinaisons possibles seront suivis à différents âges pour différents paramètres sanguins, urinaires et tissulaires.

L'objectif global de ce projet est de collecter des données de biocinétique, de bioaccumulation et d'effets sanitaires qui permettront d'améliorer les connaissances dans le domaine de la toxicologie des contaminations complexes et de contribuer ainsi à une meilleure protection des populations potentiellement exposées.

Pour ce projet, nous prévoyons d'utiliser 272 souris mâles, 544 souris femelles et 1360 souris issues de ces accouplements.

En respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R », les conditions suivantes seront respectées. Les animaux seront observés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié. Tous les animaux seront hébergés en groupe et selon les standards en vigueur. Le nombre d'animaux utilisé est le nombre nécessaire et suffisant requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet. Les études in vitro ne nous permettraient pas de répondre aux objectifs du projet, nécessitant une étude des effets à l'échelle de l'organisme dans son ensemble. La faiblesse des effets biologiques attendus (sur la base des expériences réalisées précédemment) suggère qu'aucune souffrance ou douleur particulière n'est attendue dans ce projet.

4408. Nous avons montré, par de nombreuses expériences in vitro, qu'un composé de synthèse, le mannodendrimère Gc3Tri, est doué de propriétés anti-inflammatoires. Cet effet a été confirmé in vivo dans un modèle d'inflammation pulmonaire aiguë (modèle LPS) chez la souris. Il se traduit notamment par un moindre influx des neutrophiles dans les poumons des animaux.

Nous proposons de tester l'effet de ce mannodendrimère dans un contexte infectieux, et plus particulièrement dans le cas d'une infection à *Francisella*, agent, chez les mammifères, de la tularémie, dont la forme pulmonaire est souvent fatale. Nous avons choisi cette bactérie pour trois raisons. D'une part c'est un bon modèle de septicémie, qui est la deuxième cause de mortalité des patients admis en soins intensifs. D'autre part, *Francisella tularensis* fait l'objet d'intenses recherches car elle est considérée comme le plus probable agent de bioterrorisme. Enfin *Francisella novicida* n'est pas pathogène pour l'homme mais reproduit, chez la souris, toutes les caractéristiques de la tularémie humaine. La gravité de la maladie, que ce soit chez l'homme ou chez l'animal, est dépendante de la voie d'infection. Si la voie cutanée résulte en une forme bénigne, l'infection par aérosol conduit à une mortalité de 35% sans traitement, avec des doses aussi faibles que 10 à 50 micro-organismes. Nous utiliserons donc la voie aérienne pour administrer la bactérie aux animaux. Une fois infectées, les souris ne développent aucun signe pathologique pendant les premières 24h, puis une forte réaction inflammatoire survient, se traduisant par la production de cytokines et de chimio-attractants. Ces derniers permettent notamment le recrutement d'un grand nombre de neutrophiles. Cette forte réaction immune, qui ne peut juguler la multiplication bactérienne, est à l'origine d'atteintes du tissu pulmonaire. La septicémie apparaît rapidement et les souris meurent en 4 à 6 jours. L'hypercytokinémie (forte concentration de cytokines) et l'accumulation de neutrophiles dans les tissus sont des facteurs aggravants de la maladie.

Le but du protocole est donc d'évaluer l'impact de l'action anti-inflammatoire du Gc3Tri sur l'évolution de l'infection en association ou non avec une antibiothérapie. Cet effet sera comparé à un anti-inflammatoire non stéroïdien, l'ibuprofène. Pour cela nous déterminerons l'effet de l'administration intraveineuse du mannodendrimère sur l'évolution de l'infection des souris par *Francisella novicida*. Les paramètres suivants seront mesurés : survie des souris, charge bactérienne dans les organes (poumons, foie, rate et sang), dosage des cytokines et numération des neutrophiles dans les poumons.

L'étude comprend 6 expériences et nécessitera 3513 souris maximum réparties par groupe de 15 à 20 selon les expériences. Dans ce modèle expérimental, comme dans la plupart des modèles d'investigation in vivo, la variabilité inter individuelle en réponse à un stimulus est importante et ne nous permet pas de diminuer le nombre d'animaux par groupe afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante.

L'état général des animaux (poil hérissé, hypo- ou hyperactivité...), la physiologie (rythme respiratoire, température corporelle), le comportement alimentaire, ainsi que la prise de poids des animaux seront suivis deux fois par jour. Les signes pathologiques spécifiques de la maladie, tels que démarche voûtée, écoulement oculaire seront également pris en compte.

Ces différents critères permettront d'appréhender au mieux l'effet de l'infection et des produits testés et/ou la douleur qu'ils pourraient engendrée. Dans une expérience précédente, nous avons défini une température corporelle de 35°C comme point limite. Tous signes et comportements anormaux et/ou température corporelle inférieure à 35 °C et/ou perte de poids de plus de 20 % des animaux entraîneront l'exclusion de ces derniers qui seront ensuite euthanasiés.

L'utilisation d'antibiotique pour certains lots de souris nous permettra de contrôler l'infection bactérienne et donc de réduire la douleur des animaux traités. Les animaux seront euthanasiés dès qu'un point limite sera atteint et leurs organes seront prélevés et un dénombrement bactérien sera réalisé, ne remettant pas en cause l'expérience.

4409. Le but du laboratoire est d'élucider les mécanismes de mise en place et de maintien des circuits neuronaux. Ceci implique de comprendre les mécanismes moléculaires qui permettent (i) le déploiement de neurones ayant des caractéristiques similaires vers leurs cibles cellulaires appropriées et la reconnaissance de ces cibles, (ii) la stabilisation d'un contact stable, la synapse, permettant (iii) la transmission neuronale et le bon fonctionnement du circuit pour le traitement de l'information. Ces mécanismes sont basés sur des interactions tissulaires complexes qui nécessitent des études dans le contexte physiologique de l'animal. Le poisson zèbre permet d'étudier en microscopie de fluorescence la mise en place de ces circuits ainsi que leur fonctionnement et de corrélérer cette compréhension cellulaire au comportement de l'animal. Ce modèle animal permet donc de connecter les niveaux moléculaires et cellulaires à l'organisme dans son intégrité et sa complexité en analysant les circuits neuronaux in vivo dans leur environnement intact chez un vertébré, et ce sans nécessiter d'approches expérimentales invasives.

Le nombre total d'animaux nécessaires à ce projet pendant 5 ans est d'environ 9880. Les poissons zèbres adultes ne sont utilisés que pour la production d'embryons. La grande majorité des expérimentations animales sera effectuée sur des larves. Nous utiliserons principalement des techniques d'imagerie, méthode non invasive, sur des larves intactes anesthésiées. Ceci ne cause aucune souffrance particulière aux larves. De plus, nous manipulerons avec extrême précaution ces larves, car nos projets (analyse de l'activité neuronale notamment) demandent le minimum de perturbation possible pour récolter des données fiables.

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

Remplacement : Les études en culture cellulaire ne permettent pas de reconstituer les interactions cellulaires complexes permettant d'analyser la mise en place et la fonctionnalité d'un circuit neuronal. La complexité structurelle et fonctionnelle du système nerveux empêche l'utilisation des modèles in silico ou in vitro, notre projet nécessite donc une approche in vivo sur l'animal.

Réduction : Nous limiterons le nombre d'animaux utilisés aux besoins statistiques de nos analyses. Les expériences sont réalisées sur des larves. Quand cela est possible nous utiliserons les mêmes larves pour différentes expériences, afin de répondre aux questions des différents projets diminuant d'autant le nombre d'individus nécessaires. Nous élevons le nombre minimal d'embryons nécessaires au maintien d'une lignée (60 adultes). La population adulte de poissons utilisée pour produire les embryons est ainsi restreinte pour limiter le nombre d'animaux mais suffisamment développée pour assurer des conditions de reproduction efficaces pour les études envisagées.

Raffinement : Nous nous appliquerons à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse. Toutes les analyses sur tissu seront conduites après euthanasie d'animaux. Les autres manipulations, invasives ou nécessitant une immobilisation, seront conduites sur animaux anesthésiés. Dans chaque cas, nous suivrons les signes visibles d'un animal souffrant et procéderons si nécessaire à une interruption de l'expérience ou à une euthanasie. Concernant l'élevage, des poissons trop vieux pour la ponte ou présentant des signes de maladie seront euthanasiés afin d'éviter tout risque de souffrance.

4410. La sclérose en plaques (SEP) une maladie démyélinisante du système nerveux central, représente la première cause de handicap sévère non traumatique chez le jeune adulte. La SEP se caractérise par une démyélinisation multifocale d'origine inflammatoire. Ce sont des phénomènes d'auto-immunité qui seraient à l'origine de la perte de la myéline et de la mort des oligodendrocytes. Il existe bien des molécules traitant l'inflammation, mais qui n'ont que très peu, voir aucun effet sur la remyélinisation. Or l'axone dénudé est fragilisé, cause d'un bloc de conduction source de handicap et risque fortement de dégénérer aggravant définitivement le handicap des patients. D'où l'importance de développer des stratégies thérapeutiques favorisant une remyélinisation.

L'identification d'une molécule thérapeutique nécessite de réaliser des tests in vitro (cultures cellulaires) et in vivo (chez l'animal). Les systèmes in vitro bien conçus permettent éventuellement des cribles à haut débit, mais ne sont pas capables de récapituler ou de modéliser la complexité du système nerveux, c'est la raison pour laquelle des études complémentaires chez l'animal sont nécessaires. Les tests in vivo qui sont classiquement mis en œuvre pour cribler les molécules thérapeutiques dans le cadre de la SEP utilisent principalement les rongeurs. Ces tests utilisent un grand nombre d'animaux et font appel à des procédures invasives.

Notre laboratoire propose une alternative aux tests sur les rongeurs. Il s'agit d'utiliser un modèle animal de Xénope que nous avons créé. Cet organisme aquatique modèle présente deux avantages significatifs : au stade têtard étudié il est transparent et par

ailleurs les protéines de la myéline des amphibiens présentent une grande homologie avec celle des mammifères, tant dans leurs séquences codantes que dans leurs séquences régulatrices. Le test que nous avons mis au point évalue in vivo la capacité d'une molécule à réparer la gaine de myéline. Il s'agit d'une analyse réalisée sur des têtards anesthésiés observés sous microscope par quantification du nombre d'oligodendrocytes myélinisants grâce à l'expression de la GFP, transgène fluorescent. Cette approche non invasive, et de sévérité légère, permet de suivre la dynamique cellulaire au cours du temps chez le même animal et sans recours à des euthanasies.

Les animaux seront utilisés aux stades adultes pour les reproductions et stade têtards pour le test de molécules. Nous satisfaisons la règle des 3R du règlement REACH et le décret N°2013-118 sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. En effet, nous Réduisons au maximum la fréquence d'accouplement des Xénopes, nous prévoyons d'utiliser l'ensemble des têtards issus des accouplements. Des groupes de 6 têtards en tripliquat sont inclus pour tester chaque molécule pro-myélinisantes. Ce nombre suffit pour réaliser un test non paramétrique Wilcoxon-Mann-Whitney et démontrer l'existence d'un effet.

Nous utiliserons 20 couples de reproducteurs de Xénope qui nous permettent dans les cinq prochaines années d'assurer le test de 50 molécules (nécessitant 1100 têtards nés de ces reproducteurs) et peut être trouver la molécule candidate qui pourrait faciliter la remyélinisation et qui associée aux traitements anti-inflammatoires déjà existants assurerait une récupération significative du handicap moteur, sensitif et cognitif des patients.

4411. L'hépatite B est la 10ème cause de mortalité dans le monde avec jusqu'à 1,2 millions de décès par an dus à cette maladie virale.

Malgré les progrès importants des traitements de l'hépatite B chronique, ces derniers ne sont capables, à ce jour, que de limiter la multiplication du virus et non de le détruire. Il y a donc un besoin urgent de développer des options thérapeutiques alternatives pour traiter l'infection chronique par le virus de l'hépatite B (VHB). Pour ce faire, il est d'une importance particulière d'avoir à disposition un modèle animal qui soit proche de l'Homme sur le plan immunologique pour pouvoir être infecté avec le VHB.

La présence d'une infection chronique à VHB a récemment été découverte chez les macaques cynomolgus de l'île Maurice: >25% des animaux étaient positifs pour l'ADN de VHB (sérologie). De plus, le virus peut être transmis aux animaux naïfs comme le démontre l'apparition d'ADN viral et d'antigènes de surface (HBsAg) post-infection. La séquence de VHB qui a été isolée des singes mauriciens est du génotype D (HBV-DCyno), un génotype qui est largement répandu à travers le monde. La découverte de HBV-DCyno en 2013 a suscité le plus grand intérêt au sein de la communauté scientifique comme indiqué par différents articles.

Le but général de ce projet est de caractériser, in vivo et in vitro, les infections naturelle et expérimentale par VHB pendant 30 semaines, du point de vue virologique, immunologique et biochimique et d'établir un nouveau (et sans précédent) modèle d'infection chronique par VHB chez le macaque cynomolgus. Nous évaluerons 1) le potentiel pathogène de HBV-DCyno et 2) sa capacité infectieuse.

Réduction :

Dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés à son minimum, un screening épidémiologique sera conduit à l'île Maurice, chez les animaux des éleveurs agréés pour identifier et sélectionner 6 animaux positifs et 3 animaux naïfs afin de comparer l'infection chronique naturelle à l'infection expérimentale.

Des animaux supplémentaires pourront être ajoutés au projet, dans le cas où des données supplémentaires seraient nécessaires (3 animaux supplémentaires maximum) ou dans le cas où l'un ou des animaux devrait être remplacé (3 animaux supplémentaires maximum). Le nombre total d'animaux sera compris entre 9 et 15.

Raffinement :

Un examen vétérinaire sera effectué la semaine suivant l'arrivée des animaux. Tout au long de l'étude, les animaux seront suivis individuellement afin de détecter tout signe clinique de douleur ou de détresse. Une attention particulière sera accordée à l'enrichissement du milieu de vie des animaux. De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations. Des périodes de récupération suffisantes seront accordées aux animaux entre les prélèvements. De plus, les différents prélèvements seront réalisés de façon la moins invasive possible, notamment pour les biopsies hépatiques qui seront effectuées de façon échoguidée plutôt que par voie chirurgicale. Cette technique est moins invasive et permettra une anesthésie de plus courte durée.

Les résultats de cette étude seront essentiels à la mise au point d'un nouveau modèle simien sensible à l'infection par VHB, crucial pour le développement d'approches immunothérapeutiques innovantes pour le traitement de l'hépatite B chronique.

4412. La dystrophie Facio Scapulo Humérale est une maladie génétique rare (7 cas / 100000 naissances). Les patients présentent une atrophie sélective de certains groupes musculaires ainsi que des symptômes non musculaires. La maladie n'est pas létale mais est très invalidante et il n'existe pour l'instant aucun traitement curatif ou préventif. Le but principal de notre projet est le développement de molécules thérapeutiques pour la FSHD. Nous avons déjà validé in vitro un certain nombre de molécules (8 petites molécules et 4 AAV) et nous souhaitons à présent les valider in vivo. La FSHD est une maladie à gain de fonction caractérisée par l'expression aberrante d'un facteur de transcription appelé DUX4. Il n'existe actuellement aucun modèle animal exprimant DUX4 de façon robuste. Un modèle a été décrit dans la littérature mais lorsque nous avons commencé à l'explorer, nous nous sommes aperçus que l'expression de DUX4 dans les muscles est sporadique, ce qui est incompatible avec nos expériences. Nous avons donc choisi d'électrotransférer un plasmide d'expression DUX4 dans le tibialis anterior de souris C57BL6. Nous appliquons la règle des 3R car : (1) remplacer : Les expériences préliminaires ont déjà été effectuées in vitro et pour le développement d'approches thérapeutiques, il est indispensable de passer par un modèle animal. Il n'est pas possible d'utiliser la drosophile ou le zebrafish car certaines de nos approches sont basées sur l'utilisation de vecteurs AAV. (2) réduction :

Afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés, notre projet est dessiné comme un entonnoir. Les 2 TA seront utilisés lors des injections intramusculaires. Le nombre d'animaux nécessaire pour mener à bien ces projets a été évalué à 124 sur 5 ans. (3) Raffiner la méthode utilisée : toutes les molécules seront d'abord testées après injection intramusculaire (1 seule dose). 2 petites molécules et 2 AAV seront alors sélectionnées pour des tests plus poussés en dose réponse en intramusculaire et en systémique. Pour réduire la douleur, du buprenorphine sera injecté avant la chirurgie à raison de 0,1 mg/kg sc puis l'injection sera renouvelée toutes les 12 heures pendant trois jours. L'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement par du personnel compétent. Plusieurs points seront considérés comme points limites (incapacité à se nourrir, absence de locomotion, dos vouté, plaies, fractures etc.).

4413. Le cancer du sein est la 2ème cause de cancer en général et la première cause de cancer chez la femme. Les métastases sont traitées par chimiothérapie ou thérapie ciblée, en fonction des résultats histologiques obtenus sur la tumeur primaire. Cependant les cellules constituant les métastases peuvent être différentes de celles de la tumeur primaire. C'est le cas de 25 à 40% des métastases du cancer du sein. Il serait donc primordial de pouvoir caractériser, à priori, les différentes métastases, c'est-à-dire de les phénotyper. Toutes les métastases n'étant pas accessibles à la biopsie, l'imagerie médicale serait donc d'un grand intérêt. Elle permettrait en effet de choisir le traitement approprié pour chaque patiente. La médecine nucléaire est à ce jour la seule technique d'imagerie moléculaire, c'est-à-dire pouvant identifier la présence d'une molécule d'intérêt, disponible en pratique clinique. Dans le cadre de ce projet, l'objectif est de développer le phénotypage par imagerie nucléaire des métastases du cancer du sein en ciblant trois molécules d'adhésion (avb3, VCAM-1 et la mésothéline) contre lesquelles des traitements pourraient être proposés afin de développer des marqueurs compagnons permettant d'identifier les patientes susceptibles de bénéficier de ces thérapies.

Le but de l'étude est donc d'évaluer 4 radiotraceurs ligands de molécules d'adhésions exprimées dans le cancer du sein, en utilisant des lignées humaines de cancer du sein implantées en sous-cutanée chez des souris Nude.

Tout au long des protocoles in vivo, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Pour le remplacement, nous avons déjà validé une partie du protocole grâce à des expériences in vitro sur des cellules en culture et ex vivo sur des coupes histologiques. Ainsi, nous devons à présent tester l'approche in vivo, c'est la raison pour laquelle aucune méthode alternative n'est disponible pour ce type d'étude. Pour la réduction, nous limiterons donc le projet aux seules expériences considérées comme indispensables chez l'animal, soit un total de 192 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 tumeurs (aspect, forme et taille) seront quotidiennement surveillées et mesurées au pied à coulisse. L'imagerie sera réalisée pour des tumeurs de petites tailles (environ 300mm³), avec les souris placées sous anesthésie volatile, supplémentée avec de l'oxygène. Les animaux seront placés sur un lit thermostaté le temps de l'imagerie et la fréquence respiratoire sera monitorée en continu afin de contrôler le degré d'anesthésie et de l'ajuster si nécessaire.

4414. L'insulinorésistance (IR) se définit comme une diminution de la réponse cellulaire et tissulaire à l'insuline, qui a pour conséquence une incapacité de l'insuline à réguler les métabolismes glucidique et lipidique. Les principales caractéristiques de l'IR sont des défauts d'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux et de la néoglucogenèse hépatique ainsi qu'un défaut de transport du glucose dans le cœur, les muscles squelettiques et le tissu adipeux. Les mécanismes à l'origine de l'IR sont mal connus, mais l'hypothèse principale implique un phénomène de lipotoxicité induit par des accumulations ectopiques de lipides. Ces désordres métaboliques sont associés à une réponse inflammatoire chronique dans les tissus adipeux caractérisée par une production anormale d'adipokines et de l'activation de divers processus pro-inflammatoires. De la même façon la présence d'une IR hépatique, associée à un processus inflammatoire, conduit au développement de NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Diseases, maladies hépatiques non alcooliques). Ainsi processus inflammatoires, l'IR, obésité, diabète de type 2, NAFLD sont intimement liés.

La forte prévalence des NAFLD n'a fait qu'accentuer l'intérêt porté à cette pathologie ces dernières années. Ainsi différentes méthodes d'imagerie de la pathologie se sont développées afin notamment d'identifier son stade de développement. Toutefois si le diagnostic de la fibrose ou de la stéatose est aujourd'hui réalisable grâce à différentes modalités, le suivi de l'inflammation hépatique de manière non invasive est aujourd'hui impossible. L'inflammation étant au cœur des mécanismes de développement des NAFLD, et ce dès ses stades les plus précoces, il semble pourtant primordial d'être capable de l'évaluer.

Cette étude a pour objectif de mettre au point une méthode de suivi des maladies hépatiques par le biais de l'évaluation de l'inflammation grâce à un radiotraceur en imagerie TEMP (Tomographie par Emission MonoPhotonique ou SPECT en anglais). Un marqueur spécifique de VCAM1, marqueur de l'inflammation, proposé comme traceur de la plaque d'athérome vulnérable a été développé. Il s'agit d'un nanobody anti-VCAM1 marqué au technétium 99m. Par un protocole d'imagerie simple, non invasive, il s'est déjà montré très efficace dans la détection des plaques d'athérome vulnérables chez la souris.

Nous proposons ici d'évaluer l'efficacité de ce même traceur pour le suivi de l'évolution de l'inflammation hépatique dans un modèle murin de NAFLD. Une telle méthodologie pourrait alors permettre d'améliorer la compréhension de cette pathologie mais aussi de participer à la mise au point et à l'évaluation de l'efficacité des traitements dans ce domaine.

Au total 30 souris seront utilisées. Tout au long des études in vivo, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal (Remplacer et Réduire). Ces animaux seront hébergés par groupe, en cages avec enrichissement du milieu de vie. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de contrôler leur bien-être. Le régime particulier mis en œuvre dans cette étude entraînera une perte de poids des animaux, toutefois, la mise en place de points limites adaptés permettra de limiter la douleur, angoisse ou souffrance des

animaux induite par ces procédures expérimentales (Raffiner). 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 aux injections du radiotracer selon les bonnes pratiques vétérinaires. Les sessions d'imagerie seront réalisées sous anesthésie volatile (Isoflurane), complétée par un mélange Air – O₂. 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 (Raffiner).

4415. La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie sévère pour laquelle les ressources thérapeutiques sont très limitées. Son pronostic est proche de celui du cancer broncho-pulmonaire (50% de survie à 2 ans). Elle est assimilable à un vieillissement accéléré du tissu pulmonaire, remplacé par un tissu fibreux, et progresse inéluctablement vers le décès par insuffisance respiratoire.

La cause et les mécanismes de progression de la FPI sont mal connus, ce qui limite le développement de nouveaux traitements. Plusieurs études récentes ont montré que près de 50% des patients atteints de FPI souffraient également d'un syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) sévère, défini par la survenue d'occlusions répétées des voies aériennes supérieures au niveau de la gorge pendant le sommeil. Le SAOS favorise de nombreuses pathologies cardiovasculaires, comme l'hypertension artérielle, l'infarctus du myocarde, ainsi que le diabète, du fait notamment des épisodes nocturnes répétés d'hypoxie (manque d'oxygène pendant l'apnée) puis réoxygénation, ou hypoxie intermittente (HI).

Nous émettons l'hypothèse que le SAOS pourrait favoriser ou aggraver l'évolution de la FPI.

Nous souhaitons tester cette hypothèse chez des souris sauvages de souche C57B16/J présentant une fibrose pulmonaire expérimentalement induite. Le groupe contrôle recevra du sérum physiologique. Les souris de chacun de ces 2 groupes seront ensuite exposées à des épisodes d'HI répétée 8h par jour pendant 21 jours, dans une caisse hermétique en plexiglas, ayant pour but de mimer les apnées obstructives chez l'Homme, ou laissées à l'air libre. Nous comparerons ensuite la sévérité de la fibrose pulmonaire et analyserons les mécanismes biologiques impliqués.

Si notre hypothèse est confirmée expérimentalement, il sera utile de dépister systématiquement un SAOS associé chez les patients atteints de FPI, et de tester le rôle potentiellement protecteur du traitement du SAOS (ventilation nocturne en pression positive continue) sur l'évolution de la FPI.

En accord avec la législation en vigueur concernant l'expérimentation animale, nous veillerons à réduire au maximum le nombre de souris utilisées au cours de ce projet. 90 souris sont estimées nécessaires pour mettre en évidence une différence statistiquement significative de mortalité entre les groupes, et 130 souris supplémentaires dans l'analyse des mécanismes impliqués. Une observation comportementale des souris sera réalisée chaque jour, et une analgésie ou une anesthésie seront réalisées dès que nécessaire. Par ailleurs, les animaux bénéficieront d'un enrichissement de leur milieu d'hébergement, dans le but d'augmenter leur bien-être, notamment une litière avec du coton leur permettant de trier les morceaux de tailles différentes, de décompacter les morceaux compactés, et d'élaborer des nids ainsi et des tunnels de polycarbonate. Des points limites précoces seront établis (changements dans l'aspect physique ou le poids corporel des animaux, fréquence respiratoire...) afin de ne pas infliger aux animaux des souffrances inutiles.

4416. Une perturbation de la balance entre excitation (neurones glutamatergiques) et inhibition (neurones GABAergiques) dans le cerveau est à l'origine de maladies neurodéveloppementales associées à un retard mental comme le syndrome de Down (SD), mais aussi à l'apparition de maladies neurologiques telles que la schizophrénie et l'épilepsie.

La présence en 3 copies d'un gène candidat sur le chromosome 21 entraîne chez les souris les mêmes déficits neurologiques que chez les personnes trisomiques. De plus, la perte de fonction de ce gène entraîne un syndrome de retard mental sévère associé à une diminution de la taille du cerveau, de l'épilepsie et des comportements autistiques.

Nous proposons d'analyser le rôle de ce gène dans les neurones GABAergiques afin de comprendre l'impact de cette molécule sur les déficits neurologiques observés dans les deux syndromes. Pour ce projet, nous utiliserons le modèle souris car ces effets ne peuvent être observés que sur un organisme vivant proche de l'être humain.

Pour cette étude, nous utiliserons les modèles suivants :

-Ts1Yey, trisomique (modèle SD)

-Ts1Yey;Dlx6aCre/+ dans lequel une copie du gène a été inactivée dans les neurones GABAergiques, permettant le retour à deux copies de ce gène dans ces neurones (sauvetage des déficits cognitifs observés dans le SD)

-Dlx6aCre/+ : perte d'une copie du gène dans les neurones GABAergiques

Une série de tests de comportement portant sur les phénotypes observés dans le SD et le MRD7 (hyperactivité, mémoire, sociabilité) peu voire non-invasifs seront réalisés espacés d'environ une semaine, le premier test commençant vers l'âge de 12-13 semaines. L'ensemble des tests comportementaux n'entraîne pas de stress ou souffrance sévère pour l'animal et les animaux feront l'objet d'un suivi permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur santé. Les animaux présentant des signes de douleur seront euthanasiés car inaptes à une étude comportementale.

A la fin des tests comportementaux, les souris bénéficieront d'un enregistrement électroencéphalographique (EEG) couplé à la vidéo pour tester et évaluer leur susceptibilité aux crises épileptiques spontanées et des crises induites par une substance pro-convulsivante, le pentylène tétrazole (PTZ). Les animaux seront euthanasiés directement à la fin de ce protocole. Ces expériences nécessiteront 120 souris au maximum, entre 10 et 15 individus par génotype (3 génotypes cités plus les contrôles) et par sexe (mâles et femelles) étant requis pour obtenir une puissance statistique suffisante (ANOVA avec test de Tukey en post-hoc).

4417. Le traitement du syndrome d'apnée du sommeil (SAS) corrige les troubles respiratoires nocturnes mais a peu d'impact sur les anomalies métaboliques et cardiovasculaires, surtout chez les patients porteurs d'obésité sévère. La sédentarité reste très élevée dans le SAS et l'obésité et il est très difficile d'intégrer les patients dans des programmes maintenus sur le long terme, alors même que le volume d'exercice est un déterminant majeur du contrôle glycémique. Il apparaît aussi judicieux de mettre en place des stratégies de prise en charge métabolique indépendamment des programmes de réentraînement.

Un entraînement local musculaire par électrostimulation neuromusculaire (ES) peut induire une amélioration de la fonction musculaire favorisant l'activité physique mais aussi une amélioration de l'insulino-résistance réduisant le risque cardiometabolique. Les mécanismes expliquant le lien entre les adaptations locales (musculaires) et systémiques (sanguin et autres organes cibles de l'insuline) restent cependant peu explorés et inconnus à ce jour.

Nous disposons d'un système entièrement automatisé permettant de reproduire chez le rongeur la composante hypoxique du syndrome d'apnée du sommeil. Parallèlement, nous avons récemment confectionné un système de micro-stimulation neuromusculaire périphérique adapté à la souris. Avec ces systèmes, nous souhaitons ainsi étudier l'effet d'un conditionnement par ES chez des souris C57Bl/6 préalablement soumises à un régime riche en graisse et conditionnées sous hypoxie intermittente sur les paramètres inflammatoires et métaboliques locaux (muscle et tissu adipeux stimulés) et systémiques (sang, organes cibles de l'insuline : foie, tissu adipeux et cœur). Le nombre de souris sera de 76.

Le projet respecte la règle des 3 R :

Remplacement : Aucune méthode alternative à l'animal n'est possible car nous avons d'analyser du tissu hépatique, cardiaque et cérébral conditionnés.

Réduction : nous utiliserons le nombre minimal de souris pour obtenir des groupes comparables (8 souris par groupe + 2 par groupe de souris qui réaliseront le régime riche en graisse pour anticiper un éventuel échec du régime estimé à env. 20% dans notre expérience).

Raffinement : nous utiliserons un anesthésiant pour réduire la douleur et le stress occasionné par le conditionnement sous électrostimulation périphérique.

4418. Les maladies cardiovasculaires sont responsables de 32% des décès dans le monde. La maladie des vaisseaux qui desservent le muscle cardiaque ou myocarde, les artères coronaires, représente la moitié des décès d'origine cardiovasculaire.

Elle se caractérise par un dépôt de lipides dans la paroi de ces artères, qui peut conduire, par obstacle à l'écoulement normal du flux sanguin, à l'angine de poitrine, voire à l'infarctus du myocarde.

Cette atteinte des coronaires est aujourd'hui bien connue. Cependant celles-ci en se ramifiant pour irriguer le myocarde, se divisent en vaisseaux de plus en plus petits. Il s'agit de microvaisseaux, que l'on ne sait pas bien explorer par les techniques actuelles.

Des données récentes suggèrent qu'une atteinte de ces microvaisseaux précéderait l'atteinte des plus gros dans l'histoire de la maladie coronaire. On devine alors l'intérêt de techniques qui permettraient de quantifier l'atteinte de ces microvaisseaux, en termes de prévention du risque cardiovasculaire, de mise en place de traitements avant la survenue d'une maladie plus sévère.

Une technique de calcul de cette atteinte en tomographie par émission monophotonique (TEMP), une imagerie courante en cardiologie, a été mise au point à partir d'images obtenues lors d'examens habituels passés par des patients. On a pu montrer que les malades qui présentaient une atteinte des microvaisseaux (hétérogénéité de perfusion) détectée par cette technique avaient plus de chance de présenter un événement cardiovasculaire tel qu'un infarctus du myocarde par exemple.

Les mécanismes de l'atteinte des microvaisseaux sont cependant mal connus à l'échelle microscopique. Ce projet a pour objectif de clarifier ces mécanismes conduisant à l'apparition d'anomalies de la microcirculation visualisées en TEMP sur un modèle de rat diabétique. Nous proposons ici d'étudier les conditions influençant le développement précoce de la dysfonction coronaire, autorisant une meilleure interprétation des variations cliniques de l'hétérogénéité de la perfusion myocardique ainsi que, a terme, l'évaluation de l'efficacité de traitements anti-diabétiques et anti-hypertenseurs pour une meilleure prise en charge diagnostique et thérapeutique des patients.

La mesure d'altérations du fonctionnement normal de l'organisme (dit physiologique) au cours d'un processus anormal pathologique (le diabète, ici) rend nécessaire l'utilisation d'un modèle animal. Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal. Au total 91 rats seront utilisés. Il s'agit du minimum d'animaux nécessaire afin de pouvoir obtenir des résultats exploitables durant le protocole prévu. Tout au long des études in vivo, nous respecterons la règle des 3R (Réduire, Raffiner). Pour le remplacement,

Aucune méthode alternative n'est disponible. Ces animaux seront hébergés par deux, en cages avec enrichissement du milieu de vie. Les animaux seront suivis bi-quotidiennement afin de contrôler leur bien-être. L'utilisation de Streptozotocine associée ou non à un régime alimentaire particulier enrichi en lipides mis en œuvre dans cette étude entraînera un ralentissement de prise de poids voire une perte de poids. La mise en place de points limites adaptés permettra de limiter la souffrance de ces animaux. Les injections seront réalisées selon les bonnes pratiques vétérinaires.

