



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

Résumés non techniques des projets autorisés (45)

4501. Le gliome pontique diffus intrinsèque (DIPG) est un cancer pédiatrique dévastateur non résecable du système nerveux central (SNC) et sans traitement. Seule la radiothérapie est aujourd'hui proposée en palliatif. La raison la plus probable de cette résistance médicamenteuse est la difficulté d'accès des médicaments à la tumeur, très probablement parce que le DIPG se développe dans le SNC de manière diffuse et en conservant une barrière hémato-encéphalique (BHE) étanche.

Un modèle animal de DIPG peut se produire à partir d'une xéno greffe de cellules cultivées de DIPG issues de biopsies de patients. Ce modèle de cancer reproduit à la fois les mutations génétiques retrouvées dans les cellules cancéreuses chez ces patients et l'échec d'un traitement médicamenteux, ce dernier étant pourtant actif sur le DIPG in vitro. Le but de notre projet est de caractériser la BHE dans ce modèle de rat DIPG par des approches fonctionnelle (pharmacocinétique) et moléculaire. On souhaite ainsi développer de meilleurs médicaments candidats traversant plus efficacement la BHE et se distribuant davantage dans le pont cérébral et dans les autres structures du SNC, où des localisations tumorales secondaires se développent (surtout après radiothérapie).

Des rats « nude » serviront de modèle animal permettant de mimer cette pathologie. Des rats témoins (non-greffés) et des rats xéno greffés avec les cellules tumorales seront soit utilisés pour l'étude moléculaire de la BHE, soit utilisés pour l'étude pharmacocinétique afin d'évaluer les fonctions de transport de l'irinotecan et l'intégrité de la BHE.

Pour l'ensemble de ces études, le nombre d'animaux estimé est de 120.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum : le même animal servira à l'étude de plusieurs régions cérébrales pour les études fonctionnelle et moléculaire. La souffrance et l'angoisse infligées aux animaux seront limitées au maximum, une surveillance journalière et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Une meilleure compréhension de la physiopathologie de la BHE au sein de ce cancer cérébral DIPG d'une part et l'identification d'une cible à la BHE pour développer de nouvelles alternatives pharmacologiques traversant efficacement la BHE d'autre part, devraient avoir un impact significatif dans les futures alternatives thérapeutiques pour le DIPG.

4502. La menace d'accouchement prématuré (MAP) est un problème majeur de Santé Publique car elle représente la première cause de mortalité néonatale et d'hospitalisation en cours de grossesse. Les traitements utilisés lors de la menace d'accouchement prématuré appelés tocolytiques agissent en s'opposant aux contractions utérines. Néanmoins, leur efficacité est limitée car ils ne permettent de retarder l'accouchement qu'au maximum de 48 heures. De plus, ils sont à l'origine de nombreux effets indésirables, tant chez la mère que chez le fœtus.

Il est donc impératif de développer de nouveaux traitements plus efficaces et moins toxiques. Ceci passe par la compréhension des mécanismes impliqués dans la mise en route du travail, encore mal connus, et par l'identification de nouvelles cibles. Nous avons au préalable validé notre concept in vitro, et identifié cette nouvelle cible qui serait impliquée dans la mise en route du travail. Maintenant, nous voulons confirmer ces résultats par l'expérimentation animale en utilisant des souris. Nous utiliserons des souris dont le phénotype est non dommageable. L'étude de la menace d'accouchement prématuré nécessite l'utilisation de mammifères qui ont une durée de gestation courte et connue.

Nous souhaitons donc 1) confirmer l'implication de cette cible dans l'accouchement prématuré et 2) tester une molécule qui pourrait être utilisée comme médicament dans cette pathologie. La procédure sera réalisée par un personnel expérimenté et est celle qui cause le moins de dommages durables, de douleur, de souffrance et d'angoisse en étant susceptibles de donner les résultats les plus satisfaisants. Des mesures seront prises pour améliorer le bien-être des animaux. Les souris gestantes seront hébergées deux par deux pour leur permettre d'être au calme. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies *ad libitum*. De l'enrichissement sera apporté aux souris gestantes afin leur permettre de former des nids. Le nombre d'animaux nécessaire à l'étude est de 52 souris et correspondra au nombre permettant une étude statistique valable avec le test non paramétrique adapté aux petits échantillons (<10) de Mann-Whitney.

Grâce à cette expérience, nous aurons une meilleure compréhension des mécanismes de l'accouchement et nous pourrons ainsi contribuer au développement d'un traitement de la menace d'accouchement prématuré.

4503. Depuis plus de deux décennies, différentes études ont montré que le glucose améliore les capacités de mémorisation de l'Homme. Une étude a montré une amélioration des capacités d'apprentissage d'étudiants suite à la prise d'une mixture contenant

450g de sucre. Quelques années plus tard, il a été montré, chez la souris, que l'injection intrapéritonéale de glucose immédiatement après un apprentissage améliore sa mémorisation.

Dans l'équipe, nous avons un modèle murin mimant les caractéristiques (symptômes) de la maladie d'Alzheimer (MA) humaine: la souris *Nxnl2*^{-/-}. Cette souris présente un déficit mnésique à 2 mois et une apparition d'agrégats de protéine Tau dans le cerveau à 18 mois.

Dans ce projet, nous voulons déterminer si l'administration de glucose à nos souris *Nxnl2*^{-/-} permet de prévenir l'apparition du déficit mnésique observé chez ces animaux à 2 mois. Dans un premier temps, nous étudierons la cinétique du taux de glucose dans le liquide céphalorachidien (LCR) suite à son administration par voie intrapéritonéale (30 mg/kg). Dans un second temps, les souris passeront des tests de comportement et de mémoire suite à cette administration. Au total, 105 souris seront nécessaires à cette étude incluant les contrôles.