4419. La cachexie est une fonte de tissu musculaire associée à des maladies chroniques, tel que le cancer, responsable de la mort de 20% de patients de cancer. Nous nous intéressons au rôle du Serum Response Factor (SRF) en tant que médiateur de la mécanotransduction dans l'homéostasie du muscle squelettique cachectique. Notre objectif est d'évaluer le rôle de Srf dans la restauration de la masse musculaire des muscles cachectiques en présence de l'exercice physique. Nous souhaitons déterminer d'une part les signaux mécaniques régulant l'activité de SRF et d'autre part la contribution des cellules satellites à l'homéostasie du tissu musculaire cachectique. Ces études ont pour but d'identifier des nouvelles voies d'interventions pour une condition

pathologie au présent incurable. Car nous avons précédemment démontré que les effets d'une tumeur *in vivo* ne sont pas entièrement reproduits par des traitements *in vitro* (par exemple, par des traitements des cellules musculaires avec des cytokines), la plupart des analyses souhaitées ne peuvent pas être reproduites *in vitro* ni *ex vivo*, ce qui impose l'utilisation des modèles murins adultes. Pour cela, nous utiliserons un modèle de souris transgéniques générés par nos collaborateurs porteur de la tumeur C26, ColonCarcinoma chez lequel il est possible d'invalider le gène *srf* de manière conditionnelle et inductible dans deux compartiments cellulaires du muscle squelettique : les fibres musculaires et les cellules souches musculaires adultes (les cellules satellites). Pour estimer le nombre de souris nécessaires afin d'atteindre une significativité statistique, nous allons procéder à un calcul itératif pour estimer le *n* pour 1- β (puissance) et 1- α (niveau de confiance) donnés dans un setting expérimental représentatif. Sur un point de vue statistique, cette approche expérimentale est particulièrement difficile, puisque c'est une expérience *in vivo* qui repose sur différentes variables potentiellement en interaction ; la tumeur, l'exercice physique et la dénervation. Par cette approche, nous avons calculé que 18 souris pour chaque bras de l'étude (donc $18 \times 4 = 72$, pour un double sens typique ANOVA avec quatre bras) sont nécessaires pour atteindre les différences attendues, avec un niveau de confiance de 95% et une puissance de 80. Ainsi, nous avons estimé à 72 le nombre de souris nécessaires pour chaque série d'expériences (procédure expérimentale). Nous avons développé un système de cultures cellulaires en présence de stimulation mécanique (myoblasts cultivés dans le FlexCell) en présence de cytokines recombinantes dans le milieu de culture pour mimer les cytokines pro-inflammatoires caractéristiques de la cachexie. Les effets d'une tumeur *in vivo* ne sont pas entièrement reproduits par les cytokines, donc *in vitro* on obtient des données préliminaires utiles à l'optimisation des expériences successives *in vivo*, mais ces dernières restent indispensables pour obtenir des données précliniques exploitables pour des mesures anti-cachectiques chez l'homme. Pour estimer le nombre minimum d'animaux nécessaire, nous avons effectué un calcul statistique itératif spécifique. Nous estimons avoir besoin de 468 souris au total pour l'ensemble du projet de quatre ans. Les animaux seront surveillés quotidiennement afin de déceler des signes de douleur notamment les souris porteuses de la tumeur avec éventuelle administration supplémentaire d'analgésiques (Buprénorphine). Nous avons défini les variables et la méthode d'évaluation quantitative du point limite au-delà duquel les animaux recevront un analgésique ou seront euthanasiés. Les outils statistiques et informatiques que nous mettrons en place nous permettront de réduire le nombre de manipulations en exploitant au mieux les données obtenus par chaque expérience. L'exercice physique, proposé dans ce projet, est une bonne pratique car il diminue (de façon systémique) l'inflammation et améliore l'état physique et donc le bien-être des animaux.

4420. Parmi les complications associées au surpoids, la surcharge lipidique du foie (ou stéatose hépatique) représente une cause de plus en plus importante de maladie hépatique chronique.

De plus, l'évolution de la stéatose hépatique « simple » se fait souvent vers une inflammation conduisant à la fibrose et au cancer du foie. Par conséquent l'étude des mécanismes de cette progression est essentielle à l'établissement de traitements pouvant stopper ou faire régresser la maladie. Notre projet consiste à étudier l'implication de voies spécifiques de signalisation dans la surcharge en graisse du foie, chez la souris. Nous possédons des souris normales ou déficientes pour certaines de ces voies de signalisation, que nous soumettons soit à des périodes de jeûne de 24 heures au maximum (avec maintien de la consommation d'eau), soit à des régimes alimentaires enrichis en graisses. Durant l'ensemble de ces procédures, les souris sont quotidiennement surveillées de façon à prévenir la survenue de souffrance. Pendant la durée du régime riche en graisses, le poids des souris est mesuré 1 fois par semaine, ainsi que leur consommation en aliment et boisson. Le nombre total de souris utilisées dans ce projet est de 300, et sera réduit au minimum nécessaire aux expérimentations. Le remplacement par d'autres techniques et méthodes de laboratoire (sur cellules "*in vitro*") sera effectué dès que possible. Les expériences programmées sont conçues et réfléchies de façon à n'utiliser les animaux que si aucune autre alternative expérimentale n'est possible.

4421. Ce projet vise à comprendre les mécanismes qui président à la construction du cerveau au cours du développement de l'embryon, afin d'identifier l'origine d'anomalies cérébrales observées dans certaines maladies humaines appelées ciliopathies. Le modèle murin que nous utilisons dans ce projet a des intérêts scientifiques et techniques uniques : la possibilité d'obtenir des mutants conditionnels et inductibles permet de réaliser des modèles dont les caractéristiques sont proches des maladies humaines. En effet, les mutants de souris que nous étudions reproduisent une grande partie des malformations observées dans les ciliopathies humaines sévères comme le syndrome de Meckel. Nous prévoyons soigneusement les expériences afin de réduire le plus possible le nombre d'animaux utilisés.

Pour l'ensemble du projet, nous utiliserons 1450 animaux.

Les animaux sont hébergés avec un enrichissement du milieu et les zootechniciens en charge des animaux procèdent à une surveillance et à des soins quotidiens dans le but d'augmenter autant que possible leur bien-être (raffinement).

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous pratiquons avec l'animalerie une méthode de pesée des souris femelles afin de nous assurer qu'elles sont gestantes avant de les euthanasier. Nous utilisons des méthodes de traitement statistique des données afin de limiter le nombre d'animaux nécessaires pour une expérience donnée.

Nous réalisons deux types de développements méthodologiques afin de remplacer l'utilisation des modèles animaux: 1) la différenciation *in vitro* de cellules neurales à partir de cellules souches embryonnaires de souris. Nous avons isolé des lignées de cellules ES à partir d'embryons au stade blastocyste issus des animaux mutants étudiés. Nous utilisons la différenciation *in vitro* pour tester nos hypothèses de travail sans utiliser d'animaux. 2) La modélisation ; nous collaborons avec des mathématiciens afin de modéliser les processus de neurogénèse dans le cerveau. Ceci nous permet de tester *in silico* des hypothèses et de réaliser des expériences plus ciblées sur les animaux.

4422. Les modèles murins génétiquement modifiés sont indispensables pour l'étude de

- la régulation et fonction de gènes,
- rôle d'un gène dans la formation de tumeur
- l'obtention de modèles pouvant être utilisés pour des tests thérapeutiques

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

Nous prévoyons pour l'année à venir d'utiliser 1240 souris.

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

4423. Analyse de la dynamique des réseaux cérébraux par Imagerie de Résonance Magnétique (IRM) et nucléaire (TEP) dans des modèles murins de la dépression.

Nous souhaitons approfondir ces observations, par un suivi longitudinal de ces deux modèles murins reconnus, en cartographiant les réseaux cérébraux intervenant dans le développement de la dépression. Pour cela, nous utiliserons l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et l'imagerie nucléaire (TEP), deux techniques d'imageries biomédicales non-invasives alliant ainsi la résolution spatiale et la multi-modalité de l'IRM à la sensibilité et la spécificité du TEP. De plus, l'utilisation de ces deux techniques d'imagerie déjà présentes dans les services cliniques en routine, nous permettent d'envisager un transfert de nos observations plus rapide vers l'Homme. Des tests comportementaux viendront compléter nos observations basées à partir des images.

Pour limiter des temps d'anesthésie trop longs par examen en imagerie, ce projet se découpera en 4 parties. Chacune de ces parties aboutira à une conclusion complémentaire des autres à la compréhension de la dépression. Pour ce faire, 50 souris de la lignée C57BL/6J pour le modèle de douleur neuropathique. 40 souris génétiquement modifiées de la lignée Thy1-ChR2-YFP pour le modèle d'activation optogénétique des neurones du cortex cingulaire antérieur. Un total de 90 souris sera utilisé pour ce projet.

Le projet sera conduit en respectant la règle des 3R visant :

-Réduire: Nous utiliserons 90 animaux par groupe, ces chiffres étant le minimum pour pouvoir faire des études statistiques dans ces modèles qui présentent une grande variabilité interindividuelle. De plus, l'imagerie nous permet de suivre un même animal plusieurs fois, ce qui réduit le nombre d'animaux à inclure.

-Raffiner: Enrichir l'environnement des animaux, former des groupes sociaux.

-Remplacement : L'étude portant sur les conséquences affectives de la douleur neuropathique et la dépression induite par l'activation optogénétique des neurones du cortex cingulaire antérieur (CCA), nécessite impérativement l'utilisation d'animaux.

Un calcul statistique « power analysis » sera réalisé pour s'assurer que les résultats obtenus sont valides sur le plan statistique (multiple ANOVA). Ces données seront de plus corrigées par un test post-hoc de Bonferroni. Un test t de Student sera ajouté pour comparer les données à une valeur calculée du hasard.

4424. a dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de malvoyance après 50 ans et on estime à un million le nombre de personnes concernées. A ce jour, la cause précise de la maladie est encore inconnue, mais plusieurs hypothèses concernant le développement de la pathologie ont été proposées, et notamment le rôle très probable de la toxicité lumineuse et du stress oxydant sur la mort des cellules de la rétine.

Le but de ce projet est de valider l'effet protecteur de substances naturelles à fort potentiel anti-oxydant, sélectionnées à partir de tests réalisés sur un modèle cellulaire de phototoxicité rétinienne, dans un modèle murin de phototoxicité rétinienne induite. Le développement d'un complément alimentaire et/ou d'un médicament visant à traiter la DMLA chez l'homme pourrait découler de ces expériences.

Un total de 1000 souris sera utilisé pour réaliser ces expériences sur une durée totale de 5 ans, ce qui représente une moyenne de 200 souris par an.

La règle des 3R sera appliquée. Réduire : Nous réduirons au minimum le nombre de souris par groupe afin de pouvoir réaliser un test statistique. Raffiner : Une surveillance sera réalisée par le manipulateur pendant la durée de la chirurgie, lors du réveil et le lendemain matin. Les souris seront ensuite observées quotidiennement par l'animalier et/ou le manipulateur. Toutes les manipulations le nécessitant seront réalisées sous anesthésie générale et/ou locale et des traitements préventifs (antibiotique, anti-inflammatoire) seront utilisés afin de réduire les risques d'infection et de douleur. Le poids et l'apparence physique des souris seront vérifiés tout au long des procédures expérimentales. Une perte de poids très importante ou un signe révélateur de souffrances engendrera une euthanasie. Le comportement et la posture des souris seront également observés afin d'évaluer le degré de bien-être ou de douleur. Remplacer : Ce projet fait suite à plusieurs tests sur cellules démontrant sans conteste le potentiel des molécules d'intérêt en thérapie humaine. La validation des effets thérapeutiques chez l'animal est donc à ce stade indispensable pour envisager un développement thérapeutique.

4425. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de malvoyance après 50 ans et on estime à un million le nombre de personnes concernées. A ce jour, la cause précise de la maladie est encore inconnue, mais plusieurs hypothèses concernant le développement de la pathologie ont été proposées, et notamment le rôle très probable de la toxicité lumineuse et du stress oxydant sur la mort des cellules de la rétine.

Le but de ce projet est de tester l'effet d'agonistes beta-adrénérgiques sur le phénotype rétinien de souris présentant des caractéristiques de la DMLA. Les effets de ces agonistes ont été préalablement validés dans trois modèles cellulaires dans lesquels il a été montré qu'ils agissent sur des mécanismes permettant de réduire l'accumulation de la lipofuscine, une des caractéristiques de la pathologie. Le développement d'un médicament visant à traiter la DMLA chez l'homme pourrait découler de ces expériences.

Un total de 120 souris sera utilisé pour réaliser ces expériences sur une durée totale de 2 ans, ce qui représente une moyenne de 60 souris par an. Les traitements seront réalisés par gavage quotidien.

La règle des 3R sera appliquée. Réduire : Nous réduirons au minimum le nombre de souris par groupe afin de pouvoir réaliser un test statistique (en tenant compte d'une perte possible de 10 à 20 % des souris en cours d'expérimentation). Raffiner : Les souris seront d'abord acclimatées aux zootechniciens afin de réduire au maximum le stress engendré par le gavage. Elles seront pesées chaque semaine et observées quotidiennement, et leur comportement lors du gavage sera reporté par écrit. Toutes les manipulations le nécessitant seront réalisées sous anesthésie générale et/ou locale et des traitements préventifs (antibiotique, anti-inflammatoire) seront utilisés afin de réduire les risques d'infection et de douleur. Le poids et l'apparence physique des souris seront vérifiés tout au long des procédures expérimentales. Une perte de poids supérieure à 20% ou un signe révélateur de souffrances engendrera une euthanasie. Le comportement et la posture des souris seront également observés afin d'évaluer le degré de bien-être ou de douleur. Remplacer : Ce projet fait suite à plusieurs tests sur cellules démontrant sans conteste le potentiel des molécules d'intérêt en thérapie humaine. La validation des effets thérapeutiques chez l'animal est donc à ce stade indispensable pour envisager un développement thérapeutique.

4426. La sclérose en plaques affecte le système nerveux central et est la conséquence d'une attaque incontrôlée par le système immunitaire de la gaine de myéline entourant les fibres nerveuses. Cette gaine qui est essentielle à la propagation du signal nerveux, est alors détruite, entraînant l'apparition de certains symptômes tels que des handicaps moteurs, des troubles de la vue, une faiblesse musculaire ou des engourdissements.

Notre projet vise à étudier le potentiel thérapeutique d'une nouvelle cible thérapeutique: les récepteurs purinergiques.

Le modèle de sclérose en plaques, l'Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale (EAE), permet d'étudier la maladie dans un organisme entier qui ne peut pas être dupliqué en utilisant des tissus seuls.

Nous avons suivi la règle des 3R en introduisant des points limites à notre protocole. En revanche, et à notre connaissance après une recherche dans plusieurs bases de données de la littérature scientifique, il n'y a pas d'alternative à l'utilisation de modèles animaux pour étudier la sclérose en plaques. En conséquence, nous prévoyons l'emploi d'un modèle murin simple que nous maîtrisons parfaitement au laboratoire et un total de 192 souris seront nécessaires pour ce projet.

La règle des 3 R a été considérée pour la mise en place du projet:

-Réduction du nombre d'animaux suffisants pour permettre des données statistiquement fiables. Les études in vivo développées dans ce projet permettent des approches fonctionnelles sans mise à mort de l'animal permettant un suivi pendant plusieurs semaines réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisé

-Raffinement le stress/fatigue/douleur de l'animal est réduit à son maximum par une surveillance quotidienne, la mise en place de gel alimentaire et l'expérimentation réduit à 25 jours

-Remplacement. Les animaux ne peuvent pas être remplacés dans ce type d'expériences. La culture cellulaire, du fait de sa connectivité réduite, ne reproduit pas toutes les propriétés.

4427. Les fonctions cognitives sont générées par le traitement de l'information dans le cortex cérébral. Les circuits corticaux sont constitués de différents types de neurones reliés entre eux par un très grand nombre de connexions qui sont responsables de la propagation de l'information. Les neurones peuvent transmettre une excitation (entraînant l'activation d'un autre neurone) ou inhiber un autre neurone. Le résultat est la création de réseaux fonctionnels complexes, qui produisent des rythmes électriques, sous-tendant les mécanismes de la cognition.

Dans ce contexte, une balance précise entre excitation et inhibition est fondamentale pour le bon fonctionnement du cerveau. Des maladies neurologiques et psychiatriques très graves peuvent se développer lorsque cet équilibre est modifié.

Parmi tous les types cellulaires du cortex cérébral, les neurones corticaux inhibiteurs (également connus sous le nom d'interneurones, qui utilisent le neurotransmetteur GABA) sont très hétérogènes et peuvent être classés selon des critères anatomiques et électrophysiologiques précis.

Notre équipe étudie comment les neurones du cortex cérébral se connectent les uns aux autres, et comment ces connexions synaptiques contribuent à la genèse de différentes formes d'oscillations du réseau neuronal

Notre travail permettra une meilleure compréhension de la régulation de l'excitabilité des interneurones et leur rôle au sein des réseaux du cortex cérébral.

L'espèce utilisée sera la souris. Pendant la durée du projet (5 ans) un total de 3 696 souris seront utilisées. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ; 3) remplacement, les études in

vitro et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes, le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées.

Les conditions de stabulation suivent les règles imposées par le comité éthique et l'autorité nationale française et EU. En bref, le nombre d'animaux par cage est déterminé en fonction de leur taille et de leur poids. L'enrichissement consiste, pour les stocks d'un carré de coton et pour les croisements un carré de coton et une maisonnette de carton. Tous les animaux provenant d'un éleveur auront une semaine d'acclimatation avant toute procédure.

4428. L'un des enjeux majeurs en écologie est de comprendre et de prédire la réponse des organismes aux variations environnementales. Pour cela, la clarification des mécanismes proximaux est une étape indispensable pour comprendre des patrons écologiques généraux comme l'utilisation de l'habitat ou la distribution des espèces. Dans ce contexte, l'approche écophysiologique est particulièrement pertinente. Cependant, les compromis liés à l'eau demeurent actuellement peu considérés, bien que l'eau soit une ressource capitale et pouvant être limitante. La régulation de la balance hydrique pourrait donc jouer un rôle clé dans les compromis physiologiques et comportementaux. L'objectif principal de ce projet est d'évaluer dans quelle mesure, un petit vertébré terrestre, le lézard vivipare (*Zootoca vivipara*) ajuste sa physiologie vis à vis de la disponibilité en eau et notamment lors d'épisodes climatiques extrêmes telles que les canicules et/ou les vagues de sécheresse. Pour ce faire, nous étudierons les effets d'une période prolongée (de début juin à fin septembre 2016) de restriction d'eau modérée (1 seul arrosage par jour contre 3 arrosages par jour) sur les stratégies d'acclimations physiologiques des pertes hydriques et du métabolisme. En parallèle nous décrirons la cinétique de déshydratation et les impacts sur le stress physiologique, ici mesuré via la production de stress oxydatif et l'érosion des télomères. Quatre mesures seront réalisées (en juin, en juillet, en août et en septembre 2016) sur chaque individu de façon à examiner la cinétique de déshydratation et d'acclimatation. Etant donné la forte variabilité inter-individuelle des réponses à la restriction d'eau chez les reptiles, nous utiliserons un effectif suffisant de mâles et de femelles subadultes (n = 25 individus de chaque sexe dans chaque traitement) et compte tenu de l'éventuelle souffrance associée à une restriction d'eau prolongée, nous minimiserons au maximum les effectifs en limitant l'étude sur une seule classe d'âge (sub-adulte) et les femelles gestantes seront exclues de cette étude pour éviter de superposer un stress hydrique prononcé au coût physiologique de la gestation.

Le lézard vivipare est particulièrement pertinent pour tester nos hypothèses compte tenu de sa forte dépendance aux zones humides en conditions naturelles. Notre hypothèse générale est que les individus ajustent leur physiologie (acclimatation) aux conditions hydriques de manière à limiter les contraintes associées à une période de restriction d'eau. Nous nous attendons donc à une diminution des pertes hydriques et du métabolisme chez les individus restreints en eau au cours du temps. Nous prévoyons toutefois que la restriction d'eau prolongée augmente la production de stress oxydatif et l'érosion des télomères puis à termes, la survie.

Dans cette étude, nous suivons le principe de réduction en limitant l'étude sur un échantillon représentatif de subadultes (n = 100) et en ne réalisant que 1 prise de sang (seule mesure légèrement invasive) par mois et par individu. Nous suivons le principe de raffinement en limitant au maximum le volume de sang prélevé (60µl = ~10% volume sanguin) de manière à limiter la gêne possible. Le principe de remplacement ne pourra pas être suivi étant donné que le projet vise à comprendre les réponses individuelles in vivo des lézards face à la restriction d'eau prolongée.

4429. L'un des enjeux majeurs en écologie est de comprendre et de prédire la réponse des organismes aux variations environnementales. Pour cela, la clarification des mécanismes proximaux est une étape indispensable pour comprendre des patrons écologiques généraux comme l'utilisation de l'habitat ou la distribution des espèces. Dans ce contexte, l'approche écophysiologique est particulièrement pertinente. Cependant, les compromis liés à l'eau demeurent actuellement peu considérés, bien que l'eau soit une ressource capitale et pouvant être limitante. La régulation de la balance hydrique pourrait donc jouer un rôle clé dans les compromis physiologiques et comportementaux. L'objectif principal de ce projet est d'évaluer dans quelle mesure, un petit vertébré terrestre, le lézard vivipare (*Zootoca vivipara*) ajuste sa physiologie vis à vis de la disponibilité en eau. Pour ce faire, nous étudierons les effets d'une restriction d'eau modérée (1 seul arrosage par jour contre 3 arrosages par jour) pendant deux semaines (de début à mi-juin 2016) sur les niveaux de déshydratation et de stress. Etant donné la forte variabilité inter-individuelle des réponses à la restriction d'eau chez les reptiles, nous utiliserons un effectif élevé de mâles adultes (n = 80 dans chaque traitement) et de femelles adultes gestantes (n = 120 dans chaque traitement). Nous minimiserons les effectifs en limitant l'étude sur une seule classe d'âge (adulte). Nous comparerons ensuite les effets croisés avec la disponibilité en eau pendant les premières phases de croissance des nouveau-nés en modifiant l'accès à l'eau au cours de cette période (conditions semi-naturelles versus 3 arrosages par semaine).

Le lézard vivipare est particulièrement pertinent pour tester nos hypothèses compte tenu de sa forte dépendance aux zones humides en conditions naturelles. Notre hypothèse générale est que les conditions hydriques confrontent l'organisme à des compromis physiologiques importants. Cela devrait être particulièrement le cas lors de la reproduction (i.e., gestation) puisque les femelles doivent assurer l'allocation d'eau vers leur propre survie mais également vers les embryons en développement (compromis intergénérationnel). Les effets maternels associés à cette période de stress hydrique modéré devraient interagir avec l'environnement post-natal de manière à optimiser le développement des juvéniles.

Dans cette étude, nous suivons le principe de réduction en limitant l'étude sur les adultes et en ne réalisant que 2 prises de sang (seule mesure légèrement invasive) par individu. Nous suivons le principe de raffinement en limitant au maximum le volume de sang prélevé (60µl = ~10% volume sanguin) de manière à limiter la gêne possible. Le principe de remplacement ne pourra pas être suivi étant donné que le projet vise à comprendre les réponses individuelles in vivo des lézards face à la restriction d'eau.

4430. Notre projet vise à explorer le rôle du neurotransmetteur GABA (acide gamma-aminobutyrique) au cours du développement des cellules en grain du cortex hippocampique. Contrairement à la plupart des neurones du système nerveux central, ces cellules sont régulièrement renouvelées au cours de la vie, par un processus appelé neurogenèse. Ce processus contribue au fonctionnement normal du cortex hippocampique, notamment dans les processus de mémoire et d'apprentissage. D'autre part, cette neurogenèse est fortement stimulée dans le cerveau épileptique mais son impact (protecteur ou au contraire pro-épileptogène) demeure méconnu.

Alors que les cellules en grains sont des neurones glutamatergiques (qui libèrent le neurotransmetteur exciteur glutamate), plusieurs études récentes ont démontré qu'elles pouvaient également libérer le neurotransmetteur inhibiteur GABA. Des travaux plus récents de notre équipe démontrent en outre que cette capacité à co-libérer deux neurotransmetteurs aux fonctions opposées est limitée à une brève fenêtre temporelle au cours de leur maturation, puis disparaît. Nous cherchons à comprendre le rôle de cette libération transitoire de GABA par les cellules en grain de deux neurotransmetteurs. Notre hypothèse est que ce GABA pourrait favoriser la maturation des cellules en grains nouvellement formées. Notre objectif, à terme, est de déterminer si cette libération transitoire de GABA par les cellules en grain (ou les mécanismes qui en découlent) pourraient représenter une cible thérapeutique d'intérêt dans le traitement de pathologies impliquant une augmentation de la neurogenèse hippocampique, telles que l'épilepsie.

Dans ce projet, nous proposons d'explorer cette question en supprimant l'expression de l'enzyme de synthèse du GABA (la Gad67) spécifiquement dans les cellules en grains immatures de l'hippocampe chez la souris. Cette suppression sera obtenue à l'aide d'injections d'un vecteur rétroviral exprimant un ARN interférant dirigé contre la Gad67. Les animaux injectés seront alors étudiés pour comparer au plan morphologique et électrophysiologique les propriétés des cellules en grains exprimant ou non la Gad67. D'autre part, nous induirons chez certains de ces animaux une activité épileptique afin d'explorer l'effet d'une suppression de la Gad67 sur la neurogenèse induite par l'épilepsie et le développement d'une épilepsie chronique.

Ces expériences reposent sur une analyse des altérations de la neurogenèse adulte et sur l'émergence d'activités épileptiques et requièrent donc par définition une expérimentation sur l'animal. Toutefois, tous les animaux mis en œuvre dans cette étude seront utilisés pour 2 voire 3 approches expérimentales afin de réduire leur nombre au strict minimum. En outre, les conditions de stabulations sont contrôlées avec enrichissement, et toutes les procédures sont mises en œuvre en limitant au maximum le stress et la douleur chez l'animal, respectant ainsi les recommandations en termes de Raffinement en matière d'expérimentation animale. En outre, ce projet découle d'une série d'études préliminaires menées dans des systèmes *in vitro* afin de Réduire et Remplacer autant que faire se peut le nombre d'animaux mis en œuvre.

Nombre total de souris utilisées dans ce projet : 124

4431. Notre projet a pour but de déterminer le rôle des structures lymphoïdes tertiaires (SLTs) dans la défense antibactérienne pulmonaire dans un modèle murin d'infection bactérienne chronique.

Pseudomonas aeruginosa (PA) et *Staphylococcus aureus* (SA) sont les principales bactéries qui infectent les bronches des patients mucoviscidiques adultes. Le rôle de la réponse immunitaire adaptative dans la défense antibactérienne pulmonaire reste mal compris. La réponse immunitaire adaptative est initiée dans les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions) et dans les SLTs présents dans le poumon. Les données obtenues dans notre laboratoire indiquent que :

1. les poumons de patients atteints de mucoviscidose ou de dilatations des bronches non mucoviscidiques contiennent de nombreuses SLTs autour des bronches.

2. l'infection bronchique chronique par PA ou SA induit la formation de SLTs autour des bronches en 14 jours chez la souris.

Pourtant, le rôle de ces structures reste inconnu. Le modèle d'infection bronchique chronique par la PA ou le SA chez la souris développé par notre laboratoire est idéal pour étudier les relations hôtes-pathogènes et notamment le rôle des SLTs.

Dans un premier temps, nous étudierons l'effet d'une déplétion en lymphocytes B (LB) sur le contrôle de l'infection pulmonaire chronique à SA ou PA. Nous évaluerons la survie des animaux, la charge bactérienne pulmonaire et l'aspect histologique des poumons (présence et caractéristiques des SLTs).

Dans un second temps, nous étudierons le rôle des SLTs dans la défense antibactérienne secondaire : les souris seront infectées selon le modèle chronique d'infection par SA ou PA. Nous effectuerons une surinfection bactérienne aiguë par le SA ou le PA. Nous évaluerons la survie, et la sécrétion d'anticorps spécifiques.

Nous travaillerons sur des souris issues de la lignée C57BL/6 de phénotype sauvage, lignée que nous utilisons depuis de nombreuses années et à partir de laquelle nous avons mis au point un modèle expérimental original d'infection pulmonaire chronique reconnu par la communauté scientifique et pertinent dans l'étude de la physiopathologie des dilatations des bronches.

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'épargner le plus d'animaux possible tout en obtenant des résultats statistiquement satisfaisants : le nombre d'animaux nécessaire par groupe a été déterminé grâce à des études réalisées en amont. Nous prévoyons d'utiliser 280 animaux environ. Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. Leur état général sera régulièrement surveillé (poids, comportement, apparence). Des antalgiques sont prévus si besoin et un niveau trop élevé de douleur entraînerait l'euthanasie anticipée de l'animal.

La thématique de recherche de notre projet implique l'étude d'organismes vivants complexes (cellules immunitaires, cellules épithéliales...) et les renseignements apportés par ces études animales ne peuvent être obtenus par des techniques alternatives.

Ces données permettraient de progresser dans la compréhension des mécanismes de l'immunité antibactérienne lors de l'infection pulmonaire chronique des patients mucoviscidiques. Elle permettrait d'évaluer les risques des thérapeutiques anti-lymphocytes B (comme le rituximab) qui sont administrées chez les patients mucoviscidiques pour le traitement de pathologies auto-immunes ou dans le cadre de la greffe pulmonaire.

4432. L'hormone minéralocorticoïde aldostérone (aldo) régule la réabsorption rénale de sodium et joue un rôle majeur dans le contrôle de la volémie et de la pression artérielle. L'aldo exerce ses effets dans le néphron distal via le récepteur minéralocorticoïde (RM), un récepteur nucléaire qui est un facteur de transcription dépendant des ligands 1. Le RM est également exprimé dans des cellules non-épithéliales comme les cardiomyocytes et les cellules endothéliales et musculaires lisses 2, 3, 4. L'aldo et le RM jouent un rôle direct ou indirect important dans plusieurs pathologies, indépendamment des effets rénaux de l'aldo. De nombreuses études cliniques et expérimentales animales ont démontré l'implication du couple aldo/RM dans les pathologies cardiovasculaires (insuffisance cardiaque, hypertension, infarctus du myocarde), attestés par les effets bénéfiques induits par l'administration d'antagonistes du RM (spironolactone, éplérenone) 5, 6. Le modèle expérimental associant infusion d'aldostérone, administration de sel et uni-néphrectomie est utilisé depuis plus de 20 ans pour induire une hypertension artérielle dépendante des minéralocorticoïdes. L'utilisation de ce modèle dans des animaux génétiquement modifiés permet d'étudier le rôle de l'expression d'un gène d'intérêt (en ce qui nous concerne le RM) dans un type cellulaire donné, dans la mise en place d'une hypertension artérielle et ses conséquences pathologiques. Cela permet aussi de modéliser l'intérêt thérapeutique d'un antagoniste de ce récepteur dans ce contexte.

Sur la base de notre expérience avec ces modèles animaux, nous avons estimé que pour avoir des résultats statistiquement différents, environ 20 souris par groupe sont nécessaires. Pour chaque expérience nous utilisons 4 groupes différents : un groupe de souris contrôle non traitées, un groupe de souris contrôle traitées, un groupe de souris génétiquement modifiées non traitées et enfin un groupe de souris génétiquement modifiées traitées. Dans chaque groupe 6 souris seront utilisées pour évaluer la réactivité vasculaire et 14 souris pour évaluer les mesures de la pression artérielle et des données métaboliques.

Pour chaque expérience 80 souris seront utilisées. A la suite de chaque expérience et pour vérifier la reproductibilité des résultats obtenus, nous référons une expérience dans les mêmes conditions.

Nous aimerions évaluer ce protocole sur 4 modèles expérimentaux différents : KO NGAL, KO MR VSMC, KO ENaC, et KO endothelium

Ainsi, nous aurons besoin de 640 souris pour finaliser dans les meilleures conditions ce projet, qui va durer 5 ans.

Nos modèles de souris intéressent plusieurs équipes qui travaillent sur d'autres sujets de recherche et sur d'autres organes différents. Les protocoles thérapeutiques, les points limites et les critères d'interruption de l'expérimentation sont définis afin d'assurer le bien-être des animaux au cours de cette étude.

4433. Les maladies liées au métabolisme énergétique (obésité, diabète de type II et le syndrome métabolique) sont un problème important du fait leur prévalence dans le monde. La compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sont à l'origine de ces maladies et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, peuvent contribuer à une amélioration significative et à une meilleure prise en charge des patients qui en souffrent.

Parmi tous les tissus de l'organisme, le tissu adipeux représente un des sites les plus importants impliqués dans le développement de troubles métaboliques. Le tissu adipeux, en fait, produit des signaux hormonaux qui sont capables de réguler des fonctions très importantes dans l'organisme, par exemple, l'appétit, la réponse immunitaire, la coagulation et le tonus vasculaires (hypertension artérielle).

Dans la dernière décennie, plusieurs groupes ont démontré dans des cellules en cultures que le récepteur minéralocorticoïde (RM), une protéine connue pour son rôle dans la régulation de la pression artérielle et l'homéostasie du sodium dans le rein, est activement impliqué dans la physiologie des adipocytes, en particulier la différenciation adipocytaire et la production des signaux inflammatoires.

La détermination des mécanismes moléculaires de l'activation du RM adipocytaire, ainsi que les gènes cibles induits par ce dernier permettrait d'expliquer le rôle du RM dans les désordres métaboliques et de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Techniques expérimentales : L'approche utilisée consistera en l'étude de deux modèles transgéniques conditionnels de surexpression (adipo-MR) et d'inactivation du RM (adipo-MRKO) spécifiquement dans les adipocytes.

Étapes principales : Les animaux seront d'abord soumis à un stress métabolique par différents régimes: a) riche en graisses; b) riche en fructose; c) pauvre en calories (restriction calorique); puis nous utiliserons des approches pharmacologiques: a) traitement par un antagoniste du RM; b) traitement par un inhibiteur spécifique de la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) mitochondriales; c) traitement par un antioxydant; d) traitement par l'angiotensine II.

Nous suivrons ensuite à différentes étapes de l'installation du Smet le poids des souris, le phénotype cardiovasculaire par mesure de pression artérielle à la queue (pléthysmographie) ainsi que des phénotypes métaboliques par mesure de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline.

Des dosages biochimiques plasmatiques (glucose, insuline, adipokines, cytokines, acides gras), seront aussi mesurés à différentes étapes de l'installation du Smet par prélèvement de faibles quantités de sang après biopsie de la queue.

Retombées anticipées : Nous espérons que les résultats de ces travaux nous permettront de cibler des gènes spécifiques et à long terme de transposer ces résultats à des études cliniques.

Nous emploierons deux modèles différents de souris transgéniques de sur-expression (Adipo-MROE) et d'inactivation (Adipo-MRKO) du RM ciblant le tissu adipeux. Nous caractériserons ces modèles en conditions pathologiques (obésité) et nous étudierons l'action d'agents pharmacologiques afin de corriger les effets délétères liés à la pathologie. D'après notre expérience des modèles animaux et en se basant sur la littérature, nous utiliserons un groupe de 12 souris par modèle transgénique pour limiter la dispersion biologique des paramètres étudiés (ceux que nous suivons habituellement dans notre équipe) et pour pouvoir apprécier

les différents résultats (un total de 960 souris sera nécessaire pour l'ensemble du projet qui va durer 5 ans). Nos modèles de souris intéressent d'autres équipes qui travaillent sur des sujets de recherche différents et qui pourront étudier l'impact de Smet sur d'autres organes que nous n'allons pas étudier. Les protocoles thérapeutiques et les critères d'interruption d'expérimentation sont définis afin d'assurer le bien-être des animaux au cours de l'étude.

4434. L'objectif du projet est de caractériser les relations entre des variations de la flore microbienne intestinale et des changements métaboliques de l'organisme hôte dans des systèmes modèles du syndrome cardiométabolique (SCM). Cette recherche se fonde sur des observations récentes du laboratoire et utilise les concepts émergents de métagénomique et d'effets transgénomiques qui jouent un rôle important dans les adaptations fonctionnelles des génomes des Mammifères aux changements de leur environnement et qui peuvent contribuer à une prédisposition accrue à certaines maladies génétiques. Le microbiote intestinal est un système complexe symbiotique entre le mammifère hôte et les milliards de bactéries intestinales qui communiquent avec le métabolisme des mammifères. Ce microbiote transforme les nutriments et permet leur entrée en contact avec l'organisme. La contribution respective du génome de l'hôte dans l'élaboration de la microflore intestinale et du microbiote intestinal dans la régulation de l'expression du génome de l'hôte est un domaine de plus en plus actif de recherche. Les modèles de rats sont des outils essentiels, partageant avec l'Homme de fortes homologues de régulations physiologiques et de composition bactérienne de flore intestinale. Le rat est le modèle animal préféré pour les études de physiologie et de pharmacologie de part les volumes d'échantillons, notamment sanguins, accessibles comparativement à la souris.

Nous utiliserons deux modèles de rat isogéniques développant spontanément des phénotypes centraux dans le SCM: Le rat GK (Goto-Kakizaki), qui présente une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline et le rat SHR (Spontaneous Hypertensive Rat), qui, généré initialement pour étudier les gènes associés à l'hypertension, développe également une insulino-résistance et une dyslipidémie. Deux souches isogéniques contrôles seront utilisées : le rat WKY (Wistar Kyoto) et le rat BN (Brown Norway). 1. Nous effectuerons une étude approfondie séquençage complet des bactéries du cæcum de rat GK, SHR, WKY et BN. 2. Nous déterminerons le rôle du microbiote intestinal dans le développement du SCM chez le rat par une approche *in vivo* par transfert. Pour déterminer le rôle causatif du microbiote intestinal dans le développement du SCM chez le rat, nous effectuerons des expériences de transfert de flore. Les phénotypes mesurés seront le poids corporel, la glycémie, la tolérance au glucose, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Concernant la règle des 3R, le métabolisme glucidique est régulé de façon physiologique par un ensemble de tissus producteurs et cibles de l'insuline, qui rend indispensable des explorations *in vivo* chez l'animal entier. La réduction est prise en compte, n=6 est le n minimum pour avoir des résultats fiables et fins pour le dosage de sécrétion d'insuline effectué par ELISA. Pour le remplacement, nous utiliserons dès que possible des modèles cellulaires pour étudier l'aspect plus mécanistiques des effets physiologiques que nous aurons pu observer *in vivo*. Nous ne multiplierons pas les procédures sur ces animaux. Nous utiliserons 60 rats au total.

4435. Nous nous intéressons à la dystrophie musculaire oculopharyngée (OPMD) qui est une maladie génétique due à une mutation dans le gène PABPN1. Alors que cette protéine est ubiquitaire, seuls quelques muscles sont atteints chez les patients OPMD sans que l'on sache pourquoi. Dans ce contexte, nous nous intéressons à la régénération musculaire chez l'homme, pour comprendre comment elle se déroule et comment elle peut être perturbée dans l'OPMD.

La régénération musculaire c'est le processus par lequel le muscle est capable de récupérer sa fonctionnalité après un dommage. Ce processus est géré par une population de cellules souches, appelées cellules satellites, qui est capable suite à un dommage musculaire de former de nouvelles fibres musculaires. Cependant, peu de choses sont vraiment connues de la régénération d'un muscle humain *in vivo*. En effet la régénération musculaire est principalement étudiée chez la souris soit en étudiant directement la régénération d'un muscle de souris avec tous les acteurs cellulaires murins, soit avec une xénogreffe de cellules humaines dans un modèle de régénération chez la souris immunodéficiente. La possibilité de xénogreffe d'un muscle humain offre donc beaucoup d'avantages pour étudier la régénération musculaire humaine *in vivo*. Le choix d'un modèle de souris immunodéficiente est indispensable puisque il s'agit de tester des biopsies humaines.

Ce projet consiste à étudier la régénération *in vivo* d'un muscle humain isolée à partir d'une biopsie humaine OPMD en le comparant à une biopsie du même muscle prélevé chez des sujets contrôles. Pour cela, le muscle Tibialis Anterior (TA) et le muscle Extensor Digitorum Longus (EDL) de la souris doivent être enlevés et un fragment du muscle humain est greffé chez une souris immunodéficiente. Ce protocole a été largement détaillé dans la littérature. Le muscle humain implanté commence par dégénérer pour ensuite régénérer progressivement avec une revascularisation et une réinnervation, permettant ainsi d'étudier toutes les étapes de régénération musculaire humaine. Une fois le modèle mis en place, différents agents pourront être testés soit 1) pour essayer d'améliorer la régénération musculaire et 2) évaluer des approches de thérapie génique ciblant directement des cibles humaines. Ce projet nous permettra d'envisager et de tester des thérapies géniques et cellulaires plus efficaces pour le traitement de différentes dystrophies musculaires.

Au total, environ 54 souris seront utilisées. En respect de la règle des 3R, le fait que nous allons utiliser du tissu humain permettra de nous rapprocher de la recherche de thérapies chez l'humain. Nous utiliserons des thérapies ayant déjà montré un effet positif dans la régénération musculaire sur des cellules humaines *in vitro* ou que nous avons déjà testé dans notre modèle de xénogreffe de cellules humaines chez la souris. Pour la réduction, nous utiliserons le nombre minimum de souris nécessaire pour avoir des différences statistiquement significatives entre les groupes de souris. Ce nombre de souris sera calculé sur la base des premiers résultats avec l'aide du test statistique pour mesurer la taille des échantillons nécessaires (G Power Software).

Les souris sont anesthésiées. Un traitement analgésique est administré au moment de l'anesthésie afin de renforcer l'analgésie et en période post-opératoire. Suite au réveil, les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de détecter des signes de douleur.

4436. Les valeurs sanguines des ions doivent être maintenues à l'intérieur d'intervalles étroits, sous peine d'entraîner des désordres plus ou moins graves, parfois mortels. L'élévation de la concentration de calcium au-delà des valeurs normales entraîne, entre autres, des effets rénaux : une perte rénale de sel, d'eau et d'acide, au-delà de ce qui est souhaitable, provoquant des désordres de la composition des liquides de l'organisme, parfois grave. Elle entraîne également une perte de calcium, qui est bénéfique puisqu'elle protège contre l'aggravation de l'hypercalcémie. Les mécanismes par lesquels l'élévation de la calcémie entraîne ces désordres rénaux est discutée : certains auteurs pensent que l'ensemble est expliqué par l'activation d'une protéine exprimée dans le rein, appelée récepteur du calcium (CaSR) ; cette protéine est également exprimée dans les cellules parathyroïdiennes et son activation entraîne la baisse de la sécrétion de l'hormone parathyroïdienne (PTH) par le rein, qui a elle-même des effets sur le rein, rendant l'interprétation des données délicate. D'autres auteurs pensent que les effets du calcium sur le rein n'impliquent pas tous la protéine CaSR, en raison de sa distribution restreinte dans certaines parties du rein. Afin d'éclaircir les mécanismes par lesquels le calcium extracellulaire entraîne des dysfonctionnements du rein, nous proposons de comparer les effets de 3 situations activant par des mécanismes distincts le récepteur du calcium CaSR. Un quatrième groupe, ne recevant ni régime ni traitement, servira de témoin. Si tous les effets rénaux de l'hypercalcémie sont dus à l'activation du récepteur du calcium dans le rein, ils doivent être reproduits par le régime riche en magnésium et le traitement par cinacalcet.

Cette étude sera réalisée chez des rats adultes, mâles : le rat est l'animal pour lequel le plus grand nombre d'informations à l'état basal est disponible, en particulier concernant la variabilité des variables biologiques. La quantité d'urine émise par ces animaux est grande, permettant de réaliser les recueils et les analyses dans de bonnes conditions. La règle des 3R a été appliquée le mieux possible lors de l'élaboration du protocole d'étude. Toutes les procédures le nécessitant et le permettant seront réalisées sous anesthésie. Le nombre d'animaux par groupe a été calculé en tenant compte de la variabilité des excrétions ioniques urinaires chez les animaux en fonction des conditions expérimentales, de l'hypothèse que les drogues ou régimes utilisés entraînent une variation des excrétions urinaires d'au moins 40 %. Les mesures réalisées tiennent compte de l'état de l'art de manière à avoir la meilleure performance des mesures réalisées et réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. 40 animaux (10 par groupe) sont utilisés dans le projet. Il n'y a pas d'alternative à cette étude *in vivo*, les modèles cellulaires existant ne permettant pas de rendre compte de la complexité du fonctionnement du rein intact.

4437. Notre programme est axé sur la mise en œuvre de nouvelles biothérapies innovantes pour le traitement des cancers des voies aéro-digestives supérieures, afin de proposer une meilleure prise en charge des patients atteints par ce type de cancer. Ce programme de recherche implique des études *in vivo* reposant sur l'utilisation de différents modèles précliniques focalisés sur des modèles pathologiques murins qui consisteront à :

1 - Reproduire la pathologie :

- i) Par inoculation de lignées cellulaires tumorales (murines) et d'explant de tumeurs humaines au niveau ectopique (dans le dos) et ortho-topique (dans la joue), situation qui se rapproche de la réalité clinique des cancers des VADS.
- ii) Par l'utilisation de souris génétiquement modifiées qui développent la pathologie suite à l'ingestion d'un agent chimique dans l'eau de boisson.

2 - Mesurer, caractériser et valider les effets thérapeutiques de ces stratégies anti-tumorales innovantes dans les modèles murins de la pathologie. Les approches technologiques mise en œuvre consisteront, d'une part au suivi de l'évolution de la tumeur (pousse ou régression tumorale) afin de valider les effets thérapeutiques des traitements, et d'autre part en des analyses de la réponse immunitaire aux traitements. Ces techniques comprendront des mesures *in vivo* (mesure métrique et en bioluminescence) et *ex-vivo* (histologie, sérologie, culture cellulaire, cytométrie...) à partir des organes et des tumeurs, techniques qui permettent de répondre à un grand nombre de questions à partir d'un seul animal.

Ce programme de recherche sera développé dans le respect de la règle des 3R. Il sera tiré profit de chaque animal pour nous apporter le maximum d'information. Une vigilance particulière sera apportée concernant les animaux destinés au suivi tumoral : une surveillance journalière visant à anticiper un inconfort réel ou potentiel sera mise en place (observation du comportement, pesée, macroscopie de la tumeur) et un point limite mis en place. Si possible, nous utilisons les données de manière transversale entre les protocoles afin de réduire le nombre d'animaux. Les groupes d'études sont fait le plus souvent en même temps afin de réduire le nombre de groupe contrôles. Et enfin nous améliorons au maximum nos protocoles pour maîtriser la souffrance animale ainsi que les variations individuelles qui peuvent en découler. Considérant l'ensemble de ces procédures appliquées sur la diversité des protocoles expérimentaux et la nécessité de mise en accouplement, le nombre d'animaux utilisés représente autour de 2500 souris /5 ans.

4438. Les maladies hémolytiques rénales conduisent à la formation de thrombi dans les microvaisseaux rénaux, provoquant une lyse des globules rouges au site thrombotique et une lésion de l'endothélium des glomérules. Ces phénomènes sont induits par le système du complément, suractivé contre le soi dans ces conditions et responsable d'insuffisance rénale aiguë. Le système du complément, composante du système immunitaire, intervient comme première ligne de défense contre les pathogènes dans la circulation sanguine. Cependant, une suractivation peut conduire à des lésions au niveau des tissus et des organes de l'hôte. Cette suractivation est notamment observée dans différentes pathologies conduisant à une insuffisance rénale aiguë. Parmi ces maladies,

on trouve fréquemment des anomalies génétiques conduisant à un déficit quantitatif et ou qualitatif du principal régulateur du complément, le facteur H. Cependant, tous les porteurs des mutations ne développent pas la maladie. Un facteur déclenchant est nécessaire à l'apparition des symptômes. L'hémolyse induit le relargage des composants des globules rouges dans la circulation sanguine. L'hème notamment, constitue un puissant facteur toxique, pro-oxydant et pro-inflammatoire lorsque son système de recyclage, assuré par l'hémopexine, est saturé. Notre équipe a démontré in vitro qu'un contexte hémolytique peut activer le complément sur les cellules endothéliales rénales. Cette activation est exacerbée en présence de sérum de patients porteurs de ces mutations du FH. Nos résultats non publiés démontrent que l'ajout d'hémopexine purifiée inhibe les effets de l'hème sur l'activation du complément. D'un point de vue mécanistique, nous avons démontré que l'hème participe à l'activation du complément en se liant à un récepteur (TLR-4) à la surface des cellules endothéliales. Ces résultats conduisent à l'hypothèse que l'activation du complément à la surface de ces cellules se fait de façon TLR-4 dépendante en condition hémolytique. Nos résultats in vitro ont confirmé cette hypothèse, avec une diminution des dépôts de complément après blocage du TLR-4. L'ensemble de nos résultats in vitro suggèrent que l'hème peut être un facteur déclenchant du SHU atypique et que ses effets peuvent être contrôlés par l'hémopexine et l'inhibiteur de TLR-4. En conséquence, l'hémopexine et l'inhibiteur de TLR-4 pourraient avoir un effet thérapeutique sur l'activation du complément induite en condition hémolytique pour prévenir les lésions vasculaires au niveau rénal. Afin d'aller plus loin, il est nécessaire de tester ces molécules à potentiel thérapeutique sur un organisme vivant complet afin de tester et d'anticiper le bénéfice éventuel apporté, qu'un système in vitro cloisonné ne permet pas. Un nouveau modèle murin a été développé, utilisant des souris déficientes en facteur H. Ce modèle in vivo déclare les mêmes signes cliniques observés chez les patients, notamment l'anémie hémolytique et l'insuffisance rénale. L'hémolyse constitue un facteur commun à un large panel de maladies. Les résultats de ce projet ouvriront de nouvelles voies sur l'étude du complément dans d'autres modèles pathologiques, ainsi que l'utilisation des deux inhibiteurs comme thérapeutiques envisageables.

Conformément à la directive 2010/63/UE et des arrêtés du 1er février 2013, les règles de bien-être animal et la théorie des 3R seront respectées. Les expériences menées in vitro nous ont permis de remplacer dans un premier temps le modèle animal, afin de prouver l'efficacité potentielle des deux molécules testées. Par ailleurs, une attention particulière sera portée au raffinement de l'environnement des animaux. Leur nombre ne dépassera pas les 5 souris par cage, et l'environnement sera complété avec du matériel afin de créer un environnement non stressant pour l'animal. Le raffinement de notre protocole expérimental par des approches non invasives pour suivre l'évolution de la pathologie par analyse d'urines permettra d'effectuer le suivi à long terme. Ceci permettra de diminuer le nombre de groupes expérimentaux. Enfin, les doses efficaces testées par l'approche in vitro, et l'anticipation des doses adéquates à injecter par l'étude bibliographique permettent de réduire le nombre de souris utilisées. Cependant, afin de valider notre hypothèse et prouver l'efficacité de ces molécules dans nos conditions pathologiques, le nombre requis de souris est de 660.

4439. L'efficacité de la majorité des traitements anti-tumoraux réside dans l'élimination de la totalité des cellules tumorales par des effets cytotoxiques directs. Cependant, les thérapies conventionnelles ne remplissent pas toujours cet objectif et sont associées à une lourde mortalité. Récemment, il a été démontré que la mort cellulaire induite par certains médicaments anti-tumoraux conventionnels (anthracyclines) pouvait générer une réponse immunitaire anti-tumorale participant de façon synergique à l'efficacité thérapeutique. L'utilisation de méthodes de génotypage à haut débit nous a permis d'identifier un polymorphisme du gène Autophagy-related protein 16-1 (ATG16L1) impliqué dans l'efficacité de la chimiothérapie. La présence de ce polymorphisme a été corrélée à une survie réduite chez des patients atteints de cancer de la tête et du cou (HNSCC pour head and neck squamous cell carcinoma) recevant une chimiothérapie d'induction à base de sels de platine et 5-fluorouracile (5-Fu) puis une radiochimiothérapie adjuvante à base de sels de platine. Jusqu'à présent, la relation fonctionnelle entre le polymorphisme ATG16L1 et la mort cellulaire immunogène n'a pas été étudiée. Le but de ce projet consiste à évaluer cette relation. Nous souhaiterions effectuer cette étude en utilisant des souris immunocompétentes: C57Bl/6 (n=2920) et 2 modèles de souris transgéniques : (i) C57BL/6 Atg16l1T300A knock-in (n=900); (ii) C57BL/6 Atg16l1f/f (n=900) déficientes en autophagie. Cette étude ne peut être conduite qu'in vivo car il n'existe pas de modèles alternatifs pour étudier la chimio-sensibilisation à la chimiothérapie d'un organisme entier (toxicité, effets immuno-dépendants). Nous avons choisi la souris comme modèle pour la facilité d'hébergement, d'élevage (rapidité de reproduction et nombre de souris par portée) et l'accès au développement d'animaux transgéniques. De plus, les animaux sauvages issus des croisements nécessaires à l'obtention des souris transgéniques seront utilisés dans les expérimentations. Nous effectuerons des expériences de vaccination et croissance tumorale. Pour la réalisation de cette étude, nous chercherons à regrouper les expérimentations dans le but de garder un nombre minimum d'animaux pour les groupes contrôles. Néanmoins, nous pourrions être amenés à utiliser moins de souris si nous observons une significativité avec moins de souris. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales invalident l'hypothèse de travail. La stabulation des animaux sera conventionnelle et ils recevront un régime alimentaire normal. Un milieu enrichi adapté est prévu pour l'hébergement des souris pour minimiser l'anxiété (présence dans les cages de nids végétaux et/ou tunnels en cartons). Ce projet vise à une meilleure compréhension de la fonction de ATG16L1, un facteur prédictif négatif pour la réponse aux traitements anti-carcéaux à base de sels de platines, afin d'orienter la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques chez les patients atteints de HNSCC. Nous anticipons que l'accomplissement de ce projet fournira des connaissances sur la régulation de la réponse immunitaire aux cancers pour la mise en place de stratégies thérapeutiques ciblées.

4440. La sarcoïdose est une maladie systémique d'étiologie inconnue qui est caractérisée par la formation de granulomes immuns dans différents organes, principalement les poumons, le système lymphatique, la peau. Dans le cas de granulomes persistants, on peut assister au développement d'une fibrose pulmonaire avec le remplacement progressif du parenchyme pulmonaire par du tissu

conjonctif ainsi que la production excessive de matrice extracellulaire. La destruction du parenchyme pulmonaire et le développement du processus fibrosant altèrent la fonction respiratoire en réduisant l'élasticité pulmonaire et la surface d'échanges gazeux chez les patients atteints de fibrose pulmonaire provoquant une insuffisance respiratoire chronique. Des études récentes ont montré un taux élevé d'apnée obstructive du sommeil chez les patients atteints de sarcoïdose. L'hypoxie intermittente chronique est une fonction caractéristique de l'apnée du sommeil. Ses effets sur le développement et la persistance des granulomes et de la fibrogenèse dans la sarcoïdose pulmonaire sont inconnus.

Notre projet consistera à évaluer le rôle de l'hypoxie dans la sarcoïdose, en particulier dans la formation, le maintien et la fonction des granulomes et leur association à la sévérité de la sarcoïdose et la fibrogenèse.

Le projet se déroulera en accord avec les exigences de remplacement, réduction et de raffinement très fortement encouragées dans la nouvelle directive européenne. Nous disposons de lignées cellulaires qui nous permettront de "screener" des formulations de nanoparticules et de peptides bactériens plus adéquats et nous mesurerons ainsi leur impact sur les réponses cellulaires. Par la suite, nous confirmerons ces effets dans un modèle souris qui nous permettra d'évaluer les réponses de l'hôte. En effet, certains mécanismes impliqués dans la formation des granulomes et la fibrogenèse se développant autour de ces granulomes (recrutement de multiples types de cellules inflammatoires, activation des cellules mésenchymateuses) ne peuvent être étudiés que dans des modèles *in vivo*. Nous avons choisi la souris comme modèle animal car c'est un excellent modèle qui réplique un certain nombre de mécanismes physiopathologiques rencontrés dans la fibrogenèse humaine. L'expérience de notre équipe dans l'utilisation de modèles murins nous permettra de réajuster le nombre de souris par groupe expérimental. Nous utilisons des méthodes statistiques non paramétriques pour l'analyse des résultats, et ceux-ci sont présentés au sein de l'équipe lors de séminaires hebdomadaires, pour une analyse critique et pour affiner le déroulement des expériences complémentaires. Nous estimons à environ 1152, le nombre de souris nécessaire pour la durée de notre projet (5 ans). Le personnel formé travaillant avec les animaux possèdent leur diplôme en Expérimentation animale de niveau I ou niveau II. Les conditions de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire les plus possibles toute souffrances que pourrait ressentir les animaux.

4441. La dopamine exerce un rôle neuromodulateur clé dans l'accomplissement de nombreux processus centraux, tels que les processus cognitifs, les processus d'apprentissage ou encore le contrôle des fonctions motrices. Des altérations de sa signalisation ont été décrites dans la survenue de pathologies psychiatriques et neurologiques graves, telles que la schizophrénie, les addictions, ou encore la maladie de Parkinson, qui affecte plus de 4 millions d'individus à travers le monde. En condition physiologique, l'activité électrique tonique des principaux neurones producteurs de dopamine dans le cerveau, amène à une présence continue de dopamine dans le striatum, où réside une population spécifique de neurones cibles, les neurones épineux striataux. L'action de la dopamine sur ces neurones épineux met en jeu les récepteurs à la dopamine des groupes D1 et D2, qui modulent de manière opposée la cascade de signalisation intracellulaire impliquant l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et la protéine kinase dépendant de l'AMPC (PKA).

L'imagerie de biosenseurs est un outil d'investigation qui permet d'enregistrer en temps réel, par microscopie optique, des signaux biologiques spécifiques au sein de cellules vivantes (en culture, dans des préparations *ex vivo*, ou *in vivo*). Nos biosenseurs sont des protéines codées génétiquement que l'on fait exprimer dans les neurones par transfection virale, et qui indiquent par des changements de fluorescence l'état d'un processus d'intérêt au sein de la cellule. Ces rapporteurs optiques permettent ainsi de suivre la dynamique spatiale et temporelle d'un signal intracellulaire comme le signal AMPC/PKA. Cette approche innovante est particulièrement remarquable car elle permet de suivre le décours temporel d'événements biologiques transitoires. Le suivi d'événements transitoires est particulièrement important dans le cas de la dopamine car elle est libérée dans le striatum de manière très brève (moins d'une seconde).

Dans le projet que nous souhaitons à présent démarrer, l'objectif est de montrer comment les réponses caractéristiques de ces neurones striataux peuvent être changées au cours du temps, chez la souris vieillissante, et également dans le cadre d'une déplétion chronique en dopamine, chez la souris hémi-parkinsonienne, avec ou sans traitement anti-parkinsonien. Pour mener à bien ce projet, 200 animaux seront utilisés. La règle des 3R sera appliquée tout au long du projet : 1) Réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum tout en permettant de générer des données statistiques solides ; 2) Raffinement, la douleur et l'angoisse des animaux seront minimisées par des mesures de soin et des conditions d'hébergement adaptées ; 3) Remplacement, nos études nécessitent l'utilisation de neurones vivants issus de cerveaux de rongeurs. Néanmoins nous travaillons actuellement à l'élaboration d'un modèle d'étude *in silico*, en collaboration avec une équipe de modélisateurs.

4442. La consommation de fructose associée aux repas est reconnue pour déclencher des effets délétères comme l'obésité. Cependant, son ingestion en quantités modérées et à jeun lors des états cataboliques pourrait avoir un impact bénéfique sur le métabolisme protéique et des acides aminés (AA). Dans ces circonstances le fructose est capable de réduire les pertes d'azote, épargnant de ce fait les protéines corporelles. Cette épargne aurait lieu via la synthèse du glycogène et une substitution des AA comme substrat de la néoglucogenèse, mais aussi via une moindre sollicitation du muscle grâce au maintien des réserves énergétiques des organes se trouvant en amont (foie et intestin). En revanche, si cette épargne d'azote peut avoir un impact sur la masse musculaire reste de nos jours inconnu. Aucune étude ne s'est intéressée à un possible impact de la consommation fructose à jeun sur la perte de masse musculaire au cours du vieillissement (sarcopénie). Pourtant, cette population présente des caractéristiques de dénutrition protéino-énergétique et une faible capacité de récupération post-état catabolique. La consommation de fructose à jeun chez la personne âgée dans ces circonstances pourrait atténuer la perte de masse musculaire grâce à sa capacité à réduire les pertes d'azote et à épargner les AA. Elle pourrait également accélérer la récupération après le retour à une alimentation normale. Ces hypothèses seront testées dans un modèle de rat âgé soumis à une situation catabolique nutritionnelle : une

dénutrition protéino-énergétique mimant celle d'une population âgée. Afin d'éviter un impact délétère du fructose sa consommation (15% de l'énergie journalière) sera dissociée du repas (accessible uniquement pendant la période post-absorptive). Nous allons explorer l'impact sur la masse musculaire, mais aussi sur la synthèse et utilisation, ainsi que sur le métabolisme des AA. Le métabolisme du fructose sera aussi étudié. Nous espérons mettre en évidence un impact positif de la consommation de quantités modérées de fructose en dehors des repas sur le métabolisme des AA au cours du vieillissement. Nous espérons par la suite constater que l'épargne des AA aura un effet positif sur la masse musculaire. L'approche proposée dans le projet permettra d'envisager des interventions nutritionnelles visant à limiter la fonte musculaire chez des individus âgés et dénutris.

Le projet prévoit donc la mise en place d'une intervention nutritionnelle chez le rat dénutri (n=120) afin de caractériser les effets des glucides sur le métabolisme des acides aminés sur le maintien de la masse musculaire. Les animaux seront nourris avec 8g de croquettes (20g pour les témoins) renforcés avec les quantités nécessaires de vitamines et minéraux afin de cibler une dénutrition protéino-énergétique uniquement et minimiser une fragilité associée à un déficit en vitamines et minéraux.

Ce projet, de physiologie intégrative (interactions entre tissus et organes pour l'utilisation des acides aminés) ne peut être réalisé que sur des organismes intègres et in vivo. Aucune méthode in vitro ne permet de mettre ainsi en évidence et de quantifier les échanges d'acides aminés entre tissus et organes (muscle, foie et intestin en particulière).

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale, réduisant au minimum le nombre d'animaux nécessaires pour la réalisation du projet. Aucune douleur, angoisse ou souffrance significatives ne sont, a priori, associées à cette procédure (aucune mesure associée au raffinement est nécessaire).

4443. La dépression est une pathologie qui touche 10 à 20% de la population. Les molécules antidépresseur actuellement disponibles ont un délai d'action substantiel (2-3 semaines) ainsi que des effets secondaires non négligeables. Par ailleurs, un tiers des patients dépressifs présente une résistance à ces molécules. Ainsi, le développement de nouvelles molécules ayant un délai d'action plus rapide et de moindres effets secondaires, constitue un réel enjeu de santé publique.

Des dérivés non métabolisables de la prégnénolone sont développés à des fins thérapeutiques. Parmi eux, le 3beta-methoxyprégnénolone (MAP4343) possède une cible tout à fait originale, puisqu'il a été montré qu'il active le système microtubulaire, l'un des composants du cytosquelette neuronal. Ainsi, via cette action le MAP4343 serait capable de stimuler la plasticité cérébrale. Considérant l'existence d'altérations de la neuroplasticité dans la pathologie dépressive, MAPREG développe le MAP4343 en tant que nouvel « antidépresseur ». Une première étude préclinique utilisant un modèle animal validé, consistant à induire un stress d'isolement social chez le rat, a montré que le MAP4343 était capable de prévenir les modifications comportementales induites par l'isolement².

L'objectif de notre projet est de consolider la preuve de concept préclinique de l'efficacité antidépressive de notre molécule MAP4343 à l'aide d'un modèle animal spontané de dépression. Il s'agit d'utiliser d'une souche cosanguine de rat qui présente un comportement spontané de type anxiodépresseur.

Les animaux de cette souche, ainsi que ceux issus d'une souche contrôle, seront traités par le MAP4343 à différentes doses. Les effets comportementaux et cellulaires du MAP4343 seront évalués et comparés à ceux d'autres antidépresseurs avérés tels que la fluoxétine. Ce projet nécessitera l'utilisation d'environ 160 rats sur 5 ans.