La cinétique du taux de glucose dans le LCR ainsi que les tests comportementaux et de mémoire, ne peuvent être réalisés *in vitro*. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les conditions d'hébergement seront adaptées au modèle. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

4504. Il est de nos jours soupçonné que la lumière (notamment celle de bande spectrale bleue) pourrait avoir un rôle délétère dans l'épidémiologie et l'évolution des symptômes de la sécheresse oculaire. En effet, la photophobie est un symptôme fréquent de la maladie de l'œil sec. De plus, de nombreux patients atteints par cette pathologie se plaignent d'une sensibilité accrue à la lumière lors de travail sur les écrans et/ou dans des endroits illuminés par de la lumière artificielle (tubes fluorescents, LEDs). Il en résulte alors une sensation de gêne oculaire accrue, voire une douleur. La douleur oculaire est l'un des premiers motifs de consultation en ophtalmologie. Le fait qu'aujourd'hui, ces lumières artificielles nous entourent presque partout a aggravé la situation clinique de ces patients souffrant de sécheresse oculaire.

Les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de ces douleurs demeurent de nos jours encore très mal connus.

L'objectif de ce travail est d'étudier les mécanismes de phototoxicité liés à la lumière bleue dans la pathogénèse de la sécheresse oculaire. Nous exposerons des souris sur lesquels nous avons préalablement induit une sécheresse oculaire à différentes bandes spectrales de lumière (bleue et jaune). Les effets de la lumière seront évalués par des tests cliniques (comme ceux utilisés chez l'Homme). Des analyses complémentaires de biologie moléculaire, biochimie, et histologie seront réalisées après euthanasie des animaux.

Ce programme de recherche nécessitera au total l'utilisation de 512 souris sauvages adultes (*C57Bl6/J*).

Il n'existe pas, à ce jour, de systèmes *in vitro* pouvant mimer la pathologie étudiée. L'ensemble des animaux impliqués dans ce projet sera examiné quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. Les animaux disposeront d'un enrichissement dans leur cage (bâton à ronger et maison en carton). Enfin, le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

4505. Les Rétinopathies Pigmentaires (RP) touchent environ une personne sur 4000 dans les pays occidentaux, et se caractérisent par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet puis à cône, entraînant une diminution progressive de la vision puis une cécité. Dans ces dernières études, l'équipe a isolé d'une plante, *Uvaria Chamae*, un extrait actif (qu'elle a appelé la *geralexin*) qui a un effet protecteur sur les photorécepteurs à cône par stimulation de la glycolyse aérobie. Des expériences qu'elle a menées, ont montré que cette stimulation passe par des mécanismes indépendants de celui actuellement connu (couple *RdCVF/Bsg1*). De ce fait, l'équipe a cherché à identifier un gène codant pour une enzyme glycolytique et exprimé dans les photorécepteurs. Par criblage génétique, l'équipe a identifié la *PFKFB2* comme pouvant être l'enzyme cinétiquement déterminante dans le mécanisme de glycolyse évoqué ci-dessus.

Afin de confirmer le rôle de *PFKFB2* dans les mécanismes de protection des photorécepteurs à cône, nous allons étudier le phénotype d'animaux déficient en *PFKFB2* (souris transgéniques). Si nous obtenons le phénotype attendu (dégénérescence des photorécepteurs) nous tenterons de restaurer la vision de ces animaux par injection de *PFKFB2* à l'aide d'outils viraux.

L'ensemble de ses expérimentations nous permettra de confirmer le rôle de *PFKFB2* dans les mécanismes de glycolyse initiés par la *geralexin*.

Au total 120 animaux seront nécessaires à cette étude (contrôles inclus). L'activité visuelle des animaux sera évaluée par un test optocinétique et un électrorétinogramme. En fin de projet, après euthanasie de l'animal, les rétines seront récupérées pour analyses histologiques.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les conditions d'hébergement seront adaptées au modèle animal. Le nombre d'animaux utilisé dans ce projet est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

4506. Les amyloses sont des maladies héréditaires rares avec une issue fatale. Elles sont dues à une protéine mutée circulante, formant des dépôts amyloïdes dans les vaisseaux, ce qui perturbe le fonctionnement des organes. Les décès des patients vers 40-45 ans sont dus principalement à une insuffisance rénale ou, plus rarement, à une insuffisance cardiaque. Actuellement, il n'existe pas

de traitement pour supprimer et/ou diminuer les dépôts amyloïdes et enrayer la maladie. Précédemment, nous avons créé un modèle de souris transgéniques avec une amylose héréditaire dans l'objectif de provoquer une insuffisance rénale et d'étudier la relation bien établie entre l'insuffisance rénale et l'athérosclérose. Nous avons généré trois lignées de souris transgéniques (F, K et Y), et les avons croisées avec une lignée déficiente pour la protéine normale (lignée KOAII). Ce premier projet, intitulé "Etude de l'installation d'une dyslipidémie pro-athérogène durant la progression d'une insuffisance rénale" avait obtenu une autorisation de projet qui s'est terminée en décembre 2013. Ces souris transgéniques se sont avérées, au-delà de nos espérances, un excellent modèle d'amylose héréditaire en tous points semblable à la pathologie humaine. Elles sont le seul modèle transgénique d'amylose qui présente les mêmes caractéristiques que les patients : l'amylose se développe spontanément dès l'âge de 3 mois dans tous les tissus, mais elle est surtout importante dans le rein, le foie, le cœur et la rate. Par ailleurs, nos souris peuvent aussi être utilisées pour la mise au point de méthodes de détection des dépôts amyloïdes par des techniques d'imagerie non-invasives. Nous avons donc maintenu ces souris en élevage dans la zone EOPS de notre animalerie avec l'objectif de les valoriser auprès d'industriels qui mettront au point et testeront de nouveaux traitements sur nos souris. Nous avons déposé deux dossiers de valorisation pour l'amylose et pour l'insuffisance rénale. En effet, l'insuffisance rénale chez l'homme est une maladie grave qui prédispose à l'athérosclérose, la première cause de mortalité dans les pays occidentaux. Les modèles animaux d'insuffisance rénale sont donc précieux pour étudier cette pathologie très grave. A ce jour, les modèles de souris transgéniques disponibles concernent l'insuffisance rénale dans le diabète, ce qui complique l'interprétation des résultats. En revanche, nos souris ont un métabolisme normal, naissent avec des reins normaux et développent progressivement l'insuffisance rénale, ce qui permettra d'étudier tous les dérèglements mis en jeu dans cette maladie.