Au cours de la réalisation de ce projet, nous nous efforcerons de respecter la règle des « 3R », réduction, raffinement et remplacement. Pour la réduction du nombre d'animaux nous utiliserons un nombre minimum d'effectifs permettant d'utiliser des tests statistiques appropriés. Pour le raffinement, nous éviterons au maximum d'induire un stress et ou une douleur aux rats. Ainsi, les rats ne seront pas isolés, ne seront pas soumis à des expériences provoquant une douleur. Les expériences seront immédiatement arrêtées si une dégradation de l'état de santé de l'animal est observée. Enfin, dans la mesure où une évaluation comportementale est impossible à faire in vitro, il ne nous est pas possible de remplacer les animaux utilisés.

4444. La sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou maladie de Charcot est une maladie caractérisée par une dégénérescence des neurones moteurs qui survient pendant la vie adulte et qui conduit à une paralysie fatale. Après plus de vingt années de recherches intensives, il n'existe toujours pas de traitement pour cette terrible maladie qui touche 500.000 personnes dans le monde. La plupart des études se sont focalisées sur les périodes symptomatiques ou présymptomatiques et non sur les mécanismes initiaux conduisant fort probablement à la survenue de la maladie. Dans le cadre de nos recherches, nous proposons d'analyser la maturation des réseaux neuronaux moteurs embryonnaires chez le modèle murin le plus utilisé et le plus fiable, la souris SOD1G93A, ceci au moment où ces réseaux locomoteurs acquièrent leurs caractéristiques adultes et lorsque la maturation de la transmission inhibitrice GABAergique/glycinergique survient. Nous proposons également d'agir, pendant la vie embryonnaire, sur les mécanismes impliqués dans la mise en place de la transmission synaptique et de tester si la survenue de la maladie est modifiée lors de la vie adulte. Un développement anormal du réseau motoneuronal pourrait avoir des conséquences tardives conduisant à la dégénérescence des motoneurons pendant la vie adulte et à la paralysie fatale chez les patients SLA. Notre programme est un premier pas vers de nouvelles stratégies de recherche qui seront essentielles pour diagnostiquer la SLA à des stades précoces.

La présente demande de saisine porte sur l'élevage de la lignée murine transgénique SOD1G93A (souris porteuses d'une transgène humain SOD1 muté - glycine substituée par alanine en position 93), modèle de la SLA. Cette lignée murine présente un phénotype délétère à l'état hétérozygote.

D'un point de vue méthodologique, nous nous engageons à respecter au maximum la règle des 3 R (remplacement, réduction, raffinement):

- Remplacement: des expériences de simulations informatiques sont réalisées afin de remplacer/compléter certaines données expérimentales. Cela permet de remplacer l'utilisation des souris et de réduire le nombre d'animaux.

- Réduction: afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, notre projet basé sur des méthodes variées permet d'utiliser au maximum tous les embryons et animaux néonataux disponibles issus d'une portée. Concernant les expériences réalisées chez l'adulte, un nombre minimum d'animaux est programmé en accord avec les tests statistiques qui seront réalisés à posteriori.

- Raffinement: les animaux sont observés quotidiennement par un personnel qualifié afin que des mesures soient prises rapidement, avec les conseils d'un vétérinaire, si des signes délétères apparaissent. Le milieu d'élevage est enrichi grâce à l'utilisation de tunnels (pour se cacher), jouets, matériel de nidification, copeaux de peuplier, etc.

Dans son ensemble, notre projet est basé sur l'utilisation de 250 animaux sur 5 années de recherche, soit 50 souris / an.

4445. La douleur occupe une place importante dans notre société, impactant à la fois sur la productivité et le coût de la santé. A l'heure actuelle, dans le cas de douleurs aiguës ou chroniques sévères, il n'existe aucun traitement thérapeutique autre que l'utilisation des opiacés. De fait, la seule alternative à la tolérance analgésique reste la rotation des molécules opiacées en milieu clinique. Le développement de nouvelles molécules analgésiques est donc un challenge extrêmement important. Récemment, un fragment d'une protéine essentielle du métabolisme énergétique a été caractérisé comme possédant une forte activité analgésique. Les modèles de culture de lignées cellulaires se heurtent à une transposition dans des modèles intégrés permettant la compréhension et la visualisation de propriétés analgésiques. Le développement de nouveaux antalgiques nécessite par conséquent obligatoirement une approche *in vivo* utilisant des modèles de souris et de rats douloureux. Notre objectif est de déterminer si l'activité analgésique du fragment de cette protéine représente une alternative à l'utilisation de la morphine en testant son activité sur des modèles de souris ayant des douleurs chroniques (neuropathie mimant une sciatique).

Ce projet utilise un modèle validé de douleur neuropathique afin de tester l'effet de peptides analgésiques après une injection dans la moelle épinière. L'effet analgésique des peptides sera déterminé à l'aide d'un test de nociception basé sur le réflexe de retrait de la patte à l'application. Ce test, qui détermine le seuil de sensibilité nociceptif, est considéré comme peu douloureux puisque l'animal peut retirer sa patte dès qu'il ressent une douleur. Notre but est de déterminer le plus petit peptide dérivé de ce fragment possédant une activité analgésique afin de produire, à terme, une nouvelle molécule analgésique palliant la morphine. Un nombre minimum d'animaux à tester de 141 a été établi et se base sur les approches nécessaires au projet qui implique un nombre important d'animaux contrôles.

Règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer):

-Un total de 97 souris mâles et de 44 rats mâles sera utilisé lors de ces études. Ce nombre correspond au nombre minimal d'animaux par groupe (soit 8) permettant d'identifier le plus court peptide ayant une activité analgésique.

-Les animaux sont placés en cage par groupe 5 individus. Ils seront maintenus un environnement enrichi selon les procédures en vigueur à l'animalerie (barre de bois à ronger, nid) qui permet un bien être optimal des animaux (procédures en vigueur à l'animalerie).

-Nos modèles de cultures cellulaires se heurtent à une transposition dans des modèles intégrés en particulier quand les études touchent la compréhension des mécanismes impliqués dans la douleur et la mise en évidence de propriétés analgésiques. Le développement de nouveaux antalgiques nécessite, par conséquent, une approche *in vivo*.

Dans notre cas, l'administration des peptides induit une analgésie au bout de 3h et cette analgésie perdure au moins 3h. Concernant les voies d'administration, les injections I.T. sont considérées comme invasives et seront réalisées sous anesthésie. Nos tests de sensibilité mécanique (Filaments de Von Frey) seront utilisés réalisés le matin 3 h après les injections du peptide (injection à 9h) et ce, durant une plage horaire entre 12h et 15h. Ces tests permettront de déterminer si les animaux ont développé une analgésie suite à l'administration des peptides.

4446. Nous souhaitons mieux comprendre la biologie des tumeurs du sein. Nous nous intéressons aux tumeurs du sein dont la croissance dépend des œstrogènes et androgènes. Nous avons montré que des tumeurs humaines de ce type poussent bien dans les canaux qui amènent le lait au mamelon des souris. Pour introduire les cellules dans les canaux nous les injectons au mamelon. Cette approche est la seule qui permet actuellement de maintenir les cellules tumorales de ce type en bon état en dehors du corps humain. Nous souhaitons: 1. comprendre quel aspect des canaux favorise la croissance des tumeurs du sein, 2. utiliser les canaux pour établir des cultures de tumeurs du sein de patientes traitées dans notre institut, 3. tester la réponse des tumeurs aux traitements anticancéreux. En ce qui concerne les 3R: Raffinement: 1. Avant d'injecter les cellules nous les marquons avec des protéines fluorescentes. Ceci permet de suivre les greffes quand leur taille est nettement inférieure aux tailles habituelles. Par conséquent il est souvent possible de compléter l'expérience avant que les tumeurs soient palpables ou visibles à l'œil nu. 2. Nous avons modifié la technique d'injection qui fait que nous n'avons plus besoin d'inciser la peau au moment de l'injection. Réduction: L'efficacité de l'approche intracanalair est de 75-100%, comparé à un taux de succès de 5% par injection sous la peau. Nous avons donc besoin de moins d'animaux. Remplacement: Plusieurs nouvelles approches de cultures cellulaires dites "organoïdes" ou "3D" viennent d'être inventées. Nous utilisons une partie des cellules greffées pour mettre en place et améliorer ces techniques de culture *in vitro*. A terme les souris ne seront pas utilisées pour établir les cultures mais seulement pour valider que les cultures établies ressemblent à la tumeur d'origine. Le nombre de souris prévu pour le projet est 1065.

4447. Dans ce projet, nous nous intéressons à deux maladies neuromusculaires rares. Ces myopathies sont un groupe hétérogène de maladie aussi bien d'un point de vue génétique que phénotypique. Elles apparaissent à l'âge adulte et induisent des faiblesses musculaires associées ou non à des cardiomyopathies. Généralement, ces pathologies se transmettent de manière autosomale dominante, détruisant progressivement les muscles des personnes atteintes. Des mutations touchant au moins six gènes ont été

impliquées dans ce type de maladie. Nous nous intéressons à deux de ces gènes et plus particulièrement à trois mutations D399Y, I451M pour le premier et R388P pour le second provoquant des symptômes sévères. La dernière mutation venant juste d'être identifiée. A ce jour aucun traitement, même palliatif, n'est disponible pour les patients et les mécanismes d'apparition de ces pathologies restent encore très peu connus.

Les biopsies, déjà très rares, correspondent généralement à des prélèvements de peau donc peu propices à l'étude des mécanismes physiopathologiques ou au développement de traitement. Dans ce contexte, il est indispensable d'obtenir des modèles animaux plus proches de l'état des patients. Les souris étant un modèle bien établi et proche de l'homme dans le domaine des pathologies musculaires, nous avons choisi cette espèce. Dans notre projet, nous avons opté pour l'injection locale de virus de type AAV permettant l'expression de nos protéines d'intérêt (sauvages ou mutantes) en intramusculaire ou en intracardiaque évitant de devoir générer une lignée par mutation, ce qui permet au final de réduire le nombre d'animaux utilisés (règle des 3R). Bien entendu, cette étude sera réalisée dans les normes du bien-être animal avec un enrichissement spécifique apporté dans les cages (outil de nidification) et les souris resteront groupées afin de conserver leurs interactions sociales. L'analyse se réalisant 1 à 2 mois après l'injection, ce modèle nous permettra donc de comparer différents mutants en parallèle tout en limitant localement l'atteinte des animaux. Cependant, due à la variabilité des injections et dans le cadre de la règle des 3 R, pour réduire le nombre d'animaux au plus juste, nous injecterons donc deux muscles de chaque patte pour nous permettre avec un même animal de réaliser toutes les analyses nécessaires d'un point de vue histologiques (coupes cryocongelées sur un premier muscle, ou les 2/3 du cœur) et moléculaires (PCR, analyse protéiques sur le second muscle ou sur l'apex cardiaque). En effet dans ce projet, notre but est double. Premièrement, nous pourrions étudier les mécanismes de l'apparition de la maladie à l'état de base (au repos, vie sédentaire), mais également de voir l'effet d'un exercice sur l'évolution de la pathologie. En effet ce point permettra de compléter des résultats obtenus sur des cellules murines qui nous ont permis d'obtenir des résultats préliminaires en remplacement de l'étude animal. Cependant, à partir de cette étude, nous devons maintenant déterminer si l'exercice chronique ou aigu (en particulier le stress oxydant en résultant) est réellement un facteur aggravant *in vivo* dans ces pathologies. Pour cela, nous étudierons les caractéristiques histologiques et moléculaires de ces maladies pour chaque mutant spécifique. Deuxièmement, une même approche cellulaire nous a permis de sélectionner des candidats à potentiel thérapeutique qui pourrait si ce n'est empêcher du moins ralentir la progression de ces pathologies. Cette étude préalable a permis de réduire le nombre de molécule à tester sur les animaux et par conséquent de limiter leur utilisation au strict minimum. Il est maintenant indispensable de tester ces traitements pharmacologiques potentiels sur notre modèle animal en suivant les caractéristiques que nous aurons préalablement établies. Ainsi cette étude est un premier pas pour à plus long terme réussir à soulager les patients. Grâce à nos études cellulaires préliminaires (Remplacement de la règle des 3 R), nous avons donc pu sélectionner les effets les plus significatifs à tester sur les animaux de manière à limiter le nombre de souris utilisées dans ce projet (Réduction de la règle des 3R) et enfin l'utilisation de la stratégie AAV sur 2 muscles permettent d'obtenir tous les éléments nécessaires en limitant la souffrance animal (Raffinement de la règle des 3R). Ainsi l'ensemble de toutes ces études au niveau musculaire et cardiaque, nécessitera donc l'utilisation de 1205 souris au total sur 5 ans.

4448. L'Anémie infectieuse des équidés (AIE) est l'une des onze maladies listées par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE), le virus responsable de la maladie (EIAV) appartient à la même famille que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). L'EIAV se transmet par des insectes hématophages principalement et par voie iatrogène. Une fois infecté l'équidé est porteur du virus toute sa vie et peut le transmettre à ses congénères.

Selon la réglementation en vigueur dans les pays européens, les chevaux séropositifs pour l'AIE sont, soit euthanasiés, soit maintenus en quarantaine durant toute leur vie. L'AIE représente donc un impact économique majeur par l'abattage des animaux séropositifs et par les restrictions de mouvements et embargos associés aux foyers déclarés. En l'absence d'un vaccin efficace, le contrôle de l'AIE repose essentiellement sur l'identification puis l'euthanasie des chevaux infectés en utilisant un test sérologique qui permet de mettre en évidence les anticorps dirigés contre l'EIAV. L'immunodiffusion en gélose (IDG) est le test officiellement recommandé par l'OIE pour les échanges internationaux même si récemment plusieurs tests ELISA commerciaux ont été développés.

Le dépistage de l'AIE étant exclusivement réalisé par détection des anticorps anti-EIAV qui apparaissent dès la primo-infection et qui persiste toute la vie de l'équidé, il est donc nécessaire de disposer de sérum de référence avec un titre connu en anticorps. A fournir aux laboratoires agréés Français ainsi qu'aux Laboratoires Nationaux de Référence (LNR) Européens. Le sérum développé selon les recommandations de l'OIE sera également proposé à la commission des normes biologiques de l'OIE pour être reconnu comme réactif de référence.

Pour produire ce sérum, deux ponettes Welsh seront infectées expérimentalement par deux souches virales différentes d'EIAV.

Remplacement : il n'existe pas de modèle expérimental alternatif pour produire des immuns sérums contre l'AIE.

Réduction : Deux animaux sont suffisants pour produire une quantité importante de sérum de références tout en évitant l'isolement d'un animal pendant une période importante.

Raffinement : Les animaux seront hébergés ensemble afin de préserver un lien social. Ils disposeront d'une zone de couchage et d'une zone d'exercice. Afin de limiter les manipulations et de fiabiliser les données la température corporelle sera enregistrée par télémétrie.

4449. La recherche sur les protéines de la matrice dentaire (PMD) est centrée sur la compréhension de leurs rôles dans l'émail en cours de biominéralisation. Malgré leurs nombreuses applications thérapeutiques en ingénierie tissulaire, l'expression et la fonction biologique des PMD dans des tissus non-amélaire tels que les os des mâchoires et le ligament dento-alvéolaire restent

relativement peu étudiées. Ce projet se propose d'étudier plus particulièrement trois protéines dentaires majeures, l'amélogénine (AMEL), l'améloblastine (AMBN) et la dentine sialo-phosphoprotéine (DSPP), au niveau des os de la mâchoire (os alvéolaire / os basal/ epithelium et mésenchyme) et du ligament dento-alvéolaire. Nos données préliminaires confirment l'idée selon laquelle ces trois PMD pourraient fonctionner comme des peptides de type « facteur de croissance » solubilisés dans le micro-environnement. Au niveau des mâchoires, nos données préliminaires suggèrent que ces protéines seraient fortement impliquées dans la physiologie osseuse par des voies autocrine / paracrine, en particulier au cours du développement des mâchoires et de leur remodelage.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier la variation d'expression de ces trois PMD dans l'hémimandibule en fonction des contraintes mécaniques dentaires. Pour cela, nous allons fraiser (limer) les molaires des animaux. L'intervention de fraissage n'est pas douloureuse pour les souris car nous restons en surface des dents et nous ne touchons pas à la pulpe qui est innervée. Cependant, l'anesthésie des souris est requise pour éviter qu'elles ne se fassent mal en bougeant et pour permettre à l'expérimentateur de travailler dans de bonnes conditions de sécurité. En limant les molaires, il n'y aura plus de contact entre le maxillaire et la mandibule (partie basse des mâchoires). Ce contact ne se faisant plus, les os du côté droit des mâchoires (alvéolaire et basal) seront donc soumis à de nouvelles contraintes mécaniques et à un remodelage différent comparé au côté gauche. Par comparaison du côté gauche et droit, nous pourrions donc savoir si ces contraintes mécaniques jouent un rôle dans l'expression différentielle de ces PMD au cours du remodelage osseux.

Dans notre approche, nous avons tout fait pour mettre en application la règle des 3R. En effet, dans l'état actuel des connaissances, les réponses à nos questions ne peuvent être résolues par d'autres approches que celle impliquant des animaux. En effet, il n'existe aucun autre modèle (cellulaire, bioinformatique...) pour pouvoir réaliser nos expérimentations et les études biomécaniques *in vivo* sont difficilement substituables. Le modèle animal ne peut donc pas être remplacé. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous allons pour ce projet, après anesthésie, fraiser (limer) uniquement les molaires en haut à droite (maxillaire droit) des souris afin que le côté controlatéral soit utilisé comme témoin. Ceci nous permettra de réduire le nombre d'animaux en ayant l'échantillon témoin et fraisé au sein du même animal. De plus, pour ce projet, nous allons mener 3 types d'expérimentations : des expérimentations histologiques (tissulaires), des expérimentations sur l'ARN et des analyses protéiques. Concernant la partie histologique, 3 animaux seront nécessaires par série. Concernant la partie ARN, il est nécessaire de travailler sur au minimum 200 ng d'ARN totaux. Nos expérimentations précédentes ont montré qu'il fallait pooler les différentes parties de 5 hémimandibules pour avoir assez d'ARN pour toutes les parties étudiées. La problématique étant la même pour la partie protéique, le nombre d'animaux nécessaire est également de 5 par série. Les ARN totaux pourront servir le cas échéant pour d'autres études. Pour avoir des résultats exploitables, significatifs et statistiquement fiables, il est indispensable de répéter au moins 3 fois les études *in vivo*. En conséquence, le nombre d'animaux maximum que nous aurons à utiliser est de 39. Enfin, concernant les conditions de raffinement, les souris seront acclimatées durant 1 semaine avant le début des expérimentations. Après le fraissage, les souris seront observées et pesées tous les jours. En cas de signe de douleurs, de l'acide acétyl salicylique, à une quantité de 120mg/kg, sera administré dans l'eau de boisson. Si les souris montrent des signes de douleurs (absence de toilettage, prostration, diminution de la quantité de nourriture...) ou alors atteignent des points limites (perte de poids supérieur à 20%, diminution de la température corporelle de 6°C...), alors elles seront euthanasiées.

4450. Ce projet a pour objectif de déterminer la tolérance, la biodisponibilité et le profil pharmacocinétique d'un produit vétérinaire chez le chien.

Pour le développement de ce produit, les différentes voies d'administrations candidates doivent être comparées entre elles afin de déterminer celle qui est la plus adaptée pour le traitement de l'animal.

12 chiens seront traités à la posologie recommandée par le fabricant par voie intraveineuse. Après une période de repos de 3 semaines, ces animaux seront traités pour moitié par voie orale et pour l'autre moitié par voie topique. La voie intraveineuse servira de référence en termes de biodisponibilité du produit pour les voies orale et topique.

La pharmacocinétique reposera sur des prélèvements sanguins, et/ou sur des prélèvements cutanés (skin stripping) permettant une analyse de la biodisponibilité du traitement.

Une pré-étude sur 4 chiens sera réalisée afin de valider et d'affiner les stratégies pour les voies d'administrations et les méthodes de prélèvement qui seront appliquées dans l'étude pharmacocinétique suivante.

Le nombre d'animaux requis pour ce projet est de 16 chiens.

L'utilisation de chiens sur ce projet est justifiée par le fait qu'ils représentent l'espèce cible du produit et qu'il n'existe pas de méthode de remplacement pour ce type de test.

4451. Incontinentia pigmenti (IP) est une maladie génétique rare. Elle est létale très tôt au cours du développement embryonnaire chez les garçons. Elle se caractérise chez les filles par une inflammation cutanée sévère qui survient à la naissance et, pour une fraction d'entre elles, des anomalies oculaires, dentaires et cérébrales. Les causes des problèmes cérébraux, qui peuvent conduire à une paralysie et à un déficit intellectuel, restent très mal comprises, bien que le gène impliqué dans la maladie ait été identifié. Il code la protéine NEMO, qui joue un rôle essentiel dans une voie de signalisation agissant dans une multitude de situations physiologiques (immunité, croissance cellulaire, protection contre la mort cellulaire etc...).

Le but de ce projet est de mieux comprendre l'origine des anomalies cérébrales en détectant les éventuelles anomalies structurales et/ou vasculaires dans le cerveau des souris femelles mutées sur le gène Nemo, qui représentent un modèle de la maladie IP. Ce modèle rongeur transgénique mime pathologiquement et génétiquement la situation humaine, à la fois concernant la dermatose et la transmission du défaut génétique. L'analyse cérébrale sera réalisée en utilisant la technique d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et la technique iDISCO qui analyse intégralement les cellules et les protéines d'un cerveau par détection

immuno-microscopique. A ce jour, aucun modèle cellulaire ou informatique ne peut fournir des informations permettant de comprendre les mécanismes de la pathologie de l'IP. Le recours à des investigations in vivo est donc nécessaire.

C'est pourquoi, 120 animaux seront étudiés dans ce projet, tous nés et élevés dans des élevages agréés à des fins scientifiques. Ce nombre a été défini comme un minimum nécessaire pour l'analyse statistique des données.

Les animaux sont observés quotidiennement par une équipe de zootechniciens en charge de leurs soins et de manière plus accrue lorsque la pathologie cutanée commence à se développer. Des critères d'arrêt très précis ont été déterminés pour intervenir en cas de signe de souffrance.

Leur hébergement en groupe sociaux dans des cages enrichies d'objets en accord avec la réglementation sont mis en place pour améliorer leur bien-être.

4452. La maladie de Dent est une pathologie rénale héréditaire caractérisée par une protéinurie et une hypercalciurie. Son évolution implique fréquemment l'apparition d'une néphrocalcinose et d'une néphrolithiase, pour aboutir généralement à l'insuffisance rénale. A l'heure actuelle, il n'existe aucune approche thérapeutique et les traitements proposés sont seulement symptomatiques. A l'origine de la maladie de Dent se trouvent des mutations génétiques affectant le gène permettant la création d'une protéine appelée CIC-5. Cette protéine CIC-5 est majoritairement présente dans une partie du rein appelée le tubule proximal, dont le dysfonctionnement explique une grande partie du tableau clinique observé chez les patients.

Toutefois l'évolution de la maladie de Dent reste incomprise. Elle pourrait impliquer une forme de stress métabolique des cellules du tubule proximal de type « stress oxydatif » ou encore « stress du réticulum endoplasmique ». Ce stress serait lié à l'accumulation dans les cellules des patients de la protéine CIC-5 sous sa forme mutée et non-fonctionnelle. Notre projet est donc focalisé sur l'étude de l'état de stress des cellules du tubule proximal de souris exprimant un type de mutation courant de CIC-5.

Pour cela, via le croisement d'animaux hétérozygotes obtenus par transgénèse, nous établirons deux lignées de souris génétiquement modifiées : l'une d'elle portera une mutation N340K du gène CLCN5 codant pour CIC-5, l'autre portera une mutation Y272C du gène CLCN5. Les deux lignées seront ensuite utilisées à l'aide d'un élevage raisonné permettant d'établir la fonction rénale des souris puis d'analyser l'implication du stress oxydatif et du stress du Reticulum Endoplasmique dans leur phénotype rénal.

Le nombre de souris utilisées sera de 146. Ce nombre, qui prend en compte les exigences de remplacement et de réduction, est incompressible car seul un modèle de souris nous permettra de répondre à nos questions. Pour respecter le principe de la règle des « 3R », le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, nos conclusions et nos modèles animaux porteurs des deux mutations offriront la possibilité de développer des stratégies thérapeutiques pertinentes pour la maladie de Dent.

4453. L'ischémie-reperfusion rénale (définie par un arrêt puis une reprise de la circulation du sang dans les reins) est rencontrée dans diverses situations en pathologie humaine, comme les états de choc hémodynamique (chute prolongée de la tension artérielle), et au cours de la conservation des greffons destinés à la transplantation rénale (entre le moment du prélèvement du greffon chez le donneur et sa transplantation chez le receveur). Des données expérimentales chez l'animal et des données cliniques chez l'homme suggèrent un effet bénéfique des bloqueurs du récepteur minéralocorticoïde (RM) au cours de l'ischémie reperfusion dans plusieurs organes, notamment le rein. Le mécanisme de cet effet demeure inconnu. Notre hypothèse est que les récepteurs endothélial et musculaire lisse des minéralocorticoïdes sont impliqués dans les effets délétères de l'ischémie-reperfusion sur le rein, ce qui expliquerait les effets bénéfiques de leur blocage par une substance antagoniste. Nous utiliserons un antagoniste du RM non-stéroïdien obtenu dans le cadre d'une collaboration industrielle avec le laboratoire pharmaceutique (AZ) en comparaison avec un antagoniste de référence la Spironolactone..

Afin d'étayer cette hypothèse, nous souhaitons étudier les effets de l'ischémie-reperfusion rénale chez des souris transgéniques invalidées pour le récepteur minéralocorticoïde dans le muscle lisse, les macrophages et/ou l'endothélium vasculaire. Nous espérons que les résultats de ces travaux seront le préalable à des études cliniques au cours desquelles les antagonistes du RM seront utilisés, notamment en transplantation rénale.

D'après notre expérience dans des modèles animaux proches et en se basant sur la littérature, nous aurons besoin d'un groupe de 10 rats minimum par expérience et d'un groupe de 20 souris minimum pour limiter la dispersion biologique des paramètres étudiés (ceux que nous suivons habituellement dans notre équipe) et aussi pour pouvoir apprécier les différents résultats (un total de 1040 animaux, rats et souris, sera nécessaire pour l'ensemble du projet qui va durer 5 ans).

Nos modèles de souris intéressent plusieurs équipes qui travaillent sur d'autres sujets de recherche et sur d'autres organes différents. Les protocoles thérapeutiques, les points limites et les critères d'interruption de l'expérimentation sont définis afin d'assurer le bien-être des animaux au cours de cette étude.

4454. Nous déterminerons le rôle de métabolites issus de la flore microbienne intestinale sur la régulation de l'équilibre glycémique et du poids corporel. Des métabolites dérivés de la flore intestinale ont été associés au diabète et à l'obésité chez l'Homme et dans des modèles expérimentaux chez le rat et la souris par analyse de données de métabolomiques. Nous testerons l'impact d'une supplémentation chronique de ces métabolites issus de la flore microbienne intestinale sur la régulation de l'homéostasie glucidique chez la souris ou le rat. La supplémentation s'effectuera in vivo par implantation sous cutanée d'une

pompe osmotique, qui permet de libérer une solution contenant un métabolite d'intérêt de manière chronique (6 semaines). Concernant la règle des 3R, le projet a été initialement entrepris in vitro sur des lignées cellulaires. Toutefois le métabolisme glucidique est régulé de façon physiologique par un ensemble de tissus producteurs et cibles de l'insuline, qui rend indispensable des explorations in vivo chez l'animal entier. La réduction est prise en compte, n=8 est le n minimum pour avoir des résultats fiables et fins pour le dosage de sécrétion d'insuline effectué par ELISA. Nous passerons le plus de métabolites en parallèle pour réduire le nombre d'animaux des groupes contrôles. En ce qui concerne le raffinement, l'utilisation de pompes osmotiques remplace les injections i.p. ou sous cutanées quotidiennes et réduit donc le stress que représente la contention nécessaire aux injections sur des périodes prolongées. Le volume libéré par les pompes est beaucoup plus faible que lors d'une injection, puisqu'il diffuse au cours de la journée, et la pompe contient un volume nécessaire pour un traitement chronique sur 6 semaines. Au moindre signe de souffrance, l'expérimentation sera arrêtée. Nous ne multiplierons pas les procédures sur ces animaux. Nous utiliserons 240 souris C57B16 et 64 rats GK et 64 rats WKY. Nous déterminerons le rôle de métabolites issus de la flore microbienne intestinale sur la régulation de l'équilibre glycémique et du poids corporel. Des métabolites dérivés de la flore intestinale ont été associés au diabète et à l'obésité chez l'Homme et dans des modèles expérimentaux chez le rat et la souris par analyse de données de métabolomiques. Nous testerons l'impact d'une supplémentation chronique de ces métabolites issus de la flore microbienne intestinale sur la régulation de l'homéostasie glucidique chez la souris ou le rat. La supplémentation s'effectuera in vivo par implantation sous cutanée d'une pompe osmotique, qui permet de libérer une solution contenant un métabolite d'intérêt de manière chronique (6 semaines). Concernant la règle des 3R, le projet a été initialement entrepris in vitro sur des lignées cellulaires. Toutefois le métabolisme glucidique est régulé de façon physiologique par un ensemble de tissus producteurs et cibles de l'insuline, qui rend indispensable des explorations in vivo chez l'animal entier. La réduction est prise en compte, n=8 est le n minimum pour avoir des résultats fiables et fins pour le dosage de sécrétion d'insuline effectué par ELISA. Nous passerons le plus de métabolites en parallèle pour réduire le nombre d'animaux des groupes contrôles. En ce qui concerne le raffinement, l'utilisation de pompes osmotiques remplace les injections i.p. ou sous cutanées quotidiennes et réduit donc le stress que représente la contention nécessaire aux injections sur des périodes prolongées. Le volume libéré par les pompes est beaucoup plus faible que lors d'une injection, puisqu'il diffuse au cours de la journée, et la pompe contient un volume nécessaire pour un traitement chronique sur 6 semaines. Au moindre signe de souffrance, l'expérimentation sera arrêtée. Nous ne multiplierons pas les procédures sur ces animaux. Nous utiliserons 240 souris C57B16 et 64 rats GK et 64 rats WKY.

4455. Notre environnement s'enrichit en polluants dont les perturbateurs endocriniens (PE). Ceux-ci augmentent la prévalence et la gravité de pathologies connues (cancer, obésité et autres) et l'émergence de nouvelles pathologies telles que des pathologies dentaires. Leur diagnostic est établi après plusieurs années d'exposition. Il devient alors difficile d'identifier les agents causaux et des biomarqueurs précoces s'avèrent nécessaires. Du fait de ses propriétés uniques, l'émail pourrait être un candidat intéressant que nous proposons d'explorer ici.

Parmi les milliers de PE, le BPA et les phtalates (dont le DEHP) sont parmi les plus répandus. Ils affectent la prolifération cellulaire et le développement de la glande mammaire mais leurs mécanismes d'action ne sont pas encore élucidés.

Les objectifs de cette étude sont i) de tester l'hypothèse selon laquelle les individus présentant des défauts amélaire dus à l'exposition des PE sont plus susceptibles de développer un cancer, ii) de comparer l'activité promotrice de tumeurs des deux PE et iii) de caractériser les voies de signalisation impliquées. Dans l'état actuel des connaissances, ces questions ne peuvent être résolues par d'autres approches que celles impliquant des animaux rendant le remplacement impossible. En effet, le processus physiologique de développement de tumeurs (croissance des cellules en 3D, vascularisation) ne peut être reproduit in vitro. Or, nous avons besoin de ce modèle animal pour établir un lien entre des défauts de l'émail et le développement tumoral sous exposition aux PE. Néanmoins, ce travail mené en collaboration entre deux équipes de recherche permet de poser deux questions scientifiques simultanément et donc de réduire le nombre d'animaux d'autant. Par ailleurs, nous avons pris en compte le raffinement dans la mesure où notre protocole est parfaitement maîtrisé: les injections ainsi que la prise en charge du stress et de la douleur, et le suivi des animaux sont connus.

S'il existe un lien entre qualité de l'émail et susceptibilité aux cancers, les patients présentant des défauts amélaire devront être spécifiquement suivis. D'autre part, l'élucidation des voies de signalisation régulées par les PE aidera à comprendre comment ces agents promeuvent les cancers hormono-dépendants du sein et de la prostate. Ces résultats permettront donc d'adopter de nouvelles règles pour leur utilisation.