Cette demande d'autorisation de projet concerne uniquement le maintien en élevage des quatre lignées sur trois ans, en vue de leur valorisation par un industriel. Une prise de sang sur souris anesthésiée sera nécessaire avant euthanasie pour vérifier la conservation du génotype transgénique par le dosage de l'apoAII-amylo dans le sérum. Pour cet élevage, nous conserverons 4 cages par lignée (cages de mâles ou de femelles ou croisement) avec 2 à 5 souris/cage. Nous croiserons des souris KOAII avec des souris amylose K, F ou Y. Ces accouplements donneront 50% des souriceaux porteurs du gène de l'apoAII-amylo. Sachant que la taille des portées varie entre 3 et 8 souriceaux et que les accouplements seront réalisés vers 4 mois d'âge, nous réaliserons 3 accouplements par an et par lignée. Nous obtiendrons donc environ 60 souris par an et par lignée ; soit 240 souris par an pour les 4 lignées et 720 souris pour les 3 années du projet. On notera que le Remplacement de ces souris transgéniques par un modèle cellulaire ou même par un autre modèle vivant n'est pas possible car l'amylose systémique est une pathologie qui ne se développe qu'in vivo, et à moyen terme, par la présence d'une protéine circulante amyloïdogène. Ainsi l'amylose ne s'installe que chez les mammifères qui présentent une microvascularisation dans leurs organes. La formation de dépôts amyloïdes dans les capillaires perturbe le fonctionnement de tous les organes. La Réduction du nombre d'animaux est obtenue en repoussant l'âge du croisement à 4 mois, âge auquel la taille des portées est importante et l'état des souris encore très bon puisqu'elles ne présentent aucun signe de souffrance avant six mois. Nous Raffinons nos procédures d'élevages en offrant à nos souris des conditions d'élevage qui limitent au maximum le stress et augmentent le bien-être des animaux (nourriture et eau à volonté ; éclairage, température et hygrométrie contrôlés ; enrichissement du milieu par l'ajout de cylindres et boîtes de jeu dans toutes les cages). Les points limites traditionnels sont respectés ; les animaux en élevage sont suivis quotidiennement par le personnel de l'animalerie : 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 par le personnel qualifié de l'animalerie. Nos souris transgéniques sont toutes tuées avant six mois, âge auquel la pathologie n'est pas très développée et laisse les animaux sans aucun signe de souffrance. En effet, chez l'Homme, les dépôts systémiques des amyloses ne sont pas générateurs de douleurs car ils sont restreints à la lumière des capillaires, sans atteinte des tissus nerveux ; il est fort probable que cela explique pourquoi les souris ne présentent aucune manifestation de douleur. Toutes nos souris sont tuées au plus tard à six mois d'âge, donc avant l'aggravation de l'amylose.

4507. Dans le cadre de ces études sur la rétinopathie pigmentaire, maladie touchant environ une personne sur 4000 dans les pays occidentaux, l'équipe a identifié 2 gènes paralogues impliqués dans la survie des photorécepteurs à cône : Nxn1 et Nxn2 codant pour RdCVF(L) et RdCVF2(L) respectivement. Dans nos études, nous avons montré que l'effet trophique de RdCVF sur les photorécepteurs à cônes résulte de sa liaison à un récepteur de surface, le BSG1 qui est lui-même complexé au transporteur de glucose GLUT1. La stimulation de l'entrée du glucose par RdCVF est directement corrélée à son activité protectrice. Contrairement à RdCVF, l'expression de RdCVF2 n'est pas restreinte à la rétine mais s'étend dans d'autres régions du système nerveux. Par ailleurs, dans des études publiées, il a été montré que les pertes de mémoires observées dans la maladie d'Alzheimer sont aussi corrélées à une diminution de la glycolyse dans le cerveau. L'identification du récepteur de surface de RdCVF2 représente donc un enjeu important pour la compréhension des mécanismes de dégénération des cônes dans la RP et de perte de mémoire dans la maladie d'Alzheimer. Si concluante, cette étude permettra l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. De par son homologie à Bsg1 et des études préliminaires que nous avons menées in vitro, NPTN65 apparaît être un bon candidat comme récepteur de surface de RdCVF2.

Afin de valider notre hypothèse, nous injecterons du RdCVF2 à l'aide de vecteurs viraux à un modèle murin de rétinopathie pigmentaire (souris rd10) chez lequel NPTN65 sera invalidé au niveau des photorécepteurs à cône (ou non pour les contrôles). La fonction visuelle (restauration ou non) sera évaluée par des tests optocinétiques et un électrorétinogramme. Les résultats à ces tests nous permettront de déterminer si NPTN65 est bien le récepteur de surface de RdCVF2.

Au total, 40 souris seront nécessaires à cette étude incluant les contrôles. Toutes les expérimentations préliminaires pouvant être menées in vitro ont été réalisées afin de limiter l'utilisation de l'animal à son strict minimum.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les conditions d'hébergement seront adaptées au modèle animal. Le nombre d'animaux utilisé dans ce projet est le minimum requis pour

atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

4508. La transduction du signal lumineux en influx nerveux est assurée par les photorécepteurs de la rétine. Il existe deux types de photorécepteurs, les cônes et les bâtonnets. Chaque cône et chaque bâtonnet sont formés d'un segment interne qui contient les organites, et d'un segment externe constitué d'un empilement de disques qui contiennent les pigments rétiniens.