4456. Dans le contexte scientifique d'écologie urbaine, nos objectifs scientifiques sont d'étudier des tiques et maladies à tique chez les hérissons communs. A travers cette étude, nous souhaitons comprendre dans quelle mesure cette espèce, s'étant adaptée au milieu urbain, peut constituer des "chevaux de Troie" en milieu urbain pour des zoonoses autrefois inféodées aux milieux ruraux. L'objectif de notre projet est donc de montrer comment l'environnement urbain affecte les populations de hérissons communs (*Erinaceus europaeus*) et leurs tiques et maladies à tique (Maladie de Lyme, une zoonose transmissible à l'homme). Dans la pratique, nous échantillonnerons des hérissons en Ile-de-France le long d'un gradient d'urbanisation afin de corrélérer le taux d'urbanisation et les paramètres phénotypiques du hérisson avec les paramètres épidémiologiques (prévalence et intensité) des tiques (*Ixodes hexagonus* et *ricinus*) présentes sur les hérissons et des bactéries responsables de la maladie de Lyme chez l'homme (*Borrelia burgdorferi* S.L.) pendant 5 ans. Cet échantillonnage s'effectuera dans le milieu naturel, nous capturerons durant cette période environ 200 hérissons pour lesquels la prévalence et l'intensité de tiques sera relevée, une dizaine de tiques seront collectées pour savoir si elles sont porteuses de la maladie de Lyme; des mesures morphométriques effectuées (poids et taille); une prise de sang par hérisson sera également effectuée pour évaluer la séroprévalence à la maladie de Lyme. Afin d'atteindre nos

objectifs scientifiques qui se focalisent sur une population en conditions naturelles, il n'y a pas possibilité de remplacement et l'utilisation d'animaux en conditions naturelles est indispensable. Notre projet scientifique impliquant des animaux est pleinement justifié d'un point de vue scientifique car il constituera un apport conséquent et original de nos connaissances sur l'épidémie des zoonoses en zone urbaine. Les procédures expérimentales sont toutes légères et la manipulation ne dépassera pas 15 minutes.

4457. Le but de ce projet est d'évaluer l'effet d'une forme mutante de cofiline-1 sur la progression de la cardiomyopathie dans le cadre de la dystrophie musculaire liée à des mutations dans le gène codant les lamines nucléaires de type A.

L'espèce animale utilisée pour ce projet est la souris *Mus musculus*. En effet, afin d'étudier la physiopathologie de cette pathologie nous avons créé un modèle murin par transgénèse ciblée porteur d'une mutation décrite chez l'homme (Lmna p.H222P). Ce modèle murin récapitule à l'état homozygote les caractéristiques phénotypiques de cette pathologie : atteintes des muscles squelettiques et cardiaques. Les premiers symptômes sont détectés dès 3 mois chez les mâles homozygotes et évoluent rapidement jusqu'au décès des animaux provoqué principalement par l'aggravation du phénotype cardiaque. Par conséquent, ce modèle constitue le modèle de référence pour tester l'administration d'une forme mutante de cofiline-1 afin de déterminer ses effets thérapeutiques sur la progression du phénotype cardiaque et musculaire dans le contexte de cette pathologie. Le projet sera arrêté à un âge de 4 mois pour les souris, avant l'aggravation et le décès des animaux.

Ce projet, qui nécessite un nombre total de 18 animaux, respecte pleinement les règles de réduction, de remplacement et de raffinement. En effet, le plan expérimental est déterminé à l'aide du module IPSUR du logiciel R. Ce modèle permet de déterminer le nombre minimum d'animaux à inclure dans l'expérimentation, tout en ayant suffisamment de données expérimentales pour appliquer les tests statistiques nécessaires à l'analyse des données. Les animaux injectés feront l'objet d'une surveillance quotidienne après l'injection du vecteur jusqu'à leur euthanasie (suivi de poids, évaluation du bien-être général, vérification de l'absence de nécroses ou escarres) et toutes les précautions seront prises pour optimiser leurs conditions de vie (nourriture disposée dans la cage si besoin, environnement enrichi avec de la « wood wool » ou coton compacté en formats prédécoupés de dimensions 50 x 50 mm pour la nidification des souris, des igloos (maisonnettes) en polypropylène sont disposés dans les cages permettant les jeux et le repos des souris, etc.).

4458. Ce projet vise à étudier la maladie de Parkinson qui est une maladie neurodégénérative c'est-à-dire dans laquelle les neurones à dopamine dégèrent et meurent. Elle touche 1 % des Français de plus de 65 ans et se place ainsi au deuxième rang des maladies neurodégénératives en France, juste après la maladie d'Alzheimer. Le seul traitement efficace actuellement est l'apport quotidien de LDOPA précurseur de la dopamine. Par contre, la cause de la destruction de ces neurones n'est toujours pas connue. Ce projet vise à étudier une hypothèse qui pourrait en expliquer la cause. En effet, on sait que la mort des neurones s'accompagne de l'accumulation de protéines toxiques appelées « corps de Levy » qui envahissent peu à peu tout le cerveau. Ces protéines toxiques semblent capables de se propager d'un tissu malade à un tissu sain, et même d'un individu à un autre. Nous souhaitons étudier chez la souris cette capacité de propagation des corps de Levy. Ce projet requiert la mise en place de parabioses entre des souris dites donneuses qui auront reçues au préalable des corps de Levy et des souris receveuses (ou hôtes) dans lesquelles on cherchera la présence de corps de Levy. Les cerveaux de tous les animaux, traités et témoins seront examinés au bout de 4 mois, durée tolérée par les animaux mais suffisamment longue pour permettre de valider notre hypothèse. Ce protocole s'avère nécessaire pour vérifier la capacité de propagation de la synucléine, lui conférant des propriétés de type prions. Ce programme de recherche est développé dans le respect de la règle des 3R. Il sera tiré profit de chaque animal pour nous apporter le maximum d'information. Les groupes d'études sont accompagnés de leurs groupes contrôles. L'utilisation de système in vitro pour remplacer les animaux n'est malheureusement pas applicable pour répondre à notre question mais l'utilisation des parabioses sera restreinte au maximum pour répondre à une question scientifique précise. Et toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale et une prise en charge de la douleur adaptée est mise en place pour maîtriser la souffrance animale ainsi que les variations individuelles qui pourraient en découler. Une attention particulière sera apportée au suivi des animaux. Des aménagements de l'hébergement seront mis en place pour faciliter leur récupération. Dans la perspective du R de réduire, une étude statistique montre qu'il faut au maximum 92 souris adultes pour obtenir des résultats solides.

4459. L'activité du cerveau est gouvernée par un équilibre entre signaux excitateurs et inhibiteurs. Ces derniers sont majoritairement portés par des flux de chlore à travers les récepteurs GABAA. Par conséquent des modifications de la concentration de chlore dans les neurones est un facteur déterminant de l'efficacité des signaux inhibiteurs, et donc de la fonction de réseaux corticaux. Cette concentration est contrôlée notamment par l'activité d'un cotransporteur chlore/potassium : KCC2. L'expression de ce transporteur est à la fois régulée par l'activité neuronale mais également altérée dans de très nombreuses affections neurologiques et psychiatriques telles que l'épilepsie, l'ischémie cérébrale, des traumatismes cérébraux mais aussi la schizophrénie voire l'autisme. Dans ces pathologies, des stratégies thérapeutiques visant à rétablir le transport de chlore sont donc envisagées.

Cependant, plusieurs études récentes ont mis en évidence d'autres fonctions du transporteur KCC2, indépendantes du transport d'ions, et impliquées notamment dans le contrôle des synapses non pas inhibitrices mais excitatrices. Les travaux antérieurs de l'équipe démontrent ainsi qu'une suppression chronique de KCC2 dans des neurones corticaux perturbe une fonction des synapses excitatrices (LTP) à l'origine des processus de mémoire et d'apprentissage dans le cerveau. Ces observations nous amènent donc à devoir ré-examiner l'impact d'une suppression du transporteur KCC2 dans les pathologies du système nerveux central afin de prendre en compte non seulement ses effets sur les signaux inhibiteurs mais également ces altérations des signaux excitateurs.

Dans ce projet, nous évaluerons les conséquences d'une suppression de KCC2 dans le cortex hippocampique. En particulier, nous testerons l'hypothèse selon laquelle l'extinction de KCC2 pourrait induire une altération des performances de mémoire et d'apprentissage ? Par ailleurs, une suppression de KCC2 associée au syndrome de Rett - une affection neurologique complexe incluant troubles moteurs, troubles du spectre autistique et épilepsie. Nous étudierons si la perte d'expression de KCC2 pourrait être à l'origine des altérations cognitives associées à cette pathologie. Si oui, nous testerons si celles-ci peuvent être compensées en manipulant l'expression ou la fonction du transporteur KCC2.

Pour cela, nous aurons recours à une manipulation de l'expression du transporteur KCC2 in vivo chez la souris. Nous comparerons les effets induits par ces manipulations sur la fonction des synapses excitatrices (expériences ex vivo sur tranches de cortex hippocampique) et sur les performances cognitives (mémoire et apprentissage), chez des souris contrôles ou dans un modèle murin de syndrome de Rett.

Ces expériences nous permettront donc de préciser les conséquences cognitives de la suppression de KCC2 associée à plusieurs conditions pathologiques, mais également de définir les stratégies thérapeutiques les plus pertinentes pour compenser ces déficits. Cette étude nécessitera l'utilisation d'un total de 412 souris sur une période de 4 ans (voir détail des expérimentations en annexe). Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, le design des expériences comportementales et des expériences de physiologie a été calculé au plus juste, en tenant compte de la puissance des analyses statistiques. Dans la mesure du possible, le remplacement des animaux par des méthodes alternatives (méthodes in vitro ...) est préféré. Toutefois, vue la nature de nos recherches, l'utilisation de rongeurs reste nécessaire. Enfin, le raffinement des méthodes expérimentales visant à réduire à son maximum la souffrance animale est mise en œuvre grâce à l'utilisation d'anesthésiques et d'antalgiques appropriés lors de chirurgies, à la mise en place de soins post-opératoires et de points limites clairement établis. L'ensemble des expériences sont menées par des personnels hautement qualifiés dans des locaux d'hébergement respectant les standards en vigueur.

4460. L'efficacité de la majorité des traitements anti-tumoraux réside dans l'élimination de la totalité des cellules tumorales par des effets cytotoxiques directs. Cependant, les thérapies conventionnelles ne remplissent pas toujours cet objectif et sont associées à une lourde morbidité. Récemment a été démontrée que la mort cellulaire induite par certains médicaments anti-tumoraux conventionnels (anthracyclines) pouvait générer une réponse immunitaire anti-tumorale participant de façon synergique à l'efficacité thérapeutique. L'utilisation de méthodes de génotypage à haut débit nous a permis d'identifier un polymorphisme du gène, FPR1 (Formyl Peptide Receptor 1), impliqués dans l'efficacité de la chimiothérapie. La présence de ce polymorphisme a été corrélée à une plus faible survie chez des patients atteints de cancer du sein recevant des anthracyclines. Le but de ce projet est de caractériser la fonction de ce polymorphisme in vivo. Ce projet complète le cadre expérimental des projets n.3941.01 (« Etude de la fonction du gène FPR1 dans l'efficacité de la chimiothérapie ») et n.#3794 (« Rôle du gène FPR1 dans la mort cellulaire immunogène »). Cette question ne peut être abordée qu'in vivo car il n'est pas possible d'étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale dans des systèmes in vitro. Nous souhaiterons effectuer cette étude en utilisant des souris C57Bl/6 (n. 195) et aussi des souris transgéniques C57Bl/6 Fpr1-/- (n.105), accessible dans le commerce et qui présentent un phénotype complètement normal. Ce projet se dessine sur 5 ans et implique des expériences de croissance tumorale. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Ce projet vise à une meilleure compréhension de la fonction de FPR1, un facteur pronostique négatif pour la réponse aux traitements anti-carcéaux à base d'anthracyclines, afin d'orienter la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques chez les patients atteints de cancer du sein.

4461. Le retard de croissance intra-utérin est une pathologie fréquente de la grossesse due à une diminution chronique de la perfusion placentaire. Cette pathologie est un enjeu de santé publique puisqu'elle est responsable d'une morbi-mortalité périnatale importante et d'une morbidité à long terme non négligeable. Les méthodes de dépistages sont actuellement limitées à l'échographie 2D qui offre des résultats encore insuffisants pour une prise en charge optimale de cette pathologie. Il est nécessaire d'essayer de développer d'autres techniques de dépistage afin d'améliorer la prise en charge de cette pathologie en réduisant la morbi-mortalité périnatale qui y est fréquemment associée. Deux pistes pour l'amélioration du dépistage sont à l'étude : l'échographie doppler 3D et surtout l'IRM placentaire, dont les résultats préliminaires sont très prometteurs.

Notre objectif est d'évaluer l'apport potentiel de différentes techniques d'imagerie, dont l'IRM, dans la détection de l'hypoperfusion placentaire et dans le dépistage voire le diagnostic du retard de croissance intra-utérin. L'hypoperfusion placentaire est la réduction mécanique de la vascularisation du placenta, mécanisme responsable du retard de croissance intra-utérin.

L'utilisation de modèles animaux d'hypoperfusion utéroplacentaire est indispensable au développement et à la mise au point de techniques d'imagerie utiles au dépistage précoce des pathologies placentaires. En effet, les techniques d'imagerie ne peuvent se développer qu'en comparant la vascularisation des situations normales et pathologiques. Chez l'humain, provoquer une

hypoperfusion placentaire à des fins de recherche n'est pas envisageable en raison des conséquences fœtales importantes qui résultent de ces hypoperfusions, pouvant conduire parfois à la mort fœtale in utero.

Nous avons donc choisi le modèle lapin.

Nous souhaitons évaluer les techniques d'imagerie fonctionnelle suivantes : IRM, échographie doppler 3D et échographie 3D contraste, sachant que l'IRM est la technique la plus prometteuse. Pour cela, 30 lapines en fin de gestation permettront de développer la technique IRM et échographique. Lors de la conception du protocole expérimental, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Ce nombre de lapines est ainsi le nombre minimal permettant d'envisager la réussite de notre expérience et l'application des données à l'homme.

L'intervention chirurgicale consistera, sous anesthésie générale, à réaliser une ligature des vaisseaux d'une corne utérine, après ouverture de la cavité abdominale. Une fois cette ligature réalisée, la cavité abdominale sera refermée et la peau suturée avant de débiter immédiatement les acquisitions en imagerie.

Nos animaux bénéficieront d'une anesthésie générale associée à une puissante analgésie réduisant l'inconfort lié au geste chirurgical et réduisant le stress subi au cours des manipulations. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Il n'y aura pas de nécessité de suivi post opératoire puisque les animaux seront mis à mort au cours de l'anesthésie générale liée à l'intervention. Si toutefois, l'animal présente un signe de stress ou de douleur au cours de la procédure, l'anesthésie sera renforcée et un analgésique puissant sera administré. Si toutefois, cela ne suffisait pas, l'animal sera mis à mort. Le bien être des lapines sera surveillé quotidiennement pendant toute la durée de la gestation. Le milieu de vie des lapines sera enrichi par du fourrage, des blocs de foin, des bâtonnets à mâcher et des balles en plastique. Un suivi quotidien des lapines sera assuré par un expérimentateur afin de contrôler leur bien-être.

4462. La maladie de Huntington est une maladie génétique neurodégénérative qui touche environ 6000 personnes en France. Il n'existe, à ce jour, aucun traitement pour prévenir ou retarder la progression de la maladie. Les patients meurent 15 à 20 ans après l'apparition des premiers symptômes. Le gène responsable de la maladie de Huntington code une protéine appelée "huntingtine". La huntingtine est exprimée partout, dans toutes les cellules à partir du stade embryonnaire et jusqu'à l'âge adulte. Pour mieux comprendre l'apparition de la maladie de Huntington et faire progresser les outils thérapeutiques, il est indispensable de mieux connaître le rôle de la protéine huntingtine dans un contexte normal et pathologique. Pour cela, nous souhaitons développer des modèles intégrés d'animaux proches de l'homme. La souris est un modèle de choix pour des études in vivo, compte tenu de la similarité de son organisation neuro-anatomique avec celle de l'Homme.

Les modèles souris disponibles grâce à la transgénèse classique dans la communauté scientifique permettent de comprendre le rôle spatial et temporel de la Huntingtine et de ses interacteurs au niveau d'un organisme entier.

Nous souhaitons importer des lignées de souris pour l'intérêt biologique potentiel qu'elles apportent dans le contexte du développement du cerveau et des circuits neuronaux, hors et dans le contexte des maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington. Afin de garantir le statut sanitaire de nos animaleries, nous devons les décontaminer par le biais d'un transfert d'embryons. Le phénotype des lignées importées et décontaminées n'est pas dommageable aux stades où nous les utilisons pour la décontamination. Si un phénotype dommageable devait apparaître, le maintien de la lignée fera l'objet d'une autre demande d'autorisation de projet.

Remplacement : le modèle souris est exporté et décontaminé seulement si le modèle présente un intérêt biologique potentiel (pré-requis de la validation des modèles in vitro et de modèles chez la Drosophile avant de passer à un organisme plus complexe comme la souris). Il n'existe pas à ce jour de remplacement du modèle souris.

Réduction : la décontamination par transfert d'embryons est réalisée par les services d'une plate-forme dédiée. Le nombre de souris mises en accouplement a été optimisé grâce à l'expertise du personnel et à la mutualisation des animaux entre les équipes.

Raffinement : toutes les mesures sont prises pour éviter le stress et la douleur au cours des procédures chirurgicales, avec un recours à l'analgésie et l'utilisation de points limites adaptés.

Le nombre d'animaux prévu par décontamination de lignée est de 57 par lignée pour une durée totale de 5 ans. Nous souhaitons décontaminer 30 lignées de souris, soit un total de 1710 animaux.

En fonction des avancées technologiques, nous serons amenés à faire décontaminer de nouvelles lignées, ce qui fera l'objet d'un avenant à la présente demande d'autorisation de projet.

4463. Bien que les neurosciences aient permis de fortes avancées dans l'identification du cerveau social, il reste de nombreuses questions quant à la nature des mécanismes neuronaux qui sous-tendent les interactions sociales. Comment le cerveau interprète-il les émotions liées aux visages ? Quelles sont les substrats neuronaux impliqués dans les comportements pro-sociaux tels que l'empathie (la capacité à ressentir les émotions d'autrui) ? Cependant ces capacités à produire des comportements sociaux adaptés sont fragiles comme en témoignent différentes pathologies neuropsychiatriques tels que les troubles du spectre autistique, les phobies sociales, la dépression ou diverses formes de sociopathies. Ainsi, identifier et caractériser les structures cérébrales et les circuits neuro-hormonaux impliqués dans les comportements sociaux représente un enjeu majeur pour les neurosciences, tant au plan fondamental que clinique.

Afin d'apporter des connaissances supplémentaires dans ce domaine, nous nous intéressons à deux types d'expériences. La première expérience consiste à caractériser les substrats neuronaux des informations à caractère social, telles que le visage d'un congénère, les expressions faciales et les vocalisations. La seconde expérience a pour but de déterminer des réseaux cérébraux impliqués dans les décisions sociales telles que la coopération par exemple. Nous nous intéressons tout particulièrement au cortex

orbito-frontal et aux régions limbiques associées, insula et amygdale, des structures qui, lorsque lésées entraînent des perturbations majeures de la régulation des émotions et de la réponse aux stimuli sociaux.

Notre objectif, à terme, est de parvenir à une formalisation des mécanismes cérébraux qui sous-tendent les compétences sociales normales et leurs altérations. Ces études auront des retombées cliniques majeures puisqu'elles permettront des applications cliniques pour des pathologies telles que l'autisme et la dépression.

Pour réaliser ces expériences, nous faisons appel à un modèle animal pertinent pour l'étude des interactions sociales humaines, le singe macaque. En effet, cette espèce possède un répertoire comportemental sophistiqué et un cerveau dont l'organisation anatomo-fonctionnelle est très proche de celle de l'homme. Nous utilisons des techniques qui permettent d'étudier directement l'activité cérébrale. Ces techniques ne peuvent pas être utilisées chez l'homme car elles sont trop invasives. La biologie cellulaire, les réseaux de neurone ou les hormones régulant ces interactions ne sont pas encore suffisamment modélisés pour que l'on puisse se passer de l'expérimentation animale. Ainsi, l'utilisation du singe est nécessaire afin de répondre à nos questions scientifiques dont les retombées cliniques ne sont pas négligeables.

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux, nous allons utiliser un nombre d'animaux qui correspond à un minimum statistique pour obtenir des données exploitables et satisfaire à un critère de reproductibilité. Nous avons choisi de réaliser 2 groupes de 4 animaux. Un groupe de 4 animaux sera utilisé pour la première expérience (concernant la caractérisation des activités neuronales liés aux visages) et un groupe de 4 animaux pour la seconde expérience (sur la caractérisation des réseaux neuronaux liés aux décisions sociales).

La philosophie de notre laboratoire est de pratiquer un raffinement continu des pratiques d'expérimentation. Ainsi, les animaux sont logés dans de grandes volières, en groupes sociaux, avec du matériel de fourrage et de multiples formes d'enrichissement.

4464. Le projet de l'équipe est de comprendre les mécanismes physiopathologiques des déficiences intellectuelles associées à des changements du nombre de copie (par exemple : trisomie 21 ou syndrome de Down) ou autres syndromes (ex : Ring14) ainsi que des mutations sur des gènes associés à des déficiences intellectuelles. Ces maladies rares induisent des pertes d'autonomie importante avec des conséquences pour les familles et la société.

La trisomie 21 (T21), aussi appelé Syndrome de Down (DS), est due à la présence d'un chromosome 21 surnuméraire. Elle touche 1 nouveau-né pour 600-800 naissances et représente environ un tiers des déficiences intellectuelles chez les enfants d'âge scolaire. C'est la forme la plus fréquente de retard mental, qui est également associée à un large panel de dysmorphologies. Pour l'étude de ce syndrome nous avons choisi le modèle murin parce que la souris partage beaucoup de systèmes physiologiques avec l'homme.

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

De plus, du fait de la nature des tests, on ne peut remplacer le modèle animal par d'autre modèle (in-vitro par exemple).

Au niveau génomique, les gènes portés par le bras long du chromosome 21, se trouvent sur 3 régions de syntenie réparties sur 3 chromosomes différents chez la souris. On retrouve la plus large région sur le chromosome murin 16, puis une petite région sur le 17 puis finalement une région sur le chromosome 10. Nous allons générer/étudier in vivo 4 modèles murins porteurs de différentes trisomies partielles tout au long du chromosome 16.

Tous ces modèles sont analysés de manière systématique du point de vue morphologique, cognitif et physiologiques. Nous cherchons ici à mettre en évidence des différences notables par rapport à des souris dites sauvages (ne présentant pas de mutation ni d'altération). Ces différences notables autrement appelées phénotypes seront alors analysées afin de constater si l'on retrouve des caractéristiques présents dans les pathologies humaines.

Les objectifs sont de:

- 1) Trouver les gènes associés aux différentes pathologies
- 2) Comprendre les origines physiologiques et développementales des pathologies.
- 3) Identifier les voies moléculaires perturbées
- 4) Utiliser ces modèles pour tester des traitements afin d'améliorer les capacités cognitives des patients.

Raffinement:

Les tests utilisés sont également choisis en fonction des phénotypes décrits dans la pathologie humaine associée au modèle et de telle sorte à être le moins invasifs possibles afin de respecter le bien-être animal.

En effet, chaque modèle de souris passe dans une série des tests comportementaux dont le "champ ouvert" qui est un test d'exploration d'arène, la "reconnaissance du nouvel objet" qui est un test d'exploration d'objet, l'"activité circadienne" qui est un test visant à observer le comportement de l'animal durant un cycle jour/nuit complet, la "piscine de Morris" qui est un test utilisé pour l'étude de l'apprentissage spatial et de la mémoire, et le test de "peur conditionnée" visant à évaluer la mémoire émotionnelle associée à un contexte environnemental. Ces tests sont non-invasifs et engendrent un stress modéré (piscine de Morris, conditionnement à la peur), léger (activité circadienne) voir aucun (champ ouvert, reconnaissance du nouvel objet).

De plus, les souris bénéficieront d'un suivi quotidien et si un animal présente des signes de douleurs ou de mal-être, il sera écarté des tests et sera traité de manière à soulager, guérir son état.

Réduction: Afin de minimiser le nombre de souris utilisées chaque cohorte réalisera entre 5 et 10 tests pendant une période allant de 5 à 10 semaines. En général, 2 cohortes 30 souris mâles (15 transgéniques et 15 contrôles) sont requises par modèle pour une analyse comportementale complète et une troisième cohorte femelle est requise afin de répéter les tests dans lesquels un phénotype a été vu afin de valider ce phénotype.

La totalité de ces expériences nécessiteront donc l'utilisation de 450 animaux (5 lignées x 90 souris par lignées).

La statistique utilisée sera un test ANOVA avec Tukey test en post hoc. Notre expérience nous permet d'évaluer à 15 animaux par groupe pour avoir un résultat significatif (30 animaux au total par expérience).

4465. La peste, maladie gravissime très contagieuse qui est causée par la bactérie *Yersinia pestis*, est habituellement transmise par la puce. Les mécanismes permettant à la bactérie d'établir une infection transmissible chez la puce sont mal connus. C'est pourquoi, nous souhaitons documenter ces mécanismes à l'aide de la puce du rat *Xenospylla cheopis*. Ce tel travail améliorera nos connaissances sur les mécanismes de transmission de la maladie ce qui, à terme, conduira à proposer de nouveaux moyens de lutte contre la peste.

Pour réaliser un tel projet (qui se déroulera sur 5 ans), il faut maintenir des colonies de puces saines ou infectées avec des mutants d'intérêt. La puce est un ectoparasite qui nécessite obligatoirement un repas sanguin pour survivre. L'espèce *X. cheopis* que nous utilisons doit prendre deux repas par semaine pour survivre. C'est pourquoi, les puces seront nourries sur des souriceaux âgés de 2 à 5 jours. Au maximum, 6716 animaux seront utilisés sur une période de 5 ans.

Exigence vis-à-vis du remplacement. Aucun système in vitro ne mime la puce. Il est possible de nourrir des puces à l'aide d'un système artificiel. Ce dernier requiert une peau de souris adulte recouvert par 5 ml de sang hépariné fraîchement collecté. Ce système artificiel est utilisé pour infecter ponctuellement des puces, mais il ne permet pas de nourrir l'ensemble des colonies de puces nécessaires au projet. L'utilisation de souriceaux présente l'avantage de nécessiter un nombre plus restreint d'animaux par rapport au nourrissage artificiel (1 souriceau contre 5 souris adultes). De plus, elle réduit la manipulation des insectes et donc, le risque de fuite d'insectes infectés ou non.

Exigence vis-à-vis de la réduction. Pour maintenir les colonies de puces infectées ou saines, il faut les nourrir au moins deux fois par semaine. Le nourrissage de puces saines se faisant toute l'année, il faut au minimum 104 souriceaux par colonie saine par an. Le nombre de colonies saines requis pour le projet est réduit au maximum (15 en moyenne par an) afin d'assurer la mise en œuvre du projet. Contrairement au nourrissage de puces saines, celui des puces infectées doit se faire sur une période variant de 1 à 4 semaines en fonction de la question posée, et pour obtenir des résultats exploitables. De plus, les expériences doivent être également menées au minimum trois fois afin de ne pas compromettre la puissance des tests statistiques. C'est pourquoi, nous ne pouvons pas utiliser moins de 6 (2 nourrissages pendant 1 semaine x 3 expériences) et 24 animaux (8 nourrissages pendant 4 semaines x 3 expériences) par colonie de puces infectées. Enfin, il convient de mentionner que l'utilisation de souriceau permet de réduire le nombre d'animaux à utiliser par rapport à un système de nourrissage artificiel (1 souriceau contre 5 souris adultes).

Exigence vis-à-vis du raffinement. En pratique, pour maintenir les colonies saines, le souriceau âgé de 2 à 5 jours est placé dans une jarre contenant une colonie de puces saines. Cette approche induit une douleur sévère, mais très transitoire ; l'animal est exsangue en quelques minutes. Il n'est pas possible d'utiliser d'anesthésiques ou d'analgésiques car cela affecteraient les colonies puces et donc, empêcheraient la réalisation du projet. Dans le cas de maintien de colonies de puces infectées, un souriceau âgé de 2 à 5 jours est placé dans une capsule (sans contention) pendant une heure. L'animal reçoit quelques piqûres lors de cette manipulation, ce qui ne semble pas induire de douleur. Cependant, si l'animal présente une agitation anormale, une douleur et/ou crie, il sera récupéré et sacrifié immédiatement.

4466. Les muscles squelettiques assurent de nombreuses fonctions au sein de l'organisme. Aussi, leurs altérations peuvent avoir des répercussions sur la fonction motrice et la qualité de vie des patients. L'industrie du secteur agroalimentaire ou pharmacologique s'oriente vers le développement de produits qui visent à diminuer les états de fatigue ou de faiblesse musculaire. Notre équipe développe un ensemble d'approches expérimentales afin d'évaluer l'efficacité de nouveaux produits, alimentaire ou pharmacologique, pour le maintien ou l'amélioration de la fonction musculaire. Ainsi, nous envisageons de tester 15 produits en 5 ans.

Pour chaque composé testé, des souris âgées entre 4 semaines et 18 mois seront traitées pendant une durée définie en fonction du composé et de l'objectif visé. Le traitement s'effectuera par différentes voie en fonction du composé à tester. Le mode d'administration par voie orale via l'eau de boisson ou l'alimentation sera privilégié. Les traitements seront associés au non à un entraînement sur tapis roulant des animaux. Les animaux seront répartis en 6 groupes maximum, selon le nombre de molécules ou de doses à tester et les groupes référents nécessaires, avec un effectif de 15 animaux maximum par groupe.

Un ensemble de paramètres sera évalué pour l'étude des effets des composés sur le comportement général et la fonction motrice des animaux. Ainsi, le poids des animaux, leur consommation alimentaire et hydrique seront mesurés. La force d'agrippement (Grip test), les capacités de déplacements horizontaux et verticaux (Actimètre), la curiosité (Planche à trous), la coordination motrice (Rotarod), l'endurance et la résistance à l'effort (Wire test), l'anxiété et dépression (Croix surélevée, Préférence de place, et préférence du sucre), la fatigue musculaire lors de la mesure du temps de nage (Swimming test), les mémoires (test d'olfaction, test de reconnaissance d'objet, test du labyrinthe en T), ainsi que les caractéristiques de marche (analyseur de marche) seront analysées avant, au cours et/ou à la fin du traitement. Chaque test sera réalisé après une période de familiarisation des animaux avec les différents systèmes utilisés. Cette répétition de mesures non invasives permettra de suivre régulièrement 1) l'état des animaux 2) les effets des traitements sur les animaux. Cette approche in vivo sera complétée par des techniques in vitro d'analyse de la fonction musculaire afin d'identifier les cibles d'action des composés. En fin de traitement, les animaux seront ainsi euthanasiés, plusieurs muscles et organes seront prélevés et pesés, et les propriétés contractiles des muscles isolés (contraction in situ) ou de faisceaux cellulaires isolés des certains muscles (contraction in vitro) seront analysées.

Ces approches permettront de mettre en évidence au niveau préclinique les effets musculaires de composés à destination de l'industrie agro-alimentaire ou pharmaceutique. Les études conduites sur des animaux âgés nécessitent de tenir compte de leur taux de mortalité. Dans le cadre de la règle des 3R, le nombre d'animaux est réduit au maximum tout en tenant compte de la

validité statistique, des contraintes des modèles et des approches expérimentales. Les méthodes utilisées sont validées et majoritairement non invasives, des périodes d'acclimatation et d'habituation sont systématiquement effectuées. Lors de la réalisation des procédures expérimentales, un renforcement positif par récompense est mis en place pour limiter le stress des animaux. Au final, sur 5 ans pour 15 produits, 1 350 animaux seront utilisés pour mener à bien ce projet.

4467. Considéré comme la nouvelle pandémie de notre siècle, le diabète affecte 246 millions de personnes à travers le monde. Son étude et la mise en place de traitements adaptés constituent donc une priorité de santé publique. L'apparition de neuropathies chroniques est une complication fréquente chez les patients diabétiques, et se traduit par des symptômes douloureux aux extrémités (hyperalgésie, allodynie) souvent accompagnés de sensations anormales (paresthésies et dysesthésies). Ces neuropathies diabétiques, douloureuses et handicapantes, sont causées par l'hyperglycémie chronique entraînant la destruction de la gaine de myéline entourant les nerfs, fragilisant les nerfs et impactant la conduction de l'influx nerveux. Le seul traitement actuel de la neuropathie diabétique consiste en l'amélioration de l'équilibre glycémique et l'utilisation de molécules antalgiques à large spectre. C'est pourquoi il est important et nécessaire de tester de nouvelles thérapeutiques visant à soulager spécifiquement ces douleurs liées notamment à un ensemble d'affections du système nerveux périphérique.

Le projet, d'une durée de deux ans, vise à tester l'efficacité de l'étifoxine (EFX) pour traiter ces symptômes douloureux dans les neuropathies diabétiques. L'EFX est un anxiolytique prescrit pour lutter contre l'anxiété réactionnelle chez l'homme. Utilisé chez l'animal il a montré des propriétés bénéfiques dans la réduction durable de symptômes douloureux neuropathiques et inflammatoires. L'EFX possède également des propriétés neurorégénératives et neuroprotectrices.

Le premier modèle de neuropathie diabétique choisi pour cette étude est celui reposant sur l'injection de streptozocine (STZ), un analogue structural du glucose, qui induit un diabète de type 1 insulino-dépendant. C'est le modèle le plus utilisé à travers le monde pour reproduire les symptômes douloureux dans les neuropathies diabétiques. Cette partie de l'étude nécessitera au total 112 souris mâles adultes, soit 8 groupes de 14, recevant un traitement préventif (4 groupes : traitement EFX avant l'injection de STZ) ou curatif (4 groupes : traitement EFX 4 semaines après l'injection de STZ).

Le deuxième modèle consistera en des souris génétiquement modifiées (db/db^{-/-}), exprimant un diabète de type 2, non insulino-dépendant, contrairement au diabète de type 1 induit par la STZ. Il s'agit donc d'un modèle métabolique. Ici, seul l'effet curatif de l'étifoxine pourra être caractérisé, nécessitant 28 souris réparties en deux groupes. Cette deuxième partie ne sera abordée que si l'étude chez le modèle STZ démontre un bénéfice analgésique de l'étifoxine.

Un nombre de souris mâles égal à 140 est nécessaire pour réaliser l'étude. Le nombre d'animaux par lot a été estimé sur la base des analyses statistiques à réaliser et du seuil de significativité qu'elles requièrent. Des groupes de 14 animaux permettront d'objectiver des différences significatives supérieures à 20% lors de l'utilisation de tests non paramétriques.

Afin de tenir compte de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer), les animaux seront utilisés pour plusieurs tests comportementaux afin de réduire leur nombre au minimum. Les animaux sont hébergés en cage collective pendant toute la durée des expérimentations, dans le but de préserver les interactions sociales entre congénères. Les cages sont enrichies avec du matériel de nidation (frisure), avec eau et nourriture ad libitum. Les souris db/db^{-/-} seront hébergées dans des conditions en accord avec leur polydipsie et polyurie : litière très absorbante en rafle de maïs et biberons de grande taille. Le projet portant sur la mise en évidence des propriétés analgésiques d'une molécule, il est en revanche impossible à ce jour de se passer de sujets vivants dotés d'un cortex développé.

4468. Les acides gras présents dans les matières grasses alimentaires servent à satisfaire non seulement une partie de nos dépenses énergétiques mais également nos besoins en acides gras indispensables que sont les acides gras polyinsaturés (AGPI). Il existe deux familles d'acides gras polyinsaturés, respectivement nommés oméga 3 et oméga 6. Il est aujourd'hui bien admis que les AGPI présents dans notre alimentation, de par leur nature et leur abondance, influencent la santé de l'homme et jouent un rôle dans l'apparition d'un grand nombre de pathologies et notamment les maladies métaboliques comme l'obésité. Ainsi, une consommation excessive en oméga 6 aurait des effets plutôt pro-inflammatoires donc négatifs pour la santé comparée à celle d'oméga 3 qui aurait des effets plutôt anti-inflammatoires donc bénéfiques. De plus en plus d'études démontrent par ailleurs que le microbiote intestinal est lui aussi impliqué dans le développement de ces maladies métaboliques. Notre hypothèse est le microbiote intestinal contribue aux effets bénéfiques des oméga 3 sur la santé. Pour tester cette hypothèse nous allons utiliser des souris génétiquement modifiées (ogm) qui sont capables de transformer les omégas 6 en oméga 3, et qui ne développent pas d'obésité lorsqu'on leur administre un régime riche en lipides. Pour déterminer si leur microbiote contribue à cette moindre obésité, nous allons transférer le microbiote de ces souris ogm à des souris axéniques (ne possédant pas de microbiote) wt afin de déterminer si la capacité à résister au développement de l'obésité peut être transmise via le microbiote. 6 groupes de 12 souris axéniques wt seront nécessaires pour l'ensemble de l'expérimentation. 2 seront associées au microbiote d'une souris ogm ayant reçu un régime standard et recevront soit le régime standard, soit le régime riche en lipides ; 2 au microbiote d'une souris wt ayant reçu un régime standard et recevront soit le régime standard, soit le régime riche en lipides ; 1 au microbiote d'une souris ogm ayant reçu un régime obésogène et 1 au microbiote d'une souris wt ayant reçu un régime obésogène. Ces deux derniers groupes recevront le régime riche en lipides. Le seul traitement imposé aux souris est une alimentation spéciale riche en lipides (sauf pour les groupes contrôles). Elles seront pesées une fois par semaine. Durant l'expérimentation nous collecterons des fèces (défécation naturelle à la prise de la souris). Une semaine avant l'euthanasie nous ferons un test de perméabilité intestinale : pour cela nous administrerons un produit inerte par gavage et nous collecterons du sang par piqûre au niveau de la région submandibulaire quelques heures plus tard. Le dernier jour avant l'euthanasie nous ferons un test de tolérance au glucose (mesure de la glycémie sanguine). Compte tenu de la faible invasivité du protocole, aucune souffrance animale n'est attendue dans cette étude. Les

animaux seront toujours hébergés par 2 pour éviter l'isolement. Chaque cage sera enrichie par ajout de sopalain (pour faire un nid) et d'un bâton de bois à ronger. Les gavages (microbiote et produit pour mesurer la perméabilité) seront réalisés par une personne compétente réalisant ce geste depuis des années. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

4469. L'hémophilie est une maladie hémorragique héréditaire due à l'absence ou au déficit d'un facteur de la coagulation. L'hémophilie A, la forme la plus répandue qui frappe environ 80% des hémophiles, est causée par des mutations génétiques au niveau du Facteur VIII (FVIII) et concerne une naissance sur 5000. La personne hémophile ne parvient pas à former un caillot solide au cours du processus de la coagulation et souffre de saignements spontanés ou incontrôlables après un traumatisme. Les épisodes hémorragiques répétés endommagent durablement les articulations, les os et, sans traitement approprié, la destruction articulaire peut être irréversible. Les hémorragies internes, si elles ne sont pas prises en charge, peuvent être mortelles.

Aujourd'hui le traitement consiste à administrer par voie intraveineuse le facteur de la coagulation défailant plusieurs fois par semaine. Le principal risque est le développement d'anticorps inhibiteurs chez les patients traités, rendant ainsi inefficace ce traitement (30% des cas).

Au vu des succès obtenus dans le traitement de l'hémophilie B par thérapie génique, la correction/addition du gène du FVIII dans les cellules souches pourrait représenter une alternative thérapeutique à long terme pour les patients, étant donné qu'une légère hausse du taux de facteur (>1%) suffirait à réduire considérablement la fréquence des saignements et à prévenir l'arthropathie.

Plusieurs vecteurs lentiviraux ont été désignés et produits pour exprimer différents transgènes du FVIII dans des lignées cellulaires hématopoïétiques différenciées. Malgré le fait que des études *in vitro* aient été réalisées sur des cellules murines et humaines pour analyser l'expression du gène thérapeutique, ces modèles *in vitro* ne peuvent pas reproduire complètement la complexité du système hématopoïétique, notamment les dynamiques de prolifération et différenciation terminale.

Il est donc nécessaire de réaliser une étude *in vivo* afin de caractériser la production du FVIII dans le contexte de l'hématopoïèse physiologique de la moelle osseuse ainsi que les interactions complexes entre les cellules transduites et le système immunitaire. Un essai spécifique pour le FVIII humain nous permettra de mesurer l'expression du transgène dans le plasma murin.

Les différents vecteurs ont déjà été testés et caractérisés *in vitro* ce qui réduit le nombre d'animaux à utiliser dans cette étude (54 souris seront utilisées dans ce projet au lieu de 240). De plus, afin de limiter l'utilisation des modèles murins d'hémophilie, des souris sauvages C57BL/6 vont être utilisées (Remplacement). Enfin, le Raffinement de l'environnement se fera au moyen d'un enrichissement dans les cages (igloo, aspen, brick) ainsi qu'un hébergement adapté à la lignée de souris utilisée en portoir ventilé.

4470. Les troubles anxieux et les troubles liés au stress sont particulièrement fréquents dans les pays industrialisés. Ainsi, on estime que 13 à 22% des habitants de ces pays développeront une pathologie anxieuse au cours de leur vie. Par ailleurs, le stress est impliqué dans l'apparition de pathologies d'ordre psychiatrique avec, au-delà de l'aspect individuel, un coût important pour la société. Par exemple, le trouble de l'adaptation avec anxiété est à l'origine d'environ 9% des consultations de médecine générale pour motif psychologique en France.

Au plan des traitements, l'arsenal pharmacologique disponible concernant l'anxiété et le stress présente de nombreuses limitations de par les effets secondaires importants et/ou l'efficacité limitée de ces molécules. Dans ce contexte, la recherche de nouveaux produits plus efficaces représente donc un enjeu sociétal et économique majeur. La prévention de l'anxiété et du stress par exemple à l'aide de techniques de relaxation ou par des facteurs nutritionnels semble également une approche alternative prometteuse

Le test de l'enfouissement défensif conditionné (EDC) est l'un des tests permettant d'évaluer l'anxiété chez le rongeur. Ce test est notamment connu pour sa sensibilité à la plupart des anxiolytiques (agents pharmacologiques qui réduisent l'anxiété) efficaces chez l'homme. C'est donc un outil de choix pour l'évaluation de nouveaux traitements.

Dans cette situation, le rat est placé dans un environnement connu dans lequel un élément nouveau a été ajouté : une électrode qui délivre un seul et unique choc électrique de très faible intensité lors du premier contact de l'animal avec l'une de ses pattes. En réaction, le rat projette la sciure disposée sur le sol vers l'électrode. Ce comportement d'enfouissement est directement corrélé au niveau d'anxiété des rats. Ainsi, les produits qui présentent des propriétés de type anxiolytiques réduisent la durée d'enfouissement.

Ce projet, incluant 224 rats, a pour objectif d'identifier le mécanisme d'action du produit E1 dont nous avons démontré qu'il possédait des propriétés anxiolytiques. Il semblerait que l'effet anxiolytique du produit E1 agisse comme le diazépam ou la buspirone (composés pharmacologiques de référence).

L'administration de Flumazénil, bloquant l'action du Diazépam, anxiolytique de référence, ou de NAN-190, bloquant l'action de la Buspirone, autre anxiolytique de référence, par voie intrapéritonéale (IP), permettra d'identifier la voie pharmacologique du produit E1 administré par voie orale dans le test d'enfouissement défensif conditionné (EDC) chez le Rat mâle Wistar adulte.

Le projet sera découpé en 3 parties : une première étude sur 96 animaux répartis en 6 groupes de traitement (Véhicule, Diazépam et Produit E1 avec et sans traitement avec le Flumazénil) permettra de démontrer si le produit E1 a une activité comparable à celle du Diazépam. Une deuxième étude réalisée sur 32 animaux permettra de définir la dose efficace de Buspirone par voie orale chez le rat en utilisant 3 doses de Buspirone, avant de réaliser la troisième étude sur 96 animaux répartis en 6 groupes de traitement (Véhicule, Buspirone et Produit E1 avec et sans traitement avec le NAN-190) pour démontrer si le produit E1 a une activité comparable à celle de la Buspirone.

Pour l'ensemble des expériences, les animaux seront habitués au dispositif expérimental pendant les 3 jours précédents le test. Le test de l'EDC sera effectué 80 minutes après le traitement par voie intrapéritonéale et 60 minutes après le traitement par voie orale

(Procédure 1). Le comportement des animaux sera enregistré pendant 5 minutes pour étudier différents paramètres suite à la délivrance du choc électrique de faible intensité mais inévitable (Procédure 2), suite à quoi le rat sera sorti du dispositif expérimental et mis à mort si aucune réutilisation des animaux n'est possible ou envisagée. Les animaux seront observés régulièrement tout au long de l'expérimentation et ceux présentant un comportement anormal (agressivité, cachexie, vocalises...) seront exclus de l'étude et mis à mort en conformité avec les recommandations éthiques.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets anxiolytiques de nouveaux produits car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) (remplacement). Les essais effectués permettront de déterminer la voie pharmacologique d'action du produit E1 nécessaire pour réduire l'anxiété des animaux dans le test de l'EDC. Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaire (réduction) permettant une exploitation statistique des résultats (raffinement).

4471. Ce projet vise à étudier et valider 3 nouvelles molécules multi-compétentes, dites théranostiques. Ces molécules agissent d'une part, comme agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM), permettant ainsi d'optimiser la détection et le diagnostic de tumeurs et d'autre part, comme agent de traitement par thérapie photodynamique (PDT). La PDT est un traitement médical localisé qui consiste à administrer un agent de traitement, lequel va s'accumuler dans la zone tumorale qui sera irradiée (avec une lumière rouge ou infrarouge) pour conduire à la destruction de la tumeur. L'IRM est une technique d'imagerie biomédicale, qui permet d'établir l'efficacité du traitement par un suivi des animaux dans le temps. Ce domaine de la thérapie guidée par l'image peut avoir un impact sociétal important dans l'amélioration du diagnostic et de la prise en charge du patient.

Pour l'une des 3 molécules synthétisées au laboratoire, des études préliminaires sur cultures cellulaires ont permis de démontrer :

- sa supériorité par rapport aux agents de contraste commerciaux utilisés dans les services cliniques,
- son innocuité pour les cellules,
- son efficacité pour un traitement par PDT

Les deux autres molécules seront testées à leur tour sur des cultures cellulaires avant tout essai in-vivo.

Malheureusement, les cultures cellulaires ne reproduisent pas la complexité du vivant, ne permettant pas l'étude de la biodistribution de nos molécules ni le suivi de leur efficacité dans un organisme vivant. Pour cette raison, il est nécessaire de réaliser des études in vivo qui se feront en deux étapes:

- Etape 1 : détermination de la biodistribution et de l'accumulation de nos molécules dans une tumeur induite chez des souris, par IRM à court terme.

- Etape 2 : traitement de la tumeur par PDT et évaluation de son efficacité à l'aide d'un suivi par IRM dans le temps.

Afin d'établir au mieux les capacités de nos molécules pour le traitement de différents types de tumeurs, nous utiliserons lors de cette étude, 6 lignées tumorales. Elles seront implantées en sous-cutanée au niveau du flanc. Lors de la première étape, nous suivrons par IRM différents groupes d'animaux portant des tumeurs, ils seront injectés soit avec une molécule bifonctionnelle synthétisée par un laboratoire de chimie, soit avec un agent de contraste commercial. Deux doses d'injection par molécule synthétisée seront testées et une seule pour une molécule commerciale que l'on souhaite comparer (à noter que cette dose est dix fois plus faible que celle appliquée en milieu clinique avec des agents de contraste commerciaux). Les trois molécules synthétisées au laboratoire seront évaluées en parallèle. Les produits seront injectés en intraveineuse (par la queue), permettant ainsi de suivre par IRM la biodistribution et l'accumulation dans la tumeur durant les premières heures après l'injection.

Une fois le temps d'accumulation optimal déterminé, 3 groupes d'animaux seront observés :

- un groupe d'animaux injectés avec une molécule bifonctionnelle et traités par PDT,
- un groupe d'animaux injectés et non traités par PDT
- un groupe d'animaux non injectés et traités par PDT.

L'évolution volumique de la tumeur au sein de ces groupes d'animaux sera suivie en la mesurant à l'aide d'un pied à coulisse deux fois par semaine pendant 1 mois. Un suivi par IRM une fois par semaine avant et jusqu'à un mois post-traitement, permettra de suivre l'évolution tissulaire (développement de nécrose...) et volumique de la tumeur. Chaque groupe d'animaux sera composé de 8 souris. Au total, 768 animaux seront utilisés sur les 5 ans.

Afin de respecter au mieux la règle des 3R, nous allons:

- Réduire : nous n'utiliserons que 8 animaux par groupe, 8 étant le minimum pour pouvoir faire des études statistiques dans ce type d'étude qui présente une grande variabilité inter-individuelle. De plus, l'imagerie nous permet de suivre un même animal plusieurs fois et de l'utiliser comme son propre contrôle, ce qui réduit le nombre d'animaux à inclure.
- Raffiner : enrichir l'environnement des animaux, former des groupes sociaux. Le contrôle et le suivi de la douleur des animaux seront effectués tous les jours, et seront minimisés grâce aux anesthésies
- Remplacement : nous sommes obligés d'utiliser des souris car l'objectif du travail est de visualiser la biodistribution et l'accumulation de l'agent de contraste dans une tumeur et ensuite d'estimer l'efficacité du traitement par thérapie photodynamique. Cependant, des études in vitro sont réalisées afin de diminuer le nombre de molécules bi-fonctionnelles à évaluer en choisissant les plus prometteuses et les moins toxiques.

4472. La peste, maladie gravissime très contagieuse qui est causée par la bactérie *Yersinia pestis*, est habituellement transmise par les puces. Les modèles animaux qui consistent à inoculer des bactéries cultivées in vitro à l'aide d'une aiguille et d'une seringue reflètent très imparfaitement les conditions naturelles d'infection. Il n'est donc pas étonnant que plusieurs publications ont révélé que seule l'inoculation de *Y. pestis* par la puce permette une meilleure compréhension de la physiopathologie de la peste et l'identification de facteurs essentiels à la transmission de la maladie. C'est pourquoi, nous désirons utiliser un modèle de transmission de la peste par piqûre de puce pour recenser des gènes de *Y. pestis* qui sont essentiels à la virulence de la bactérie. Ce

recensement constituera le socle d'une recherche fondamentale visant à mieux comprendre les mécanismes moléculaires conduisant à la peste. Un tel travail améliorera nos connaissances sur les mécanismes de transmission de la maladie ce qui, à terme, conduira à proposer de nouveaux moyens de lutte contre la peste.

Au maximum, 750 animaux seront utilisés sur une période de 5 ans.

Exigence vis-à-vis du remplacement. Aucun modèle in vitro mime l'infection d'un mammifère et encore moins d'un mammifère piqué par un insecte. Le modèle animal ne peut pas être remplacé dans nos expériences.

Exigence vis-à-vis de la réduction. Pour mener à bien le recensement des gènes de *Y. pestis* impliqués dans la virulence après piqûre de puce, le nombre d'animaux par groupe ne peut pas être inférieur à 10 afin de ne pas compromettre la puissance des tests statistiques. De plus, les expériences doivent être également menées au minimum 2 fois afin de démontrer la reproductibilité du résultat. Donc, le nombre d'animaux et d'expériences sera réduit au strict minimum.

Exigence vis-à-vis du raffinement. Les animaux seront manipulés individuellement à l'isolement afin d'éviter tout stress aux animaux non manipulés. Après l'infection, les animaux seront observés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérimentation. Tout animal sera sacrifié (par overdose d'isoflurane) dès qu'il montrera les signes terminaux de la maladie. Comme nous cherchons à déterminer le rôle de gènes dans un processus infectieux, les médications analgésiques et anti-inflammatoires ne pourront pas être utilisées car elles interfèrent avec ce processus.

4473. La propagation des bactéries multirésistantes et l'absence de nouveaux antibiotiques font courir un risque d'impasse thérapeutique de plus en plus fréquent. Le ceftobiprole est une nouvelle céphalosporine de 5^{ème} génération avec une activité à la fois sur les souches de *S. aureus* sensibles (SASM) et résistantes (SARM) à la méticilline. De ce fait, cette nouvelle molécule représente une alternative thérapeutique prometteuse pour le traitement des infections sévères à *S. aureus*.

Une récente analyse au niveau mondial estime à 31.5 millions le nombre annuel de cas de sepsis et à 19.4 millions le nombre de cas de sepsis sévère avec potentiellement 5.3 millions de décès/an. L'émergence de la résistance à la méticilline chez les souches de *S. aureus* complique la prise en charge des patients atteints de sepsis et est un facteur de risque indépendant de mortalité dans les bactériémies.

En addition, l'antibiothérapie optimale pour ces patients n'est toujours pas connue, particulièrement pour les infections dues à des souches de SARM avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) hautes à la vancomycine.

Le sepsis est considéré comme une réponse systémique à une infection en présence d'une dysfonction d'un certain nombre d'organes. C'est pourquoi, en plus de l'aspect thérapeutique, il est indispensable d'évaluer également la composante immunitaire de réponse à l'infection, essentiellement due à l'immunité innée.

Le but de notre étude est d'évaluer l'activité in vivo d'une nouvelle option thérapeutique, le ceftobiprole, en comparaison avec un autre antibiotique bactéricide, la daptomycine, dans un modèle murin de sepsis à *S. aureus*. L'impact de la stratégie thérapeutique sera évalué à la fois sur l'aspect activité antibactérienne et sur l'aspect inflammatoire du sepsis, deux composants indissociables de cette pathologie sévère.

Pour cela, 876 souris Swiss femelles vont être utilisées, ainsi que 126 souris C57BL/6JRj. Dans un premier temps, nous étudierons l'activité antibactérienne du ceftobiprole versus daptomycine, puis nous évaluerons la composante inflammatoire de cette réponse de l'hôte.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'évaluation et la comparaison de l'activité d'un antibiotique sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées de façon in vitro (faible corrélation in vitro-in vivo). Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude.

4474. La toxicité est la mesure de la capacité d'une substance à provoquer des effets néfastes et mauvais pour la santé ou la survie chez toute forme de vie (animale telles qu'un être humain, végétale, fongique, bactérienne), qu'il s'agisse de la vitalité de l'entité ou d'une de ses parties (ex: foie, rein, poumon, etc. chez l'animal).

La toxicité orale sub-chronique est l'effet néfaste se produisant chez des animaux d'expérience, résultant de l'administration répétée et quotidienne d'une substance chimique ou naturelle par voie orale. Les études de toxicité sub-chronique ont pour objet d'examiner la nature biologique des effets toxiques et de déterminer la dose à laquelle se produisent ces effets. La dose s'exprime en poids de substance testée par unité de poids de l'animal (mg/kg). La substance à tester est administrée quotidiennement par voie orale à une ou plusieurs doses à un ou plusieurs groupes d'animaux d'expérience, à raison d'une valeur de dose par groupe et ce pendant une période de 28 ou 90 jours. Au cours de la période d'administration de la substance, on observe quotidiennement les animaux de manière à déceler toute manifestation éventuelle de toxicité. On détermine la croissance, le comportement et la mortalité des animaux. On procède également à des études sur le sang et les organes de ces animaux et éventuellement sur l'urine. Les animaux qui meurent durant la période d'administration sont autopsiés et, au terme de l'essai, tous ceux qui survivent sont mis à mort, autopsiés et soumis à des examens histopathologiques appropriés.

Pour chaque espèce et pour chaque sexe, une dose sans effet sera déterminée. Le fait de réaliser ces études à la fois sur des mâles et des femelles de la même espèce, permet de détecter des différences de sensibilité entre les deux sexes.

L'objet de ce projet d'une durée de 5 ans est donc d'étudier la toxicité éventuelle de 24 à 72 composés naturels, extraits végétaux, extraits protéiques et microorganismes, administrés par voie orale en traitement sub-chronique pendant 90 jours à la dose unique de 1000 mg/kg/jour ou à 3 doses, la dose maximale étant de 1000 mg/kg/jour, chez des rats mâles et femelles en comparaison avec des groupes d'animaux témoins recevant le véhicule de mise en solution de ces composés naturels. Ce projet sera réalisé selon les exigences des lignes directrices édictées pour ce type d'étude.

Pour l'ensemble de ce projet sur une période de 5 ans, un maximum de 2184 rats, 1344 femelles et 840 mâles, seront nécessaires. A la demande de la FDA, une étude préliminaire sera tout d'abord effectuée sur des groupes de 6 rats femelles (total de 504 rats femelles) recevant l'administration par voie orale de chacun des 72 composés à tester pendant 14 jours à la dose maximale de 1000 mg/kg/jour pour vérifier l'absence d'effet toxique précoce (mortalité, forte perte de poids, modifications importantes du comportement, diarrhée...), les femelles étant en effet considérées comme étant plus sensibles que les mâles aux effets toxiques potentiels de substances (raffinement). Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduction), 1 groupe d'animaux témoins traité avec le véhicule sera utilisé pour 6 groupes d'animaux traités avec 1 composé à tester. A l'issue des 14 jours de traitements avec les composés à tester, les animaux sont mis à mort et une autopsie est réalisée pour observer l'ensemble des organes (forme, taille et couleur) par rapport à ceux des animaux traités avec le véhicule. En cas d'effet toxique observé pour un des 72 composés testés, l'étude pendant 90 jours sera effectuée ou non avec des doses inférieures à la dose maximale de 1000 mg/kg/jour. Des groupes de 10 rats mâles et 10 rats femelles seront utilisés pour chacun des 24 à 72 composés maximum à tester (total maximum de 840 rats femelles et 840 rats mâles), correspondant au nombre d'animaux minimum par groupe requis selon les lignes directrices OCDE n° 408 et US EPA OPPTS 870.3100 (réduction) permettant une analyse statistique des données obtenues (raffinement). Ces études de toxicité sub-chronique ne peuvent pas être remplacées par des méthodes alternatives.

Les animaux sont hébergés par 2 dans des cages transparentes (48x27x20 cm), sans autre enrichissement que l'enrichissement social et que la vision des congénères placés dans les cages avoisinantes. Ils sont observés quotidiennement pendant les 14 et 90 jours d'étude. Un examen ophtalmique est effectué avant le démarrage des traitements et à la fin des 90 jours de traitement. Un suivi pondéral et de leurs prises alimentaire et hydrique est effectué régulièrement. Des tests comportementaux sensori-moteurs sont effectués au cours de l'avant-dernière semaine de traitement pour mettre en évidence la toxicité éventuelle de composés administrés de manière sub-chronique sur les sphères sensorielle et motrice (réactivité sensorielle à des stimuli de différents types : auditif, visuel et proprioceptif ; évaluation de la force de préhension des membres antérieurs : accroche à une barre ; évaluation de l'activité motrice et de la coordination locomotrice : Rotarod). 24 heures avant leur mise à mort, les animaux sont placés en cage à métabolisme sans accès à la nourriture pour le recueil des urines de 24 heures permettant l'analyse de différents paramètres urinaires. 24 heures après le dernier traitement oral, un prélèvement de sang intracardiaque est effectué sous anesthésie induisant la mort des animaux et permettant de prélever l'ensemble des organes nécessaire à la réalisation d'analyses histologiques. Au cours de l'étude, si un animal présente un niveau de souffrance trop important (tremblements importants, paralysie, immobilité associée à l'arrêt d'alimentation...), il est mis à mort en conformité avec les recommandations éthiques.

4475. L'hépatoblastome représente la tumeur maligne primitive du foie la plus fréquente chez l'enfant. 10 à 20% des patients présentent des métastases au diagnostic (hépatoblastome de très haut risque). Le premier site métastatique est le poumon. Aujourd'hui encore, en dépit des progrès observés au cours des dernières décennies, de 40 à 80% des enfants présentant des métastases au diagnostic continuent à mourir de cette maladie.

Le traitement est défini actuellement en Europe selon un protocole qui associe une chimiothérapie à un traitement chirurgical (hépatectomie partielle).

Il a été décrit précédemment chez certains patients ayant eu une hépatectomie partielle première sans chimiothérapie pré-opératoire, un développement précoce et rapide d'une récidive locale tumorale et la survenue de métastases entre le 10ème et le 15ème jour post-opératoire. Ce court intervalle de temps correspond à la période de régénération hépatocytaire maximale après une hépatectomie.

L'objectif de cette étude est d'évaluer pour la première fois in vivo l'impact de la régénération hépatique après hépatectomie partielle sur la croissance de la tumeur primitive et des métastases chez des souris porteuses d'un hépatoblastome.

Des souris ayant eu soit une xénogreffe orthotopique (i.e. dans le foie, permettant d'évaluer l'impact sur la tumeur primitive) d'hépatoblastome soit une xénogreffe pulmonaire d'hépatoblastome (permettant d'évaluer l'impact sur les métastases) seront utilisées comme modèle animal. Au total l'étude portera sur 96 souris.

Il n'est pas possible actuellement de mimer in vitro la régénération hépatique c'est pourquoi le passage par l'animal est aujourd'hui nécessaire afin d'objectiver au mieux l'impact de l'hépatectomie partielle et la régénération hépatique qui s'en suit sur la croissance tumorale des hépatoblastomes. Pour évaluer le rôle du microenvironnement et la dissémination métastatique il est nécessaire de passer par un modèle animal

La souffrance des animaux dans le projet est limitée par la réalisation d'une anesthésie générale au moment de la greffe tumorale et lors de l'hépatectomie partielle. Les animaux seront surveillés quotidiennement, leur poids corporel mesuré au moins deux fois par semaine, la croissance tumorale sera évaluée une fois par semaine. En cas d'atteinte des limites éthiques l'animal sera mis à mort selon les recommandations réglementaires afin de ne pas générer de souffrance injustifiées.

L'ensemble de l'étude se déroule dans des conditions d'hygiène rigoureuse afin de garantir un statut sanitaire optimal et prévenir des problèmes de santé.

4476. L'étude s'inscrit dans un large projet qui vise à décrypter les mécanismes moléculaires de toxicité et d'activité anticancéreuse d'une nouvelle molécule que nous appelons L6.

Dans ce projet, la majorité des expérimentations font appel à des méthodes alternatives in vitro, mais la preuve d'un intérêt thérapeutique potentiel de L6 passe maintenant obligatoirement par des tests de toxicité et d'efficacité chez l'animal. Aucune donnée n'étant disponible concernant les effets de L6 in vivo, nous sommes en charge d'étudier la tolérance aiguë, chronique, la distribution tissulaire, en parallèle avec l'efficacité thérapeutique de cette molécule.

Ce travail permettra de définir les informations préliminaires indispensables, dont l'existence d'une éventuelle fenêtre thérapeutique, pour constituer le dossier réglementaire permettant le développement et la mise en place des études précliniques en vue de l'utilisation de ce produit chez l'homme.

Les procédures prévues dans ce projet sont séquentielles, la réalisation d'une procédure dépendant de la procédure précédente, de manière à réduire au maximum le nombre de souris impliquées dans le projet. D'autre part, nous avons mis en place une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux qui permettra de limiter toute souffrance animale.

Le nombre maximum de souris utilisées sera de 384.

4477. Les traitements endoscopiques ayant pour but de retirer les tumeurs superficielles digestives, sont une excellente alternative à la chirurgie. De par leur voie d'abord (utilisation de la voie naturelle digestive supérieure), ils ont en comparaison à la chirurgie, une morbidité et une mortalité bien moins importante. Nous pouvons par exemple citer les tumeurs superficielles de l'œsophage qui peuvent être résectionnées de façon mini-invasives par endoscopie alors que la chirurgie (oesophagectomie) est associée à une mortalité variant de 5 à 12% en fonction de l'expertise du centre.

Les techniques endoscopiques de référence sont la mucosectomie (résection avec une anse diathermique), et une plus récente appelée « dissection sous muqueuse » (DSM) qui présente d'excellents résultats carcinologiques. La complication la plus grave de ces techniques est la perforation lors de la résection endoscopique. Le taux de perforation diminue de façon très importante avec le nombre de procédures réalisées. Une limite à la DSM est le temps nécessaire pour l'apprentissage de la technique. Un nombre minimum de procédures est indispensable à sa maîtrise.

Avant la formation sur l'animal anesthésié, une à deux séances de formation sont prévues sur des estomacs de porc ex vivo.

Le porc charcutier, par ses similitudes anatomiques et histologiques est un excellent modèle expérimental de résection endoscopique des tumeurs, reconnu et validé dans la littérature scientifique. Les techniques endoscopiques utilisées sont les mêmes que pour l'Homme et la reproductibilité est optimale chez le porc, permettant l'apprentissage et la maîtrise de la technique.

Notre projet est d'organiser des sessions de formation à la dissection sous-muqueuse pour la résection des tumeurs de l'œsophage et de l'estomac. L'objectif est de savoir parfaitement utiliser tout nouveau matériel pour la résection et pour traiter les complications.