Les segments externes se renouvellent régulièrement. Des études passées ont montré que le RdCVF sécrété par les bâtonnets jouait un rôle essentiel dans le renouvellement des segments externes des photorécepteurs à cône. Ce qui est moins connu, ce sont les mécanismes qui permettent le renouvellement des segments externes des bâtonnets et si le RdCVF joue un rôle autocrine dans ce mécanisme. L'absence de modèle cellulaire pertinent nous permettant de répondre à ces questions, nous a amené à créer un modèle murin transgénique permettant le marquage des segments externes lors d'un cycle de renouvellement.

Le croisement de ce modèle avec un modèle de souris déficient pour la protéine RdCVF nous permettra de mieux déterminer le rôle de cette molécule dans le renouvellement des segments externes des bâtonnets. Si le RdCVF joue un rôle, nous devrions voir une altération du renouvellement chez les animaux déficients en RdCVF en comparaison aux animaux contrôles. Si tel est le cas, nous administrerons à l'aide d'outils viraux du RdCVF chez ces animaux afin de voir si nous restaurons ce renouvellement.

Au total, 183 animaux seront nécessaires à cette étude incluant les contrôles. Ces expérimentations ne peuvent être réalisées in vitro car il n'est pas possible de tester la fonction visuelle in vitro. Les groupes ont été réduits au maximum pour obtenir des résultats statistiquement interprétable et permettant de valider l'objectif scientifique de ce projet. Les conditions d'hébergements seront adaptées au modèle expérimental. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les mesures prises ici respectent le 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

4509. Depuis quelques années, on découvre que les bactéries du tube digestif (microbiote) jouent un rôle sur le comportement de l'hôte, ce qui a conduit à parler d'axe microbiote-intestin-cerveau. Par exemple, durant des tests d'anxiété, des rongeurs élevés sans bactéries dans un environnement stérile (animaux axéniques) exprimaient des comportements différents des rongeurs élevés normalement, en présence de bactéries. De plus, chez les rongeurs et chez l'Homme, l'apport alimentaire de probiotiques (c'est-à-dire de bactéries qui, administrées en quantité suffisante, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte) réduit les comportements anxieux et certaines altérations du comportement social.

Par ailleurs, les études réalisées chez l'Homme et les rongeurs montrent que le microbiote intestinal du jeune (microbiote intestinal initial) a une importance déterminante sur la composition du microbiote intestinal de l'adulte. Cependant, contrairement aux mammifères, les études sur le sujet manquent cruellement chez le modèle oiseau alors que l'amélioration du microbiote intestinal pourrait être une nouvelle voie d'amélioration de l'élevage des volailles.

En conséquence, nous formulons l'hypothèse que le microbiote intestinal initialement implanté dans le tube digestif de la caille japonaise influe à court et long terme sur ses comportements émotionnels. Pour tester notre hypothèse, nous allons utiliser deux groupes de cailles: un groupe de cailles axéniques dépourvues de microbiote intestinal et un groupe de cailles conventionnelles hébergeant un microbiote intestinal normal, le but étant d'étudier l'effet de l'absence de microbiote intestinal sur les comportements émotionnels chez cette espèce d'oiseau.

Les cailles du groupe axénique éclore et seront élevées en isolateur stérile afin d'éviter la contamination de leur tube digestif au cours de l'expérience. Le groupe de cailles conventionnelles sera également élevé en isolateur afin d'élever les deux groupes dans les mêmes conditions de vie. Cependant des fientes de cailles seront introduites dans l'isolateur du groupe de cailles conventionnelles afin qu'il y ait colonisation de leurs tubes digestifs.

L'expérience va durer 5 semaines (lorsque la composition du microbiote intestinal est stabilisée). Tout au long de l'expérience (dans l'isolateur et à la sortie de l'isolateur), nous réaliserons, sur nos 2 groupes, des mesures de l'activité spontanée, des comportements émotionnels (test d'open-field, test d'immobilité tonique, test d'isolement social, test de l'objet nouveau), des mesures de croissance et de réponses physiologiques au stress. Au final 36 cailles seront utilisées dans ce projet (2 groupes de 18 cailles).

La prise en compte de la règle des 3R se décline par :

REPLACEMENT : compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico.

REDUCTION : Nous utiliserons un effectif de 18 cailleaux par groupe. Avec cet effectif, étant donné la variabilité des paramètres comportementaux, nous pouvons mesurer l'activité spontanée ainsi que le comportement émotionnel et espérer détecter une différence entre nos groupes. Le nombre d'animaux engagé dans ces expériences est donc défini pour tenir compte de la variabilité inter-individuelle des comportements émotionnels dans l'hypothèse où les animaux peuvent être testés isolément, ceci même ne pourra être confirmé que lors de l'expérience.

RAFFINEMENT : Les animaux seront élevés en isolateur sur copeaux. Un enrichissement sera apporté par l'apport successif d'objets nouveaux préalablement stérilisés et dissimulés dans l'isolateur. Les animaux resteront en groupe et seront visités trois fois par jour. Toute manifestation de symptômes persistants tels que définis dans les points limites engendrera l'arrêt de l'expérience pour l'animal en question.

4510. La radiothérapie est un outil puissant qui fait partie de l'arsenal de traitements anticancéreux. 50% des patients traités pour un cancer reçoivent une radiothérapie au cours de leur traitement. La radiobiologie cherche à potentialiser les effets des

rayonnements ionisants (RI), utilisés en radiothérapie sur les tissus tumoraux, et de minimiser au maximum l'impact de ces derniers sur les tissus sains. La capacité de la radiothérapie à tuer les cellules cancéreuses réside dans sa capacité à induire des dommages sur la molécule d'ADN. Cependant, les cellules possèdent plusieurs mécanismes qui leur permettent de faire face à ses dommages et de les réparer. Le but de notre projet est de combiner deux molécules qui empêcheraient cette réparation avec la radiothérapie afin d'augmenter l'efficacité de cette dernière.

Nous souhaitons évaluer ce nouveau type de traitement à l'aide de modèles de cancer du poumon, étant donné qu'il y a eu très peu d'avancées ces dernières années concernant le traitement de ce type de cancer alors que son incidence ne diminue pas.

Le recours à des modèles animaux nous permettra d'étudier les effets de cette nouvelle combinaison thérapeutique dans un contexte qui inclut le micro environnement tumoral et qui permet donc l'interaction des cellules tumorales avec leur environnement naturel. Ces interactions jouant un grand rôle dans les effets de la radiothérapie, il apparaît donc indispensable d'avoir une évaluation sur un modèle animal pour déterminer exactement les effets de ces inhibiteurs avant d'envisager un passage en thérapie humaine. Aucun modèle *in vitro* ne permet actuellement d'obtenir la complexité présente dans un animal vivant (immunité, vascularisation, organo-dépendance,...).

Pour mener à bien ce projet et avoir une idée précise du potentiel en thérapie humaine de cette nouvelle combinaison, 640 souris seront nécessaires sur 4 années d'étude. Cette estimation se base sur des analyses statistiques qui permettent de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans cette étude. Le suivi longitudinal des animaux par imagerie sur animal vivant (luminescence) permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés (augmentation de la puissance statistique, et animal son propre témoin pour certains paramètres). Les animaux seront observés quotidiennement pour détecter tout signe éventuel de souffrance ou de toxicité des traitements. L'imagerie *in vivo* sous anesthésie non invasive est aussi une méthode optimale et raffinée pour obtenir des données pertinentes sur l'animal vivant. Un enrichissement (« cocoons » et maisons en carton) sera introduit dans les cages en tout temps. En cas de souffrance, de la buprénorphine sera administrée et des points d'arrêt stricts ont été établis et seront suivis.

4511. La O-N-acétylglucosaminylation ou O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle de nombreuses protéines (cytosoliques et nucléaires). Il s'agit d'une modification, dynamique et réversible, consistant en l'addition d'un monosaccharide, le N-acétylglucosamine (GlcNAc) sur le résidu hydroxyle (OH) d'une sérine (Ser) ou d'une thréonine (Thr) de l'axe peptidique des protéines. Cette glycosylation particulière est régulée par un couple d'enzymes spécifiques : la O-N-Acétylglucosaminyltransférase (OGT) qui catalyse le transfert de GlcNAc sur la protéine à partir du substrat nucléotide-ose UDP-GlcNAc. La seconde enzyme clé du processus est la O-N-Acétylglucosaminidase (O-GlcNAcase ou OGA) qui catalyse la déglycosylation de la protéine via l'hydrolyse du résidu O-GlcNAc.

Des travaux antérieurs ont permis de démontrer que la O-GlcNAcylation était un modulateur important de l'activité contractile des fibres musculaires *in vitro* traitées avec un inhibiteur de l'OGA. L'objectif de ce projet est d'évaluer si, des modifications aiguës (modérées ou importantes) ou chroniques des niveaux de O-GlcNAcylation des protéines musculaires sont susceptibles de modifier les propriétés fonctionnelles *in vivo* du muscle strié squelettique. L'objectif à terme sera d'établir si cette modification post-traductionnelle peut être un modulateur de l'activité contractile au cours de l'exercice physique qu'il soit aigu (exercice unique) ou chronique (procédure d'entraînement)?

Pour réaliser ce projet, 60 souris mâles de souche C57/BL6, âgées de 4 à 6 semaines et de statut sanitaire conventionnel seront utilisées. Ces animaux seront hébergés en environnement conventionnel pendant toute la durée du projet et seront distingués en 5 groupes: 3 groupes seront traités de manière aiguë (injection unique) ou chronique (14j de traitement) avec un inhibiteur de l'OGA; 2 serviront de groupes contrôles respectivement pour les animaux traités soit de manière aiguë soit de manière chronique.

Le choix de l'utilisation d'un modèle de souris mâles est basé sur les résultats récents de la littérature ayant montrés l'efficacité du traitement ici proposé pour augmenter le niveau de protéines musculaires-O-GlcNAc. Pour chacun des groupes constitués, le nombre d'animaux (n=12 par groupe) a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de résultats satisfaisant (différences statistiquement observables entre les animaux traités et les animaux contrôles).

Dans tous les cas, l'ensemble des procédures expérimentales réalisées (n°1: Augmentation du niveau des protéines musculaires O-GlcNAc, n°2: Etude *in situ* de l'activité musculaire et/ou nerveuse des membres inférieurs et n°3: Prélèvement des muscle EDL et soleus pour analyse biochimique) seront réalisés en limitant au maximum (durée et intensité) toute douleur et/ou stress pour les animaux utilisés. Ainsi, les injections réalisées au cours de la procédure expérimentale n°1 seront réalisées à partir d'une contention de durée minimale (de 30 secondes (injection *i.p*) à 10 minutes maximum (injection *i.v*)). Les procédures n°2 et n°3 seront systématiquement réalisées sous anesthésie profonde pour ne pas induire de souffrance pour les animaux utilisés. Etant donné le caractère invasif des expérimentations 2 et 3, les animaux seront mis à mort à la fin de la procédure n°3.

4512. L'hémophilie A est une maladie hémorragique rare consécutive à l'absence en facteur VIII de la coagulation (FVIII) fonctionnel. Cette pathologie se manifeste par des saignements récurrents dont les complications peuvent mettre en jeu le pronostic vital des patients. Pour compenser cette absence, la stratégie thérapeutique actuelle consiste en l'administration intraveineuse de FVIII thérapeutique. Toutefois, elle s'accompagne chez 5 à 30% des patients traités d'une réponse immunitaire caractérisée par la survenue d'anticorps neutralisants qui inhibent l'activité pro-coagulante du FVIII. Le développement de ces anticorps constitue un échec thérapeutique et un obstacle socio-économique majeur : le coût de la prise en charge des patients avec inhibiteurs peut ainsi tripler et atteindre 0,2 million d'euros par an. L'apparition de cette réponse immunitaire délétère chez les patients oblige ces derniers à avoir recours à des solutions thérapeutiques contraignantes et onéreuses.