Nous prévoyons 5 séances (3 porcs par séance) par an sur une période de 2 ans, en comptant 2 étudiants et 1 encadrant par porc. Nous pensons que 2 années (soit 10 séances au total) sont nécessaires pour atteindre un niveau technique suffisant. Les animaux seront pris en charge au laboratoire et anesthésiés pour les procédures avant d'être euthanasiés à la fin de la séance d'entraînement. Devant tout signe de souffrance non contrôlable et/ou intolérable d'un animal, nous procéderions à son sacrifice avant la fin de la séance.

4478. L'usage de plus en plus large de lignées murines transgéniques nécessite de s'assurer de leur phénotype général afin de pouvoir conclure correctement sur le lien entre l'introduction du transgène et les éventuelles anomalies observées.

Le but de ce stage de Formation Permanente est de présenter les différentes analyses indispensables à la caractérisation phénotypique d'une lignée murine (comportement, reproduction, métabolisme...). Au cours de cet enseignement, les stagiaires sont amenés à manipuler des souris lors de démonstrations de protocoles comportementaux ou de prélèvement peu invasifs, sous la supervision de formateurs expérimentés. Les démonstrations et expérimentations proposées ont été conçues dans le respect des règles de l'expérimentation animale, en particulier de la règle des 3R. En effet, les analyses comportementales nécessitent d'être pratiquées sur des animaux entiers et vigiles et ne peuvent être remplacées par des approches in vitro. Par ailleurs, les stagiaires travaillent en binômes et les animaux d'expériences sont utilisés dans deux procédures successives, permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux nécessaires.

De ce fait, le stage utilise chaque année 16 souris pour 16 stagiaires, soit 80 souris pour les 5 ans du projet.

4479. PMAT/ENT4 est un transporteur atypique récemment découvert et potentiellement également impliqué dans le transport des neurotransmetteurs aminergiques dans le cerveau. Pour explorer sa fonction, la recombinaison sélective de PMAT sera réalisée en croisant des souris comportant un allèle floxé du gène PMAT (Slc29a4 ; appelé encore ENT4) avec une lignée exprimant la recombinaison Cre dans le cerveau et dans la lignée germinale ou encore par injection stéréotaxique de virus AAV exprimant cette recombinaison. On déterminera son rôle 1) dans l'ensemble du cerveau, 2) dans les ganglions de la base et la locomotion et les processus de récompense et 3) dans le noyau du raphe dans le contrôle de l'anxiété, du stress et les comportements sociaux. Les modèles de souris knock-out pour le transporteur étudié (PMAT) permettent d'étudier la fonction de celui-ci in vivo chez l'animal, ce qui ne peut pas être réalisé en tube à essai ou en culture. L'étude chez l'animal est donc irremplaçable en complément des autres approches pour aborder les mécanismes complexes qui sous-tendent des pathologies comme les maladies psychiatriques ou l'addiction. De même, l'action à court terme ou long terme de drogues ou médicaments ne peut être évaluée de manière définitive qu'in vivo sur animal entier pour rester le plus conforme aux conditions d'administration de ces médicaments chez l'homme. Dans le cadre du raffinement de l'expérimentation animale, les protocoles utilisés (chirurgie, NSF, confrontation résident-intrus) ont été optimisés pour exposer les animaux au minimum de douleur possible. Bien que l'on essaie de minimiser le nombre d'animaux, des groupes de 10 souris minimum doivent être utilisés afin d'obtenir des résultats statistiquement concluants. La plupart du temps, les mêmes animaux seront soumis séquentiellement à des batteries de tests comportementaux pertinents entrecoupés de périodes de

repos, afin d'en limiter le nombre. A terme, ils seront utilisés pour les analyses moléculaires et biochimiques. On évalue le nombre d'animaux sur 5 ans à 480 souris (sauvages ou mutantes).

4480. L'équipe travaille sur des transporteurs de neurotransmetteurs importants pour les comportements liés à l'humeur et des troubles psychiatriques comme la dépression et les psychoses. Les expériences chez des souris mutées (knock-out) pour le transporteur OCT2 vont permettre de comprendre le mécanisme d'action de certains médicaments (antidépresseurs, antipsychotiques) utilisés chez l'homme et potentiellement identifier de nouveaux agents thérapeutiques. En particulier, le projet vise à caractériser le rôle d'OCT2 dans la réponse aux antidépresseurs dans un modèle de dépression chronique chez la souris, avec pour objectifs i) de déterminer si OCT2 est impliqué dans l'efficacité de certains antidépresseurs classiques et ii) de définir la contribution de différents processus biologiques à la potentialisation de la réponse aux antidépresseurs par OCT2. Une autre partie du projet se propose de développer de nouveaux ligands spécifiques des OCTs afin de moduler leur activité *in vivo* chez l'animal, en vue d'améliorer l'efficacité des antidépresseurs dans notre modèle préclinique. L'action à court terme ou long terme de ces diverses molécules psychoactives ne peut être évaluée de manière définitive qu'*in vivo* sur animal entier pour rester le plus conforme aux conditions de leur administration chez l'homme. Dans le cadre du raffinement de l'expérimentation animale, les protocoles utilisés (chirurgie, NSF) ont été optimisés pour exposer les animaux au minimum de douleur possible. Bien que l'on essaie de minimiser le nombre d'animaux, des groupes de 10 souris minimum doivent être utilisés afin d'obtenir des résultats statistiquement concluants. La plupart du temps, les mêmes animaux seront soumis séquentiellement à des batteries de tests comportementaux pertinents entrecoupés de périodes de repos, afin d'en limiter le nombre. A terme, ils seront utilisés pour les analyses moléculaires et biochimiques. On évalue le nombre d'animaux sur 5 ans à 590 souris (wild-type ou knock-out).

4481. Le cerveau est construit de très nombreux neurones interconnectés par des synapses. Les synapses transmettent l'activité entre neurones et leur modification est généralement supposée sous-tendre les processus d'apprentissage et de mémorisation. Un défi majeur des neurosciences est de comprendre comment ces éléments pourtant relativement simples peuvent être arrangés pour générer les fonctions sophistiquées du cerveau. Notre groupe élabore de nouvelles théories d'apprentissage par le biais de l'identification dans les circuits du cerveau l'implémentation d'algorithmes d'apprentissage. Cela concerne notamment une théorie d'"essai et échec" dans le système moteur. Le but de ce projet est de tester par des enregistrements *in vivo*, lors de comportements modèles de l'apprentissage, l'opération de nos algorithmes. Les expériences consisteront en des enregistrements électrophysiologiques de multiples neurones afin de vérifier si les changements d'activité lors de l'apprentissage sont conformes à nos prédictions. De plus, nous appliquerons l'inhibition opto-génétique d'un type neuronale qui, selon notre théorie, apporte un signal nécessaire pour l'apprentissage. Ceci permettrait de tester notre hypothèse.

Le fait que nous avons établi une théorie complète nous permet de cibler directement les expériences clés. Ceci représente une approche efficace pour réduire le nombre d'animaux et pour raffiner les expériences. En revanche, s'agissant d'une étude des mécanismes sous-tendant un comportement, il n'est pas envisageable de remplacer les animaux. Le deuxième volet de notre stratégie de réduction et de raffinement concerne les statistiques. Afin d'éviter les redondances et gaspillages associés aux recherches non répliquables, nous visons des effectifs suffisants pour établir correctement les conclusions. Cela impliquera généralement des effectifs d'environ 10, qui permettent souvent de démontrer clairement avec des tests non paramétriques des effets du type que nous étudions.

Les expériences utiliseront 250 souris et, seulement si certaines expériences ne peuvent pas se faire avec des souris (à cause de leur petite taille), 50 rats.

4482. Dans ce projet nous allons étudier la faisabilité d'une approche de thérapie génique pour la glycogénose de type III (GSD III).

GSD III est une maladie rare caractérisée par une dégénérescence progressive du foie et des muscles. La fréquence de la maladie est de 1/100 000. La GSD III est une maladie autosomale récessive due à l'absence de l'enzyme de débranchement du glycogène (GDE), enzyme clé dans la dégradation du glycogène.

La maladie se présente en deux phases : une phase juvénile et une phase adulte. Les malades présentent une hépatomégalie, une hypoglycémie, une hyperlipidémie et un retard de croissance. Chez l'enfant la GSDIII affecte principalement le foie. Sans un régime alimentaire approprié les conséquences sont fatales. Chez l'adulte, la maladie a un phénotype musculaire dégénératif plus marqué.

Actuellement, il n'y a pas de traitement pour la GSDIII mais un régime riche en glucides complexes et en protéines peut ralentir son évolution.

Le but de notre projet est de développer une approche de transfert de gène permettant aux cellules des patients atteints de GSDIII de recréer la protéine GDE manquante. Cette approche vise aussi bien les enfants (phénotype métabolique) que les adultes (phénotype musculaire).

Afin de respecter la règle des trois R, tous nos virus médicament ont préalablement été testés *in vitro* (Remplacement) et seuls ceux ayant montré la plus importante expression de la protéine GDE seront utilisés *in vivo*. Ceci nous a permis de sélectionner 18 traitements candidats sur 36 potentiels. Toutefois la capacité de nos virus à franchir les défenses immunitaires ne peut être démontrée complètement que dans un organisme physiologique "entier". Nous prévoyons donc de les tester chez le modèle animal qui mime le phénotype musculaire et métabolique de la maladie. Nous prévoyons ainsi de tester nos hypothèses thérapeutiques sur un modèle de souris (souris GDE-KO) présentant les mêmes déficiences observées dans les patients atteints de GSDIII.

La construction de la procédure a été faite pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisé, puisque au lieu des 503 conditions théoriques à tester, nécessitant 2515 souris, nous nous limiterons à l'utilisation de 432 souris (Réduction).

4483. Comprendre les mécanismes conduisant à une réponse immuno-protectrice dans l'intestin représente un enjeu majeur que ce soit pour le traitement des allergies alimentaires et des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou pour améliorer les approches thérapeutiques mucosales. L'intestin des mammifères possède des sites sentinelles spécifiques appelés plaques de Peyer (PP) composées de regroupements de follicules de lymphocytes B et impliquées dans l'initiation de ces réponses immunitaires intestinales. Nous avons récemment identifié au sein des PP une nouvelle sous-population de cellules dendritiques (DC), cellules reconnues pour être indispensables à l'initiation de la réponse immunitaire. Leur manipulation pourrait donc avoir des répercussions médicales importantes.

Notre projet vise à caractériser cette nouvelle population d'un point de vue fonctionnel. La compréhension globale du rôle des LysoDC dans l'induction de la réponse immunitaire mucosale anti-infectieuse ne peut s'envisager qu'au travers de l'analyse de l'organisme entier. De plus, comme aucun modèle de culture cellulaire in vitro ne permet de reproduire le phénotype des LysoDC l'utilisation du modèle animal murin est indispensable. A défaut de remplacer le modèle animal, nous suivrons la règle des 3 Rs et réduirons son utilisation au strict minimum pour obtenir des résultats fiables. Aussi, afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires aux explorations fonctionnelles ex vivo, une part d'exploration fonctionnelle in vivo est essentielle. Il est important de souligner que la plupart des procédures expérimentales prévues n'auront qu'un impact mineur sur le bien-être et la santé des animaux qui seront hébergés en milieu enrichi (coton, dômes protecteurs). Seules les infections bactériennes sur le long terme, conduites sur un nombre très restreint de souris en fin du projet quand tous les critères d'expérimentation seront extrêmement bien raffinés et calibrés, engendreront une altération de l'état de santé des souris. La détection d'un point limite précoce et l'utilisation d'analgésique dans l'eau de boisson permettront dans ce dernier cas de limiter au maximum la souffrance des animaux. Ces infections sont toutefois indispensables à la compréhension des mécanismes de défense immunitaire mucosale de l'organisme et à l'établissement du rôle des LysoDC dans ces mécanismes, compréhension nécessaire pour pouvoir ensuite moduler cette réponse et l'améliorer.

Chaque expérimentation requiert un nombre allant de 6 à 10 souris pour être statistiquement pertinente et complète. L'utilisation d'environ 1000 souris sera nécessaire pour finaliser l'ensemble du projet.

4484. Le coronavirus de la dinde (TCoV) est avec le coronavirus de la bronchite infectieuse du poulet (IBV) l'un des deux coronavirus aviaires les plus importants en termes d'impact économique, l'étude de ce virus et des pathologies associées est donc importante pour la filière d'élevage. La souche virale TCoV-080385d a été isolée en France en 2008 chez des dindes présentant des signes cliniques cohérents avec une maladie multifactorielle dénommée « complexe entéritique du dindonneau » (PEC), maladie qui regroupe plusieurs troubles intestinaux survenant chez la dinde avant sept semaines d'âge et en général au cours des trois premières semaines de vie. Le TCoV a été plus fréquemment détecté dans les lots de dindonneaux atteints de PEC que chez des lots témoins.

Une précédente expérimentation animale, avait pour but de déterminer le taux de reproduction (R_0) de ce virus chez le dindonneau, ce qui correspond au nombre d'animaux nouvellement infectés, dans une population sensible, par un animal infectieux pendant toute sa période d'excrétion. Les résultats ont mis en évidence la présence de génome viral dans les échantillons cliniques jusque 5 semaines post-infection. Par contre, la détection du génome ne permet pas de savoir si le virus retrouvé est encore vivant, donc infectieux pour l'animal.

Notre projet a ainsi pour objectif de déterminer la durée d'excrétion des virus infectieux. Ceci se fera en inoculant des dindonneaux de 10 jours par voie orale avec des prélèvements issus de l'expérimentation précédente. En outre, le projet permettra de déterminer si le virus a été transmis par voie oro-fécale et/ou aérienne. Ce paramètre sera testé à l'aide de dindonneaux sentinelles qui seront exposés au virus soit par une contamination induite de leur environnement, soit par l'air uniquement. Ces résultats constitueront les étapes fondamentales pour i) conclure l'expérimentation « taux de reproduction (R_0) » et ii) déterminer la ou les voies de transmission pour de futures études. Les expérimentations conduites seront faites dans le respect de la règle des 3R (ensemble de recommandations concernant les moyens à mettre en œuvre pour limiter l'utilisation des animaux : Remplacer, Réduire et Raffiner). La procédure expérimentale demandée fera appel à 6 lots de 18 dindonneaux (108 animaux au total), nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Cette procédure pourra être répétée 3 fois maximum en fonction des résultats (324 animaux totale).

Aucun point limité n'a été fixé car en conditions expérimentales, le virus étudié induit seulement des infections asymptomatiques ou une entérite modérée et transitoire, ne s'accompagnant pas de mortalité ou de souffrance visible chez les animaux inoculés. Du fait de l'absence de symptômes évidents, l'infection des animaux inoculés sera mise en évidence par un test moléculaire dans des écouvillons cloacaux et trachéaux. Pour chaque lot, des écouvillonnages seront effectués à J0 et de J1 à J4 post inoculation (PI), tandis qu'à J4 PI, jour de l'euthanasie, les intestins et les trachées seront prélevés.

4485. Les gliomes sont des tumeurs cérébrales ayant une incidence de 4 à 5 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes. Il s'agit également du deuxième type de cancer le plus fréquent chez l'enfant. Les patients atteints de glioblastome, le plus agressif des gliomes, survivent en moyenne 14 mois après le diagnostic de la tumeur et ce malgré le traitement combinant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. C'est pourquoi il est nécessaire de chercher de nouveaux traitements. Notre projet s'inscrit dans ce contexte en utilisant une source de rayons X très particulière et encore expérimentale, de basse énergie mais de haut flux,

permettant (i) de sélectionner au mieux les énergies intéressantes (ii) de faire un microfractionnement spatial de la dose. Ces deux spécificités ne sont pas techniquement possible sur les sources classiques hospitalières à l'heure actuelle. Nous explorons le potentiel de cette technique depuis une quinzaine d'années déjà, selon différentes approches : simulation Monte Carlo, dosimétrie expérimentale, irradiation de cellules en culture. Ces approches bien qu'indispensables restent très limitées car elles ne prennent pas en compte la complexité du tissu tumoral, se développant de façon autonome, possédant sa propre vascularisation etc... De fait, l'utilisation de modèles précliniques de rongeurs porteurs de tumeurs (souris et rats) permet de tester les modalités d'imagerie (diagnostique), les modalités d'irradiation (géométrie, balistique, dose) et les protocoles de thérapie visant à augmenter la sécurité du patient relativement à la dose délivrée (adjonction de médicaments anticancéreux) sur des tumeurs proches des tumeurs humaines. Ce projet portant sur la physiologie tumorale, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Pour cette demande, nous avons estimé une utilisation d'animaux à hauteur de 100 par expérience, avec 5 expériences par an et cela sur 3 ans (1500 rongeurs (souris ou rats)). Ce nombre d'animaux a été déterminé grâce à un test statistique appliqué pour chaque expérience, à la littérature, aux expériences réalisées ces 15 dernières années qui nous a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Par ailleurs, certains protocoles de notre équipe font déjà l'objet d'essais cliniques humains (patients volontaires souffrant de tumeurs cérébrales). L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience 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

4486. Le syndrome du X fragile est le trouble d'incapacité intellectuelle héréditaire le plus courant et l'une des principales cause du développement de troubles de type autistique.

Les altérations de la signalisation des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) ont été décrites comme étant l'une des caractéristiques étiologiques principales du syndrome du X fragile et les traitements pharmaceutiques visant à l'amélioration de certains aspects de la maladie ciblent souvent cette voie. Cependant plusieurs essais cliniques à grande échelle employant les nouveaux antagonistes des mGluRs ont récemment été annulés à cause du manque d'efficacité du traitement.

Une meilleure compréhension de la nature cellulaire et sub-cellulaire du dysfonctionnement des mGluRs dans le syndrome du X fragile est nécessaire.

Ce projet vise à tester, sur un modèle murin de cette maladie, les effets d'une intervention expérimentale sur les déficits fonctionnels à la synapse et de troubles cognitifs, afin de mieux cerner la cible pharmacologique susceptible de réduire les troubles du comportement liés à l'autisme.

Pour toutes les études décrites dans ce projet, nous utiliserons une seule et même lignée de souris transgénique. En accord avec le principe des 3Rs (réduction, raffinement, remplacement), nous avons réfléchi les expériences de façon à réduire à minima le nombre d'animaux utilisé ainsi que la souffrance imposée par notre protocole. Afin de ne pas utiliser plus que le nombre minimal d'animaux nécessaire, nous avons déterminé statistiquement le nombre minimal d'animaux nécessaires pour que les résultats de notre étude soient validés (réduction). Les animaux seront hébergés de manière adaptée à leurs besoins et reçoivent une surveillance quotidienne et les soins adaptés (raffinement). Les modèles de remplacement in vitro actuellement disponibles ne récapitulent pas l'architecture du cerveau et ne permettent pas la modélisation des processus cognitifs déficients chez les individus atteints de cette maladie. D'autre part, la souris est à ce jour le seul modèle mammifère, dont le génome est facilement modifiable. Le bénéfice attendu de ce projet est une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires sous-jacents de cette maladie et à terme d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet essentiel à 84 animaux.

4487. Les femmes ont deux chromosomes X alors que les hommes n'en ont qu'un seul. Pour assurer un bon dosage de l'expression des gènes du X, un des deux chromosomes est inactivé chez les femmes, de façon aléatoire. Les femmes sont donc des mosaïques car leur corps est constitué de cellules exprimant le X paternel et d'autres exprimant le X maternel. Cette diversité cellulaire peut être avantageuse car une mutation délétère sur un allèle d'un gène du X ne sera pas exprimée par toutes les cellules. Cependant, un allèle muté qui serait létal chez les hommes peut subsister à l'état hétérozygote chez une femme.

Notre projet a pour but de comprendre les mécanismes de mise en place et de maintien de l'inactivation du chromosome X chez la femelle mammifère. Il se décompose en 5 sous-objectifs:

- A. Quelles sont les régions du génome importantes pour l'inactivation?
- B. Comment les chromosomes X (actif et inactif) s'organisent ils dans le noyau et adoptent ils des structures différentes?
- C. Quelles sont les modifications épigénétiques liées à l'inactivation du chromosome X?
- D. Quels sont les gènes qui échappent à l'inactivation du chromosome X et comment?
- E. Quelles sont les implications neurologiques de l'inactivation du chromosome X et de l'échappement chez les femelles

La manipulation des mécanismes d'activation et d'inactivation de gènes sur le chromosome X représente un espoir thérapeutique pour les maladies liées à l'X comme le syndrome de Rett (mutation dans le gène *Mecp2* sur un des 2 chromosomes X). De plus, nos travaux contribuent à la compréhension de mécanismes fondamentaux de la régulation de l'expression des gènes au cours du développement et peuvent avoir un impact plus large, notamment dans le domaine du cancer.

Notre modèle d'étude in vivo est la souris car le phénomène que nous étudions est spécifique des mammifères. Nous avons estimé à 1595 le nombre d'animaux nécessaires et suffisants pour ce projet

Les modifications génétiques lors de la création de nouvelles lignées transgéniques nécessaires concernent uniquement des régions importantes pour l'inactivation du chromosome X et nous savons que l'incapacité à inactiver un X conduit à une létalité précoce, au cours du premier tiers de la gestation. Nous ne nous attendons donc pas à induire de la souffrance animale liée à ces mutations. Notre projet a été élaboré en conformité avec le principe des 3R:

Remplacement : La sélection des expériences pertinentes s'appuie sur de nombreuses expériences préalables effectuées in vitro sur des cellules murines en culture et le recours à l'expérimentation animale se limite aux cas suivants: valider ou invalider des observations réalisées in vitro, étudier des processus qui ne peuvent pas être modélisés in vitro (développement embryonnaire, étude du cerveau).

Réduction: Notre travail in vitro permet de réduire autant que possible le recours à l'expérimentation animale. Nous pratiquerons quand c'est possible, plusieurs types d'analyses cellulaires et moléculaires à partir des prélèvements du même animal. De plus, nous induirons une superovulation des femelles pour augmenter le nombre d'embryons préimplantatoires récoltés et diminuer le nombre de femelles nécessaires.

Raffinement, par une manipulation minimale des animaux vivants. En cas d'apparition de signes de souffrance et de détresse des animaux mutants, des procédures d'euthanasie seront immédiatement mise en place.

Nous disposons de financements nationaux et européens pour mener à bien cette recherche et notre laboratoire possède une expérience solide nécessaire pour mener à bien ce projet.

4488. Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme et reste le plus mortel malgré des progrès thérapeutiques basés sur la chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. Ce cancer regroupe plusieurs entités qui varient sur le plan clinique et biologique d'une patiente à l'autre notamment en termes de réponse à un traitement donné. L'évolution parfois très défavorable de la maladie est liée à l'apparition de métastases résistant aux traitements actuels. La réponse immunitaire et le microenvironnement tumoral sont 2 éléments importants dans la réponse de la tumeur aux traitements et déterminants dans leur efficacité.

Notre projet vise à modéliser l'évolution d'un cancer mammaire dans un modèle murin immunocompétent ou non pour tester l'efficacité de nouvelles molécules antitumorales. Il a pour objectif de valider des cibles thérapeutiques anticancéreuses en prenant en compte l'évolution de la réponse immunitaire anti-tumorale qui peut survenir en cours de traitement et la présence de cellules annexes présentes dans la tumeur comme les fibroblastes ou les cellules endothéliales qui ne sont pas cancéreuses mais qui participent au développement de la tumeur. Notre projet est basé sur l'utilisation de la lignée 4T1 qui est une lignée cellulaire murine mammaire ayant la capacité de métastaser spontanément vers des sites identiques à ceux observés chez les patientes. Une version génétiquement modifiée pour l'expression de la luciférase (4T1-Luc2, lignée commercialement disponible) permet de localiser les cellules cancéreuses dans la souris vivante par imagerie à bioluminescence aussi bien sur le site primitif (au niveau de la glande mammaire où les cellules cancéreuses sont injectées) qu'au niveau des métastases. De plus, l'utilisation de souris possédant un système immunitaire soit efficace (comme c'est le cas chez les patientes) soit déficient, selon la souche murine utilisée, permet d'évaluer le rôle du système immunitaire dans la réponse de la tumeur à un traitement donné. Enfin l'injection simultanée de la lignée 4T1-Luc2 avec des cellules du microenvironnement, permettra l'analyse de leur rôle dans l'évolution de la tumeur et de sa réponse aux traitements. Les tests réalisés in vivo se déroulent après une étude préliminaire sur les cellules en culture in vitro pour évaluer la sensibilité ou résistance de celles-ci à un traitement donné. Ce modèle préclinique, qui permet une étude cinétique de l'efficacité des traitements aussi bien au niveau local (glande mammaire) que des métastases, est une étape précieuse pour l'évaluation préclinique de nouveaux traitements à visée anticancéreuse et constitue un modèle particulièrement approprié pour l'étude des cancers du sein métastatiques qui posent encore des problèmes thérapeutiques majeurs.

Le projet se déroulera en 3 phases :

1) Evaluation de la réponse du modèle 4T1 à un traitement donné.

Cette étape consiste à injecter des cellules de la lignée 4T1 exprimant la luciférase cultivée in vitro, au niveau de la glande mammaire de souris immunocompétentes. Ce modèle permet de suivre l'évolution d'un cancer mammaire chez la souris à la fois pour mieux comprendre l'importance du microenvironnement, du système immunitaire et des mécanismes biologiques sous-jacents ainsi que d'identifier les cibles potentiellement intéressantes pour bloquer les processus de prolifération, dissémination, résistance aux traitements et enfin tester de nouveaux agents anticancéreux. Il est donc un atout majeur pour la recherche translationnelle en oncologie. Après une évaluation in vitro de la sensibilité ou résistance de la lignée 4T1 à un traitement donné, un suivi de la tumeur primitive localisée et de ses métastases sera réalisé pour évaluer le potentiel antitumoral du traitement appliqué. Une exérèse de cette tumeur mammaire sera éventuellement programmée pour permettre le suivi de métastases à plus long terme: cette intervention permettra de mimer la situation clinique la plus fréquente dans laquelle la tumeur primitive de la patiente est ôtée par chirurgie en première ligne de traitement.

2) Etude du rôle de la réponse immunitaire anti-tumorale au cours d'un traitement donné

La tumeur mammaire présente une hétérogénéité maintenant bien décrite, qui participent à l'évolution tumorale et modulent la réponse aux traitements. Traiter la tumeur par des agents qui sont capables de déclencher une mort immunogénique, c'est-à-dire capable de générer une réponse immunitaire anti-tumorale, est une stratégie thérapeutique particulièrement intéressante pour proposer des traitements plus efficaces à long terme. Le modèle 4T1 sur souris immunocompétentes permet d'évaluer cette réponse antitumorale. De manière intéressante une comparaison de l'évolution de la tumeur induite par l'injection de la lignée 4T1 chez des souris immunocompétentes ou chez des souris immunodéficientes permettra d'évaluer l'impact du système immunitaire dans l'évolution tumorale au cours du traitement appliqué.

3) Etude du rôle du microenvironnement tumoral au cours d'un traitement donné

Le microenvironnement non lymphocytaire, notamment fibroblastique et endothélial, soutient de manière importante, l'évolution de la tumeur, en assurant des contacts cellulaires/facteurs solubles nécessaires à la tumeur et/ou favorisant son oxygénation. Aussi

caractériser les interactions qui surviennent entre les cellules cancéreuses et les compartiments fibroblastiques et/ou endothéliaux qui composent la tumeur, est indispensable pour évaluer l'efficacité d'un traitement.

Nous respecterons la règle des 3R :

Je remplace les premiers tests de traitement par des essais ex vivo avant toute administration à la souris.

Je réduis le nombre d'animaux utilisés grâce à la formation du personnel aux outils statistiques, l'utilisation de protocoles validés et robustes issus de la bibliographie et la mutualisation des animaux et des techniques.

Je raffine en enrichissant l'habitat et en gérant le stress et la douleur des animaux.

1640 animaux maximum seront nécessaires sur 5 ans (annexe 4) :

- 1) Evaluation de la réponse du modèle 4T1 à un traitement donné : 580 souris immunocompétentes
- 2) Etude du rôle de la réponse immunitaire anti-tumorale au cours d'un traitement donné : 580 souris immunodéprimées
- 3) Etude du rôle du microenvironnement tumoral au cours d'un traitement donné : 480 souris immunodéprimées

4489. Les tumeurs osseuses sont des pathologies très douloureuses et difficiles à prendre en charge avec les thérapeutiques actuelles. Ces tumeurs peuvent être divisées en 2 groupes.

- Les tumeurs osseuses primitives sont des tumeurs qui ont pour origine le tissu osseux et il en existe 3 principaux types que sont l'ostéosarcome, le chondrosarcome et le sarcome d'Ewing. Parmi celles-ci, les plus fréquentes sont les ostéosarcomes qui sont des tumeurs malignes très agressives survenant généralement dans une population jeune et classées parmi les pathologies rares. Avec les thérapeutiques actuelles, la survie des patients à 5 ans est de 60-70% mais chute à 30% lorsque des métastases pulmonaires sont détectées.

- Les tumeurs osseuses secondaires sont des tumeurs qui ont pour origine des cellules tumorales d'un autre organe (principalement sein et prostate) qui migrent et métastasent au niveau des os. Les cancers du sein représentent les tumeurs malignes les plus fréquentes chez la femme et les métastases osseuses qui en dérivent sont détectées dans 80% des cas de cancer avancé. Ces métastases osseuses de carcinome mammaire sont majoritairement ostéolytiques et peuvent à terme augmenter les taux de morbidité et mortalité chez les patients.

Face à ces taux de survie très faibles, le développement de nouvelles thérapies pour ces tumeurs osseuses primitives ou secondaires apparaît nécessaire. Les recherches menées au sein du laboratoire ont pour but de développer des molécules bifonctionnelles possédant une partie HBP (hydroxybisphosphonate) et une partie anticancéreuse. De par la forte affinité de l'HBP pour le tissu osseux, ces molécules permettraient de vectoriser des anticancéreux afin d'augmenter les concentrations au niveau de l'os (et ainsi de traiter plus efficacement la tumeur) en diminuant les concentrations circulantes (responsables des effets secondaires des anticancéreux). L'activité anti-résorption osseuse de l'HBP pourrait également participer à l'effet antitumoral (en plus de celui exercé par l'anticancéreux) en bloquant le cercle vicieux entre ostéolyse et prolifération tumorale. En effet, le développement tumoral induit une destruction du tissu osseux. Lors de cette ostéolyse, différents facteurs sont libérés, qui pourront à leur tour favoriser la croissance des cellules tumorales.

Ce projet consiste à évaluer l'efficacité de molécules bifonctionnelles administrées chez des rongeurs développant une tumeur osseuse et pourra inclure un total de 134 rats et 1630 souris. Les molécules synthétisées sont dans un premier temps testées in vitro, du point de vue de leur cytotoxicité sur des lignées tumorales et de leur capacité de ciblage osseux. Les molécules intéressantes devront ensuite être étudiées chez l'animal afin d'évaluer leur impact dans un environnement tumoral complexe associant la prolifération tumorale et le remodelage osseux. Aucune méthode alternative ne permet de reproduire ce microenvironnement. De plus, l'effet de nos molécules sera dépendant de leur biodisponibilité et de leur facilité de clivage in vivo. L'objectif de ces études précliniques est de sélectionner les 2 ou 3 candidats les plus actifs démontrant une efficacité anti-tumorale supérieure aux thérapeutiques actuelles tout en diminuant la toxicité.

Ce projet est divisé en 3 étapes :

Procédure expérimentale n°1 : Les molécules retenues pour les tests in-vivo seront tout d'abord administrées à des souris saines à différentes concentrations dans le but de déterminer la dose maximale tolérable et de choisir la dose qui sera ensuite utilisée lors des tests d'activité anti-tumorale.

Procédure expérimentale n°2 : Différents modèles tumoraux devront être mis au point et validés. Ceux-ci pourront être induits par injection para-tibiale ou intra-tibiale pour les lignées tumorales. En injection intracardiaque, intra-prostatique ou dans la glande mammaire pour les lignées tumorales ayant un tropisme pour le tissu osseux. En intraveineux pour les lignées tumorales ayant un tropisme pour les poumons.