L'objectif de ce projet est donc de mettre en place une stratégie thérapeutique de désensibilisation au FVIII destinée à prévenir la survenue d'anticorps inhibiteurs dans un modèle expérimental d'hémophilie A et de caractériser les mécanismes d'action associés à cette désensibilisation. Nous utiliserons pour cela un mode d'administration innovant, non invasif et sûr.

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

- Remplacement : Seule une approche expérimentale in vivo permet de rendre compte de la complexité des systèmes biologiques. Dans notre projet, nous aurons recours à des souris. Le modèle murin est largement employé au sein de la communauté scientifique car il n'existe pas d'alternative aisément abordable pour étudier l'hémophilie A. Enfin, cette espèce est proche de l'Homme en ce qui concerne certains marqueurs de la réponse immunologique.

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

- Réduction : Le nombre d'animaux prévu dans cette étude s'élève à 320 souris. Ce nombre repose sur une analyse approfondie de la littérature scientifique pour optimiser les approches expérimentales ainsi que sur des analyses statistiques de puissance de manière à utiliser le moins de souris possible. Ce nombre est également justifié par la nécessité de générer des mesures nous permettant de réaliser des analyses statistiques robustes, ce qui nous permettra de valider ou non l'efficacité du traitement. Le nombre de souris indiqué prend aussi en compte la nécessité de dupliquer et ainsi de confirmer les résultats obtenus.

4513. L'arthrite réactionnelle est une maladie inflammatoire qui apparaît dans le mois suivant une infection urogénitale ou gastro-intestinale. Cette maladie est caractérisée par l'apparition de symptômes inflammatoires au niveau des grandes articulations, des yeux et du tractus urogénital. L'infection peut être traitée avec des antibiotiques mais la maladie peut réapparaître ou persister dans un état chronique dans environ 30% des cas causant alors de sévères séquelles. L'âge de début de la maladie varie beaucoup avec un pic entre 15 et 35 ans.

L'infection urogénitale par la bactérie *Chlamydia* est la cause la plus commune d'apparition d'arthrite réactionnelle chez l'Homme. Avec la forte prévalence d'infections génitales à *Chlamydia* et la présence démontrée par certaines études de *Chlamydia trachomatis* et/ou *Chlamydia pneumoniae* chez plus de 60 % des patients présentant une spondylarthropathie indifférenciée, il est fort probable que l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia* soit sous-diagnostiquée.

Les mécanismes d'apparition de l'arthrite réactionnelle font l'objet de nombreuses recherches en vue de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces. Des hypothèses récentes évoquent une migration et une persistance des chlamydias dans les articulations entraînant l'activation permanente du système immunitaire, à l'origine des lésions tissulaires. Les mécanismes exacts qui entraînent l'apparition d'une arthrite réactionnelle restent à être démontrés. Il est nécessaire de développer des modèles animaux pour y parvenir. Le projet portant sur des mécanismes physiopathologiques complexes, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

Il existe un modèle murin couramment utilisé pour étudier les arthrites auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde. Les souris de ce modèle présentent une mutation sur un gène codant pour une protéine clé de la réponse immunitaire et développent des maladies auto-immunes lorsqu'elles sont mises en contact avec des agents pathogènes. Des études récentes ont montré que lorsque ces souris sont infectées avec des chlamydias elles développent une affection similaire à l'arthrite réactionnelle humaine.

Notre projet vise à étudier ce modèle d'arthrite réactionnelle chez ce modèle murin afin de comprendre les mécanismes d'apparition de la maladie.

Au cours de ce projet, nous allons tester différents traitements afin d'évaluer le rôle des cellules de l'articulation et des cellules inflammatoires dans le développement de la pathologie.

L'aspect le plus dommageable du projet est l'apparition d'un état pathologique chez les souris. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à un index de souffrance multicritère avec un score limite au-delà duquel les souris seront sacrifiées.

Les souris seront maintenues dans un environnement exempt de pathogène et d'opportuniste afin de s'affranchir de toute interférence infectieuse.

Le projet comporte 3 procédures expérimentales, 2 modèles d'infections différents (génitale et pulmonaire) et nécessitera l'utilisation de 846 souris.

Ce nombre d'animaux a été déterminé grâce à un test statistique et permettra de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés mais tout en restant suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

4514. Des ateliers technologiques sont réalisés dans le cadre d'une unité d'enseignement par des étudiants en Master. Le but est de permettre aux étudiants de comprendre et de maîtriser un certain nombre de techniques expérimentales (génomiques, protéomiques, électrophysiologiques...) en vue de la poursuite de leur master recherche puis de leur doctorat. Ainsi, nous proposons un atelier spécifique et spécialisé de 12h en « techniques électrophysiologiques intégrées chez l'animal » aux étudiants qui souhaitent s'investir dans un parcours de recherche en neurosciences.

L'enseignement se décompose en trois parties :

- une partie théorique de 2h sur l'initiation aux bonnes pratiques en expérimentation animale. L'objectif est de sensibiliser les étudiants aux réglementations européenne (directive UE10/63: article 14 pour la prise en charge de la douleur et de l'anesthésie et

article 23 sur la compétence des personnels) et française (autorisation à l'expérimentation par un comité d'éthique depuis 2013). Les thèmes forts de cette approche seront le respect de la règle des 3R, et le respect des procédures d'expérimentales pour la prise en charge de la souffrance, de la douleur et de l'angoisse des animaux. Les différentes méthodes d'anesthésie et d'analgésie seront également exposées.

- une partie théorique de 2h où sont présentées les postes électrophysiologiques (appareillages, paramètres...) et les différentes techniques électrophysiologiques.