Procédure expérimentale n°3 : Les molécules seront alors évaluées sur leurs propriétés anti-tumorales dans un modèle d'ostéosarcome précédemment validé. Les critères d'efficacité incluent le versant anti-tumoral, anti-résorptif et anti-métastatique des molécules bifonctionnelles. Les protocoles incluront 10 animaux par groupe (10 souris non traitées, 10 souris traitées avec le traitement de référence et 10 souris traitées avec la molécule bifonctionnelle). Par soucis de respect de la règle des 3R, les tests pour plusieurs molécules seront regroupés afin de limiter le nombre d'animaux en utilisant un même groupe contrôle pour comparer plusieurs molécules bifonctionnelles. D'autre part, le minimum de molécules possible seront évaluées in-vivo et ce en ciblant les synthèses chimiques en fonction des premiers résultats et en sélectionnant le plus possible les molécules par les tests de cytotoxicité in-vitro. Le respect du bien-être animal passera par des conditions d'hébergement adéquates, un suivi quotidien des animaux, l'instauration de points limites pertinents et précoces et la mise en place de mesures adaptées (traitement antalgique ou euthanasie par des méthodes reconnues). Pour les molécules présentant un effet anti-tumoral dans ce premier modèle, un test d'efficacité sera conduit dans plusieurs autres modèles.

A terme, si le développement se poursuit dans de bonnes conditions, ces candidats devront ensuite faire l'objet d'études précliniques complémentaires réglementaires répondant aux guidelines ICH (International Council for Harmonisation), afin de

retenir une molécule qui pourra alors être administrée chez le patient dans le cadre des essais cliniques. L'objectif final étant de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques aux patients atteints d'ostéosarcome et autres tumeurs osseuses.

4490. Notre recherche est concentrée sur l'étude des cellules souches de l'intestin et du colon. Le colon est un organe qui est à l'origine du cancer colorectal. Nous étudions la voie de signalisation Notch, en raison de son rôle central dans le développement de cancers coliques. Nous avons récemment développé des souris transgéniques qui nous permettent d'évaluer l'expression de Notch dans les cellules souches normales et tumorales *in vivo*.

L'organisation générale, le développement et le fonctionnement de l'intestin et du colon que nous étudions sont très similaires chez la souris et chez l'homme. Le modèle souris est donc très utilisé dans la communauté scientifique afin d'étudier les mécanismes de la tumorigénèse.

Notre stratégie repose essentiellement sur l'analyse des tissus prélevés chez nos modèles murins transgéniques. Nous prévoyons d'étudier les tumeurs du colon de 20 souris au total, induites par traitement avec un carcinogène.

Les souris transgéniques qu'on utilisera dans cette expérience sont viables et ne présentent aucun problème de santé. Les tumeurs coliques restent localisées et seront prélevées conformément aux règles éthiques. Toutes les précautions seront prises pour réduire au minimum la souffrance et le stress des souris (surveillance continue des souris développant des tumeurs).

Le nombre de souris utilisé (20) est ajusté au plus bas mais compatible avec l'obtention de résultats statistiquement fiables. Pour réduire au minimum le nombre d'animaux et exploiter au mieux les prélèvements, des informations seront obtenues au niveau phénotypique, cellulaire et moléculaire à partir du même animal. La stratégie de croisement des souris transgéniques est optimisée afin d'obtenir les cohortes de souris appropriées.

Dans un souci de remplacement, nous concentrons nos efforts sur l'optimisation de cultures organotypiques *in vitro* pour analyser le comportement dynamique des cellules souches. Nous les utilisons en priorité par rapport à l'expérimentation *in vivo*. Toutefois, les « organoïdes » étant composés exclusivement de cellules épithéliales, les données obtenues *in vitro* devront être complétées par une analyse *in vivo* dans un environnement cellulaire physiologique. De plus, les animaux seront essentiels pour suivre les cellules souches cancéreuses au sein de la tumeur, étant donné qu'il n'existe actuellement aucun modèle *in vitro* qui puisse récapituler l'hétérogénéité cellulaire tumorale. L'ensemble de notre projet contribuera à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulant la fonction des cellules souches et de leur rôle dans le développement tumoral.

4491. L'acéruoplasminémie héréditaire (AH) est une pathologie génétique rare, liée à une mutation du gène céruloplasmine, entraînant une surcharge en fer générale touchant en particulier le foie et le cerveau. Elle est responsable d'une chute de la qualité de vie et entraîne une mort prématurée. Certaines caractéristiques des patients ne sont pas pleinement expliquées par le rôle biologique aujourd'hui attribué à la céruloplasmine. Nous voulons préciser les mécanismes en cause dans cette maladie en explorant : i) le rôle que pourrait jouer le fer non lié à la transferrine, une forme anormale de fer dans le sang parvenant au foie à partir du tube digestif et de la rate chez le rat, et ii) l'impact de l'acéruoplasminémie sur la biologie de la cellule du foie et sa réponse aux stimuli liés au fer. Le premier objectif sera poursuivi en étudiant chez le rat les différences des marqueurs du métabolisme du fer dans le sang parvenant au foie et le sang veineux de la circulation générale. Le second objectif fera appel à des cultures de cellules isolées de foies de rat, placées en culture et exposés à différents stimuli. Les résultats permettront d'avoir une meilleure compréhension de la maladie dans le but d'améliorer sa prise en charge.

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

-Réduire le nombre de rats en réalisant le protocole chez l'animal entier (rôle du fer non lié à la transferrine) sur le nombre d'animaux strictement nécessaire pour réaliser une analyse pertinente, et en utilisant des cultures de cellules hépatiques isolées à partir d'animaux ce qui permettra de réaliser des expériences en parallèle dans des conditions expérimentales différentes sur un même lot de cellules et donc de limiter le nombre d'animaux. Le nombre maximal d'animaux prévu est de 50.

-Raffiner, le protocole ne devrait pas entraîner de douleur significative, les animaux ne présentant pas de phénotype douloureux, les protocoles étant réalisés sur l'animal anesthésié.

-Remplacer : L'étude du rôle que joue le fer non lié à la transferrine dans le sang qui parvient au foie nécessite l'utilisation d'animaux. L'impact de stimuli liés au métabolisme du fer fera appel à des cultures de cellules isolées permettant de limiter le nombre d'animaux.

Les résultats permettront d'avoir une meilleure compréhension de la maladie dans le but d'améliorer sa prise en charge.

4492. La parodontite est une inflammation chronique d'origine infectieuse des tissus osseux et gingivaux supportant la dent. Elle a des conséquences sur la santé buccale mais aussi sur la santé générale. C'est une maladie très fréquente qui résulte d'une perturbation des interactions entre les bactéries normalement présentes dans la bouche (microbiote oral) et le sujet.

Le fer est un facteur essentiel pour la croissance des bactéries. Il est également un facteur de virulence pour plusieurs bactéries considérées comme pathogènes au cours de la parodontite, dont la bactérie *P. gingivalis*. Chez un sujet, des perturbations du métabolisme du fer pourraient donc être un facteur participant à l'apparition d'un déséquilibre de la flore présente dans la cavité buccale. Cette hypothèse est renforcée par les résultats d'une étude pilote réalisée chez des sujets présentant une surcharge en fer liée à une hémochromatose génétique.

Notre objectif est d'analyser, chez la souris, l'impact d'un excès de fer sur le microbiote oral et la maladie parodontale. Pour cela, nous utiliserons un modèle de parodontite, induite par l'exposition par badigeonnage oral de *P. gingivalis* chez des souris ayant une surcharge en fer de type hémochromatose génétique. Nous comparerons les paramètres cliniques de l'atteinte parodontale, de

l'excès du fer ainsi que la composition du microbiote oral entre des souris normales et hémochromatosiques, avec ou sans induction d'une parodontite.

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

- Réduire le nombre de souris en réalisant le protocole en deux phases successives et en étudiant le nombre minimal d'animaux permettant des études statistiques fiables. Le nombre total de souris étudiées sera de 72.
- Raffiner : le protocole ne devrait pas entraîner de douleur significative. Des points limites sont toutefois définis et seront observés en cas d'évènement inattendu. Les animaux seront anesthésiés avant le prélèvement.
- Remplacer : la place des relations entre un excès de fer et *P. gingivalis* dans le développement d'une parodontite ne peut être étudiée que dans un modèle physiologique intégré chez l'animal.

Cette étude permettra de préciser les mécanismes en cause dans le développement de la parodontite et pourrait représenter une base permettant d'identifier des marqueurs de risque et de proposer des recommandations pour le suivi et le traitement des patients.

4493. Les traitements pour les patients souffrant de glioblastome (GBM) incluent la chirurgie (pour un peu plus de 60% des cas) et la combinaison de radio- et chimiothérapie (principalement appliquée par l'utilisation de l'agent alkylant temozolomide). A l'heure actuelle il n'existe pas de modèle animal qui récapitule cette prise en charge ce qui rend la validation de nouvelles approches thérapeutiques plus compliquée.

Notre objectif est donc triple et nous visons à i) mettre au point un nouveau modèle de GBM chez la souris qui récapitule les différentes étapes de la prise en charge des patients, ii) valider ce modèle en établissant des parallèles entre les phénotypes observés chez l'homme et ceux observés chez la souris et enfin iii) utiliser ce modèle dans une application préclinique originale

Pour cela, nous utiliserons un modèle murin immunocompétent afin d'y implanter des cellules tumorales de souris (modèle syngénique), 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, à ce jour jamais réalisé, reproductible et mimant toutes les phases d'une radio-chimiothérapie pour l'homme 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 150 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.

4494. Le traitement des cancers s'est amélioré en raison d'une meilleure connaissance de l'oncogénèse et du développement de nouvelles thérapies ciblées, comme les anticorps monoclonaux. Dans le but de sélectionner les molécules les plus efficaces, les études précliniques représentent donc une étape importante. Différents modèles précliniques de cancers chez l'animal peuvent être utilisés. La réalisation de ces modèles constitue un processus à long terme comportant diverses étapes dont l'objectif final est de montrer qu'ils possèdent une haute valeur prédictive de l'efficacité thérapeutique et imitent fidèlement des situations observées en oncologie – telles que les résistances aux traitements, les métastases et les récurrences.

L'établissement d'un modèle animal fiable, reproductible et stable est une étape indispensable pour pouvoir réaliser des études précliniques notamment chez la souris. L'objectif de ce projet est mettre en place un modèle murin standardisé, reproductible et fiable afin de pouvoir évaluer in fine l'efficacité de molécules à visée thérapeutique chez l'homme. Nous utiliserons 48 souris réparties en 8 groupes de 6 souris. Dans les quatre premiers groupes, nous testerons le potentiel tumorigénique de notre lignée cellulaire en comparant la survie de souris injectées avec 4 quantités de cellules tumorales (4 groupes comportant 6 souris = 24 souris). Dans les 4 autres groupes, nous injecterons les cellules tumorales aux 4 quantités puis nous testerons l'efficacité d'un anticorps monoclonal à une dose définie, l'objectif est de visualiser si la survie des animaux est améliorée par le traitement avec cet anticorps (4 groupes comportant 6 souris = 24 souris).

Ce projet a été élaboré en prenant compte de la règle des 3R: l'utilisation d'un modèle murin est la seule approche permettant d'étudier le lien de causalité entre la survie des animaux et le nombre de cellules tumorales injectées ainsi que l'activité thérapeutique de notre anticorps monoclonal, il ne peut donc pas être remplacé (principe remplacement). Nous avons défini un nombre minimal d'animaux (principe de réduction). Les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'anxiété des animaux en assurant des soins et une médication appropriée (principe de raffinement).

4495. Chez la chèvre laitière, les systèmes d'alimentation basés sur le pâturage ont de nombreux avantages sur le plan économique pour l'éleveur, sur le plan environnemental pour la société, mais aussi sur le plan santé et bien-être des animaux. Pour avoir confiance, les éleveurs ont besoin de savoir combien les chèvres sont capables de manger d'herbe par jour, et dans quelles conditions, afin de bien gérer l'alimentation de leur troupeau. Il n'existe pas de méthode simple de mesure de l'ingestion individuelle des chèvres au pâturage. Ce projet a pour objectif de calibrer une méthode indirecte d'estimation de la quantité d'herbe ingérée individuelle des chèvres au pâturage.

Le projet consiste à nourrir des chèvres sur des rations à base d'herbe verte et de compléments alimentaires (céréales, foin) en proportion variable, de peser et d'analyser tous les aliments ingérés, de peser et d'analyser leurs fèces (crottes), afin d'établir une relation mathématique robuste entre la composition chimique des fèces et la digestibilité réelle de la ration. La quantité de fèces sera aussi mesurée par dilution de marqueurs de digestion (substances inertes non digestibles dosées au laboratoire, parfois présentes naturellement dans les aliments). Au total, sur l'ensemble du projet, 42 chèvres seront utilisées, chacune pendant une période de 2 mois maximum.

Différentes séries de mesures seront réalisées pour prendre en compte l'ensemble des conditions possibles d'élevage : différents types de prairies, différents âges de repousses des prairies, quantité et proportion variable d'herbe, de concentrés et de foin. Les chèvres seront en conditions contrôlées (alimentation à l'auge) pour mesurer par pesées l'ingestion et la digestibilité réelle, ce qui permet une bonne calibration des méthodes. Pour respecter la règle des 3R :

- Réduire : Réduction maximale du nombre de chèvres (n=6) utilisées par série par rapport au nombre de situations alimentaires testées à chaque fois (n=3), avec un schéma expérimental puissant (carré latin) ;
- Raffinement Dispositif expérimental spécialement conçu avec des box « doubles » permettant des mesures individuelles et que chaque chèvre puisse voir, sentir et rentrer en contact direct avec une congénère,
- Remplacer : La calibration des mesures d'ingestion et de digestion, pour application ensuite sur des animaux au pâturage, ne peut se faire que sur animaux (mesure in vivo, aucune possibilité d'étude in vitro).

4496. La mucoviscidose est une maladie génétique qui induit un défaut d'efflux chlorure lié à la déficience du gène qui code pour une protéine appelée CFTR et la principale cause de morbidité et de mortalité est liée à une obstruction des voies aériennes. A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement efficace pour tous les patients et d'autres stratégies thérapeutiques doivent être envisagées. Une solution proposée est d'activer d'autres canaux chlorure qui compenseraient le défaut à CFTR et le seul autre canal bien caractérisé est TMEM16a ou ANO1. Une activation de ce canal permettrait une restauration des efflux chlorure de façon indépendante à la protéine CFTR.

Il a été montré qu'il était possible d'activer ANO1 par une molécule thérapeutique en agissant sur des petits ARNs sur des cellules des voies aériennes. Ces résultats nous ont conduits à effectuer une étude pilote chez la souris dans laquelle nous avons pu mettre en évidence que la technique d'administration intranasale était bien tolérée et qu'elle se révélait active chez la souris au niveau de la trachée sans entraîner de conséquences négatives observables (mortalité, comportement, poids...).

Des travaux récents du laboratoire ont montré in vitro que notre molécule était également active sur des cellules d'autres organes (os, pancréas...) ce qui nous amène à penser qu'une administration systémique pourrait être envisagée pour corriger l'ensemble des problèmes liés à la mucoviscidose. Les souris atteintes de mucoviscidose meurent au moment du sevrage d'une obstruction digestive qu'il est possible de compenser en leur donnant un laxatif. Le projet a pour but de traiter les souris avant le sevrage et de voir si on est capable de diminuer la mortalité.

Type d'animaux : 129.Cftrtm1Eur

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un nombre maximal de 12 souris pour une durée maximale de 1 an. Pour ce projet 12 souris adultes serviront à l'expérimentation avec un lot de 6 souris contrôles et un lot de 6 souris porteuses de la mutation. Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal. Pour la détermination du nombre de souris requis minimal un test de puissance a été effectué en se basant sur des travaux précédents et sur le minimum d'effet que l'on veut obtenir (50%) avec un risque de 90 avec une valeur alpha de 5% (<http://powerandsamplesize.com/Calculators/Compare-2-Means/2-Sample-Equality>).

Le nombre de 12 animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrits au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ».

Remplacement-Réduction-Raffinement :

Dans le cadre de cette étude, nous utiliserons des techniques déjà établies et publiées qui permettent de limiter le nombre de souris pour cette étude aux expériences indispensables permettant d'avoir assez de données pour une analyse statistique. Afin de limiter au maximum le recours aux animaux, nous avons effectué de nombreuses expériences in vitro et ex vivo (cultures de cellules issues de patients) qui ont montré des résultats positifs et qui sont en cours de publication. Malgré cela le recours à l'expérimentation animale est indispensable pour voir les effets sur un organisme vivant entier. De plus, grâce à notre projet précédent sur la souris qui a reçu les autorisations nécessaires, nous savons que notre molécule n'a pas de conséquence sur la perte de poids ou sur son comportement lors d'une administration intranasale. Des travaux de la littérature utilisant des molécules similaires ont montré que l'administration systémique était possible chez la souris sans induire d'effets secondaires même à de plus fortes doses que celle que nous voulons utiliser.

Cette étude a pour but de déterminer si la molécule à la concentration thérapeutique envisagée a un effet toxique sur l'animal et si la molécule a l'effet escompté sur l'activité chlore au niveau trachéale.

Une prise de poids et une évaluation comportementale seront effectuées quotidiennement pour vérifier le bon état sanitaire des souris de la réception à la mise à mort.

4497. Des millions d'êtres humains souffrent de pathologies psychiatriques telles que la dépression, l'anxiété, ou les troubles bipolaires. Ces pathologies sont fréquemment associées à des troubles du sommeil et en particulier à l'insomnie. La stigmatisation et le coût social de ces maladies sont énormes. Ces pathologies sont associées à des dysfonctionnements de certaines zones du cerveau régulatrices de l'humeur et du sommeil.

Les neurones du cerveau communiquent entre eux par une combinaison de signaux électriques et de messagers chimiques. Ces messagers chimiques, ou neurotransmetteurs, sont libérés par des neurones spécifiques dans des régions précises du cerveau. On a longtemps pensé qu'un neurone n'utilisait qu'un seul neurotransmetteur. Nous avons récemment constaté que, de façon surprenante, certaines sous-populations neuronales étaient capables d'utiliser deux neurotransmetteurs distincts pour communiquer.

Notre projet de recherche vise à étudier l'impact de ce bilinguisme neuronal sur la régulation du sommeil et de l'humeur. Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons des modèles murins. En effet, les souris génétiquement modifiées permettent d'étudier le rôle de gènes particuliers dans la physiopathologie des troubles psychiatriques et des anomalies du sommeil qui les accompagne. En particulier, des souris mutantes seront étudiées par des approches associant biologie moléculaire, comportement et physiologie. À l'heure actuelle, ces approches permettent d'aborder de façon performante et informative les pathologies psychiatriques. En effet, de nombreux aspects des troubles du sommeil et de l'humeur ont pu être modélisés chez le rongeur.

Cette caractérisation moléculaire, comportementale et physiologique de plusieurs lignées de souris mutantes nécessitera l'utilisation d'un total de 1780 souris sur une période de 5 ans. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, le design des expériences comportementales et des expériences de physiologie a été calculé au plus juste, en tenant compte de la puissance des analyses statistiques. Dans la mesure du possible, le remplacement des animaux par des méthodes alternatives (modèles mathématiques, méthodes *in vitro* ...) est préféré. Toutefois, vu la nature de nos recherches, l'utilisation de rongeurs reste nécessaire. Enfin, le raffinement des méthodes expérimentales visant à réduire à son maximum la souffrance animale est mise en œuvre grâce à l'utilisation d'anesthésiques et d'antalgiques appropriés lors de chirurgies, à la mise en place de soins post-opératoires et de points limites clairement établis. L'ensemble des expériences sont menées par des personnels hautement qualifiés dans des locaux d'hébergement respectant les standards en vigueur.

4498. L'hypercholestérolémie est le facteur de risque majeur de l'athérosclérose, la première cause de mortalité des pays occidentaux. Elle est due à l'augmentation des LDL (lipoprotéines de faible densité). Les patients sont traités efficacement avec des statines, qui améliorent le catabolisme des LDL via le récepteur des LDL et diminuent la concentration plasmatique du cholestérol. Toutefois, un risque résiduel d'athérosclérose persiste dans 20% des cas malgré l'administration des statines. À l'inverse des LDL, les HDL (lipoprotéines de haute densité) exercent un rôle athéro-protecteur bien documenté. Les effets métaboliques des HDL sont essentiellement liés à leurs deux protéines principales, appelées apolipoprotéines (apo), l'apo AI et l'apo AII. Le rôle anti-athérogène de l'apo AI a été bien établi, alors que celui de l'apo AII a été controversé initialement. Toutefois, dès 1992, trois grandes études cliniques ont établi que la concentration plasmatique de l'apo AII était aussi corrélée négativement avec la survenue d'athérosclérose. Plusieurs études sur modèles transgéniques murins ont confirmé le rôle athéroprotecteur de l'apo AII humaine. Actuellement, les HDL et l'apo AI sont des nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter les maladies cardiovasculaires, et certaines études sont au stade clinique. Toutefois, l'apo AI est une protéine de grande taille (28 000 Da) et le coût de sa production est très élevé. Notre projet de recherche est de proposer comme traitement de l'athérosclérose l'apo AII, de plus petite taille (8 500 Da pour le monomère). En créant des souris transgéniques, nous avons montré le rôle clé de l'apo AII qui augmente la stabilité et les effets anti-oxydants des HDL. Toutefois, une concentration plasmatique trop forte d'apo AII humaine augmente les triglycérides plasmatiques en période post-prandiale. Étant donné que la forte hydrophobicité de l'apo A-II sous-tend ses effets métaboliques, nous avons voulu optimiser les propriétés athéroprotectrices de l'apo AII humaine en créant une forme mutée qui ne provoquerait pas d'hypertriglycéridémie tout en maintenant ses propriétés bénéfiques sur les HDL. Le nouveau variant de l'apo AII humaine est plus hydrophile que l'apo AII normale et a été appelé apo AII "hydrophile". Nous avons créé deux lignées de souris transgéniques pour l'apo AII "hydrophile", par transgénèse additive classique où l'insertion du transgène se fait de manière aléatoire dans le génome de la souris. Comme l'expression du transgène dépend du site d'insertion, il faut au minimum 2 lignées transgéniques pour vérifier que les modifications du métabolisme des lipoprotéines sont dues à l'expression du transgène. Après transfert d'embryons, ces lignées sont élevées actuellement dans la zone EOPS de l'animalerie. Notre projet actuel est d'étudier le métabolisme des lipoprotéines sur les 2 lignées E et L qui expriment l'apo AII humaine "hydrophile" à des taux différents. Nous rechercherons si l'apo AII "hydrophile" a des propriétés athéroprotectrices supérieures à celles de l'apo AII normale. Nous prélèverons le sang des souris E et L et ultracentrifugerons leur sérum pour préparer les différentes fractions de lipoprotéines et analyser leur composition. Nous vérifierons que l'apoAII "hydrophile", même à forte concentration plasmatique, n'induit pas d'hypertriglycéridémie mais augmente significativement la concentration des HDL.

Pour rechercher un effet dose réponse de l'apo AII "hydrophile" sur le métabolisme des lipoprotéines, nous utiliserons chacune des lignées à l'état hémizygote ou homozygote ; d'où 2 groupes par lignée (E et L, hémizygotés et homozygotés). Pour obtenir une statistique descriptive valable, nous reproduirons les mesures à partir de 4 pools de chaque groupe. Pour permettre toutes les analyses prévues, chaque pool contiendra 8 ml de sérum et sera constitué des sérums de 16 souris. Les résultats obtenus seront comparés à ceux déjà obtenus et publiés à partir de nos 3 lignées exprimant l'apo AII humaine normale. Il y aura donc 16 souris/pool x 4 pools de sang x 4 groupes (lignées E et L, hémizygotés et homozygotés) = 256 souris au total.

Les lipoprotéines sont des macromolécules qui circulent dans le sang des mammifères et apportent des lipides à tous les tissus ; notre étude ne peut donc pas être réalisée sur des cellules ou des modèles non mammifères ; le Remplacement n'est pas possible. La Réduction du nombre des animaux est obtenue par le réemploi de résultats obtenus précédemment sur nos autres souris transgéniques exprimant l'apoAII normale : ainsi nous pourrions comparer la triglycéridémie et la concentration plasmatique des HDL en présence de l'apoAII "hydrophile" versus l'apoAII normale. Ce réemploi est rendu possible par la bonne reproductibilité des procédures : élevage, prélèvement de sang et techniques de biochimie des lipoprotéines. Le Raffinement des procédures est assuré par la bonne gestion de l'élevage : nos souris se reproduisant très bien, nous réalisons peu d'accouplements et utiliserons toutes les souris positives pour le transgène. Les points limites traditionnels sont respectés ; le bien-être des animaux est suivi quotidiennement par le personnel qualifié de l'animal ; la souris qui présenterait des signes comportementaux anormaux (réduction de l'appétit, dos voûté, poils hérissés, isolement et indifférence par rapport au milieu extérieur) sera rapidement euthanasiée. Toutes nos souris, transgéniques ou non, seront tuées avant six mois d'âge et donc avant de présenter des pathologies liées au vieillissement.

Si nos expériences montrent que l'apoAII "hydrophile" augmente les HDL sans provoquer d'hypertriglycéridémie, nous déposerons un dossier de valorisation en proposant l'administration d'apo AII "hydrophile" comme nouveau traitement de l'athérosclérose. Etant donné que l'apo AII "hydrophile" a le même petit poids moléculaire que l'apo AII normale, le coût de sa production sera réduit, rendant donc sa production plus facilement réalisable. Par ailleurs, l'apo A-IIh "hydrophile" n'a jamais été publié et est donc brevetable.

4499. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont largement utilisés comme antalgiques et/ou antipyrétiques, y compris hors prescription médicale puisque certains sont en vente libre. Il s'agit d'une des classes médicamenteuses les plus vendues et consommées en France. Or, leur rôle aggravant dans les infections bactériennes chez l'homme est discuté mais n'est pas clairement établi. Les AINS pourraient être responsables d'évolutions défavorables, notamment vers des formes nécrosantes et/ou disséminées, en cas d'administration de manière concomitante à une infection bactérienne. Néanmoins, les résultats sont discordants dans la littérature, venant contre-balancer l'impression clinique qui serait celle d'un impact défavorable.

Ainsi, sur le plan clinique, un sur-risque de dermohypodermite bactérienne nécrosante est reconnu en pédiatrie. Des études ont également montré des taux de prises d'AINS élevés chez les patients atteints d'empyème pleural ou d'abcès amygdalien. Une récente étude a montré que, dans une population de 41 patients hospitalisés déclarés à la pharmacovigilance, la classification habituelle du degré de sévérité septique était mise en défaut pour prédire la survenue des complications infectieuses observées, notamment l'abcédation et la dissémination septique à distance du foyer d'infection initial. Inversement, une étude cas contrôle ne retrouvait pas de différence significative en terme d'exposition aux AINS entre deux groupes de patients, l'un en sepsis sévère ou choc septique et l'autre en simple sepsis .

Sur le plan expérimental, il a été décrit dans un modèle murin de myonécrose post traumatique à streptocoque du groupe A un effet facilitateur de la pénétration du germe dans le muscle en cas d'exposition à du ketorolac trométhamine (AINS). Une autre étude sur un modèle murin d'infection des parties molles à *Streptococcus pyogenes*, il était décrit une surmortalité dans le groupe traité par Ibuprofène vs non traité. Les dommages tissulaires étaient également plus marqués, avec des taux d'IL6 et de TNF alpha augmentés dans le groupe AINS.

Dans un modèle de cellulite cervicale à *Peptostreptococcus* chez le rat ne montraient pas de différence significative en termes de densité bactérienne tissulaire entre un groupe traité par diclofénac et un groupe contrôle. Aucune thrombophlébite était décrite dans cette étude. De même, dans un modèle d'ostéomyélite à *Staphylococcus aureus* chez le rat, une étude ancienne révélait l'absence de différence sur la quantité de germes retrouvés à J6 et J12 de l'infection mais un taux de prostaglandines E2 réduit dans le groupe traité par ibuprofène. Enfin, des études anciennes ont montré un effet protecteur dans des modèles d'infection à *Pseudomonas aeruginosa* avec l'Ibuprofène et le Piroxicam

Les modèles expérimentaux animaux montrent donc des résultats discordants en terme d'effet des AINS avec par contre toujours des effets immunitaires notables.

Une hétérogénéité des modèles expérimentaux d'infection, des bactéries, et du type d'AINS utilisés, rend toutefois l'interprétation de ces résultats difficile.

Le projet :

Notre hypothèse est que la réponse immunitaire innée au sepsis est modifiée selon la chronologie de prise des AINS par rapport à l'infection – selon le fait que ces médicaments sont pris avant ou après apparition du sepsis. Ce qui expliquerait les résultats discordants constatés dans la littérature.

Notre étude a donc pour but d'étudier l'impact de l'administration des AINS sur la réponse immunitaire innée au sepsis à *Staphylococcus aureus* dans un modèle murin, selon que la prise d'anti-inflammatoire a lieu avant apparition du sepsis ou après apparition du sepsis.

Pour cette étude 64 souris C57BL/6JRj vont être utilisées, ainsi que 728 souris Swiss femelles. Dans un premier temps, nous étudierons la réactivité des PBMC et l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité sur les cellules dendritiques. La seconde étude consistera à l'étude de l'impact des AINS sur la réponse immunitaire innée.

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. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude.

4500. Les vaccins permettent de se protéger contre un micro-organisme infectieux. Souvent, ce sont les mêmes virus ou bactéries qui sont utilisés, après un traitement ayant détruit leurs capacités infectieuses, mais ils demeurent des microorganismes entiers et

pourraient éventuellement retrouver leur capacité pathogène. Pour limiter les risques, on développe des vaccins ne contenant que certaines protéines tirées du micro-organisme, ils sont bien tolérés mais ont souvent une efficacité limitée et pour induire une réponse immunitaire plus complète et plus durable, ils nécessitent l'addition de matériel, appelé adjuvant, tels que les sels d'aluminium. Assez peu efficaces seuls pour induire une immunité complète, des systèmes adjuvants contenant plus d'un composant pourraient être une alternative pour améliorer la réponse immunitaire. Nous avons montré in vitro que certaines molécules appelées lipides cationiques sont capables d'apporter cette amélioration. Nous souhaitons maintenant étudier leur capacité, testées seuls ou en mélange, à augmenter la force et l'amplitude de la réponse immunitaire dans un organisme vivant. Nous utiliserons un modèle classique de vaccination protéique, (injection d'ovalbumine à des souris et détermination par prélèvements sanguins du titre en anticorps induit). L'injection de mélanges de lipides a pour but d'étudier l'existence éventuelle d'un effet synergique. Cette étude ne peut se faire que sur animal puisque l'on cherche à induire une réponse immunitaire complète, ce qu'aucun système in vitro ne permet de faire. 180 souris seront nécessaires pour cette première étude. Une autre approche beaucoup plus récente pour éviter l'utilisation de micro-organismes entiers pour des vaccins est la vaccination génétique qui consiste à administrer à l'organisme vivant une séquence de matériel génétique (ADN ou ARN) qui lui permettra de produire lui-même la protéine immunogène. Cette protéine est exactement la même que celle qui aurait été utilisée dans un vaccin protéique comme décrit ci-dessus. Il en résultera une réponse immunitaire plus complète, cependant l'efficacité de cette approche dépend de la quantité de matériel génétique entrant dans les cellules de l'organisme vivant et des composés ajoutés. La vaccination génétique est déjà utilisée à des stades avancés en essai clinique, en utilisant une méthode physique de transfert de gènes : l'électroporation. Nous envisageons dans la deuxième partie de ce projet de déterminer la réponse immunitaire induite par deux types de composés:

- des lipides cationiques (de la même classe chimique que ceux décrits dans la première partie du projet, mais de structure différente). Nous sommes en train de breveter l'association de ces lipides cationiques avec le matériel génétique, l'ensemble constituant une "formulation".

- des molécules extraites du liquide biliaire, et dont nous avons déjà montré la capacité à faire entrer dans les cellules du matériel génétique. Les animaux seront traités par trois injections intramusculaires, sous cutanées ou intradermiques et du sang sera prélevé régulièrement sous anesthésie générale. 176 souris et 4 lapins seront nécessaires pour cette deuxième étude.

Pour ces deux études, nous avons déjà identifié des composés par des tests in vitro, et démontré leur efficacité, ce qui a remplacé dans une large mesure l'expérimentation animale. Cela nous permet de réduire le plus possible le nombre d'animaux nécessaires à cette étude. Dans un souci de raffinement, nous veillerons en continu au bien-être des animaux par l'ajout d'enrichissement, une surveillance quotidienne. Les procédures expérimentales ne comprennent que des injections et des prélèvements sanguins, nous n'attendons pas de dommage particulier. Les avantages attendus étant d'obtenir des méthodes de vaccination plus efficaces que les méthodes actuelles. Le nombre maximum d'animaux impliqués dans ce projet est de 356 souris et 4 lapins.