- une partie pratique de 8h est dédiée à deux procédures expérimentales permettant aux étudiants d'enregistrer les activités électriques corticales (unitaire et globale) spontanée et évoquée par des stimulations tactiles ou nerveuses effectuées au niveau de la patte postérieure d'un rat. Les étudiants assisteront et participeront (1) à la réalisation d'une carte somatotopique corticale de représentation du pied, et (2) à l'enregistrement d'électrocorticogrammes et de potentiels évoqués. Tous ces résultats seront analysés, interprétés et comparés aux données de la littérature scientifique dédiée. Ces différentes techniques sont très spécialisées et demandent à être réalisées chez l'animal. Elles ne peuvent être remplacées par d'autres outils pédagogiques.

Pour réaliser ces différentes procédures un taux d'encadrement de 3 à 4 étudiants par personnel formé sera mis en place. En effet, cet atelier sera ouvert par session de 12 étudiants maximum. L'enseignant sera assisté par deux personnels techniques.

Ce personnel formé réalisera l'anesthésie des animaux, la mise en place des procédures permettant de raffiner les expériences (analgésie, surveillance de l'état d'endormissement des animaux...) et enfin de la mise à mort des animaux.

Pour réaliser les deux procédures, il faut 8 rats (1 pour la procédure sur les cartes corticales, 6 pour la procédure sur l'électrocorticographie, et 1 rat en surplus en cas de mort à l'anesthésie) pour 12 étudiants. Nous pouvons avoir au maximum 24 étudiants par an donc 16 rats au maximum par an. La demande d'autorisation porte sur 5 années, et donc un total de 80 rats. Ce nombre évoluera à la baisse en fonction de la fluctuation du nombre d'étudiant.

4515. La pneumonie aigüe communautaire (PAC) est une infection respiratoire acquise en dehors du milieu hospitalier. La PAC est la première cause de mortalité infectieuse dans les pays occidentaux et elle représente aujourd'hui un problème majeur de santé publique. L'OMS estime l'incidence annuelle de la PAC à 450 millions de cas dans le monde, pour près de 4 millions de décès. Les enfants de moins de cinq ans et les adultes âgés de plus de 75 ans sont plus particulièrement touchés. Différents types de pneumonies sont décrites selon leur origine infectieuse: les pneumonies dites « bactériennes », les pneumonies dites « virales » et les pneumonies « mixtes » (virales et bactériennes). Parmi les pathogènes les plus retrouvés dans ces infections, nous citerons : les bactéries *Streptococcus pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* et le virus de la grippe.

De nouvelles stratégies thérapeutiques sont donc essentielles pour améliorer le pronostic vital des personnes infectées. Une des pistes est de pouvoir optimiser notre système de défense, mais cela nécessite une meilleure connaissance de ce dernier. Dans ce contexte, notre objectif vise à mieux comprendre le rôle du système immunitaire inné dans les mécanismes de défense liés à ces infections respiratoires afin de pouvoir envisager de nouveaux traitements. Notre projet portera sur les 3 infections respiratoires ayant pour origine : (1) le pneumocoque, (2) *Pseudomonas aeruginosa* et (3) le virus grippal.

Pour notre projet, nous utiliserons des souris de génotype sauvage et des souris déficientes pour des gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée (13 lignées différentes). Les trois pathogènes seront testés pour chaque lignée et nous comparerons les phénotypes en analysant les cellules immunitaires des poumons et de la rate (activation, fonction, sécrétion), l'inflammation pulmonaire et les molécules impliquées dans les mécanismes de l'immunité innée (cytokines). Au total 7020 souris seront nécessaires pour atteindre nos objectifs (projet sur 5 ans avec 7 expérimentateurs titulaires).

Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R, à savoir :

- Remplacement : Jusqu'à présent, aucun système in vitro ne permet de reproduire les caractéristiques d'infections respiratoires et le modèle murin constitue un modèle expérimental pertinent.

- Réduction : Le nombre d'animaux est optimisé en réalisant un maximum d'analyses sur chaque animal (cellules immunitaires, cytokines, expression des gènes, histologie, évaluation de la charge du pathogène, ...).

- Raffinement : Les animaux seront élevés en communauté dans des cages enrichies avec du sopalin et fragments de boîtes d'œufs. Tout au long du déroulement des expériences, une observation systématique de leur état clinique sera réalisée par les animaliers et les expérimentateurs (pluriquotidienne) afin de détecter au plus tôt une éventuelle souffrance animale.

4516. Les photorécepteurs sont les cellules rétinienne captant la lumière et générant le message nerveux. Leur mort est une cause majeure de cécité. La diversité des causes génétiques et environnementales des pathologies rétinienne rend difficile le développement de thérapies efficaces et généralisables au plus grand nombre. L'objectif de notre projet de recherche est de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques applicables à un grand nombre de patients indépendamment des origines pathologiques. Pour cela, notre étude repose sur deux approches complémentaires: i) la thérapie cellulaire, basée sur la stimulation du pouvoir régénératif de certaines cellules rétinienne ii) la neuroprotection, visant à bloquer la mort des photorécepteurs.

Avantages et dommages escomptés

L'existence de lignées de souris atteintes spontanément ou non de dégénérescence rétinienne en fait un excellent organisme modèle pour notre projet.

Une part de nos expériences n'est pas soumise au dépôt de demande d'autorisation de projet car réalisée sur animaux sacrifiés sans manipulation préalable.

Les phénotypes des animaux utilisés sont restreints à la rétine, un organe non-vital et dont la perte totale de fonction n'altère pas la vie des animaux. Le caractère non dommageable des lignées murines utilisées pour ce projet a été établi après évaluation par la Structure du Bien Etre Animal de l'Institut.

Les différentes procédures qui seront effectuées ont un niveau de sévérité de classe légère et sont couramment utilisées dans le domaine de la recherche ophtalmologique.

Nombre et types d'animaux à utiliser sur 5 ans.

Nous prévoyons d'utiliser au maximum 2507 animaux pendant la durée de 5 ans du projet (164 souris sauvages, 499 mutants spontanés et 1844 souris génétiquement modifiées).

Conformité avec les exigences 3R.

i) Réduction: Le projet nécessitant la validation fonctionnelle *in vivo* de gènes candidats, leur sélection sera optimisée de la manière suivante afin de réduire leur nombre et donc le nombre d'animaux utilisés : analyse de bases de données sur l'expression de gènes dans différents modèles de dégénérescences rétiniennes ou spécifiquement dans un type cellulaire rétinien, tests au préalable des meilleurs candidats sur des larves de xénope non autonomes (larves non indépendantes, antérieures au stade NF45 avant le nourrissage), prévalidation sur des modèles d'étude *in vitro* à chaque fois que cela sera possible. Enfin, le choix du nombre d'animaux à utiliser sera toujours optimisé et en adéquation avec la validation statistique des résultats obtenus.

ii) Remplacement: afin d'éviter douleur et inconfort à l'animal, nous souhaitons aussi souvent que possible remplacer les manipulations *in vivo* par des expériences de culture d'explants de rétines provenant d'animaux sacrifiés. Ce modèle *ex vivo* constitue un bon modèle de dégénérescence rétinienne et permet de tester facilement l'efficacité d'agents pharmacologiques, par ajout dans le milieu de culture. Nous réaliserons également aussi souvent que possible des tests au préalable avec les gènes candidats sur des larves de xénope non autonomes (larves non indépendantes, antérieures au stade NF45 avant le nourrissage).

iii) Raffinement: les animaux sont élevés dans un environnement contrôlé et enrichi. Nous aurons recours aux procédures anesthésiques appropriées. Les points limites de nos expériences sont déterminés en fonction de la santé générale des animaux ayant subi des manipulations de leur vivant. Nous limiterons la durée des traitements pharmacologiques au minimum nécessaire à l'obtention de l'effet escompté. Les doses injectées seront réajustées suite à la survenue de manifestations extérieures de mal-être.

4517. Les microARN (miARN) sont des petits ARN d'une vingtaine de nucléotides de long à l'état mature, ne codant pas pour des protéines mais qui régulent spécifiquement l'expression de certains gènes en inhibant la traduction de leurs ARN messagers. Ciblant chacun potentiellement plusieurs dizaines de gènes, les miARN semblent intervenir à tous les niveaux du fonctionnement cellulaire, depuis la différenciation jusqu'à leur mort par apoptose. Nous avons montré que les miARN jouent un rôle clé dans la stimulation de la fonction gonadotrope exercée par la GnRH (Gonadotropin-releasing hormone), un neuromédiateur d'origine hypothalamique.

Les miARN sont aussi trouvés dans le milieu extracellulaire et dans le sang. Ceux-ci sont produits par des cellules et sont libérés dans la circulation selon un mécanisme de sécrétion actif. Des travaux préliminaires montrent que la stimulation de la cellule gonadotrope responsable de l'ovulation provoque une forte sécrétion de certains miARN, perceptible dans la circulation générale.

L'objectif du projet proposé vise à mieux caractériser ce phénomène de sécrétion. Pour vérifier que l'augmentation induite des miARN circulants chez la femelle au moment de l'ovulation est bien due à la stimulation par la GnRH, les variations sanguines de miARN seront étudiées chez des rates contrôles ou traitées avec un antagoniste de la GnRH au cours de leur cycle oestrien. Pour vérifier que ces miARN circulants ne sont pas d'origine gonadique, nous serons amenés à évaluer, *in vivo*, l'effet d'un traitement par la GnRH sur les niveaux sanguins des miARN chez des rats mâles, intacts ou castrés.

Seuls des prélèvements de sang (de l'ordre de 100 à 200µl par prise) seront effectués, dans la limite admise afin de ne pas trop perturber l'hématocrite et l'équilibre osmotique du sang. Nous utiliserons des approches méthodologiques non dommageables pour l'animal avec le souci d'éviter la douleur et d'en réduire le nombre à ce qui est strictement nécessaire pour ce projet. Avec l'exigence d'appliquer les règles de remplacement, réduction et raffinement, un total de 60 rats mâles et 40 rats femelles sera nécessaire pour mener à bien ce projet.

4518. Les cancers sont un enjeu capital de santé publique avec plus de 12 millions de nouveaux cas dans le monde en 2008 (et une incidence prévisionnelle de 15 millions de cas en 2020) et bien que des progrès majeurs aient été réalisés durant cette dernière décennie, ils demeurent la 1ère cause de mortalité chez l'homme et la 2ème chez la femme. Il existe donc un vrai besoin médical chez ces patients réfractaires aux traitements usuels et sans alternative thérapeutique.

Les premières indications envisagées pour ce nouveau traitement seront des maladies orphelines : les cancers du sang tels que les lymphomes non hodgkiniens et les leucémies aiguës. Il s'agit de maladies hautement prolifératives et graves, dont le pronostic vital est souvent engagé.

Les traitements proposés aujourd'hui pour ces pathologies ont grandement amélioré le pronostic de ces patients : ils associent des poly chimiothérapies et de l'immunothérapie ainsi que des thérapies ciblées. Des traitements plus lourds comme les autogreffes ou des allogreffes de cellules souches hématopoïétiques peuvent être proposés mais ceux-ci sont en général réservés aux patients de moins de 65 ans compte tenu de leur toxicité.

Malheureusement, ces stratégies ne sont pas toujours curatrices, en particulier chez les sujets âgés qui ne peuvent bénéficier des traitements intensifs.

Les phases de rémission sont le plus souvent suivies de rechutes successives dans un délai variable en raison des résistances aux différents traitements proposés aboutissant à terme à une impasse thérapeutique et le décès en quelques semaines.

Ce projet a pour objectif d'obtenir des informations sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamie d'un anticorps monoclonal en administrations répétées, potentiel nouveau traitement contre les leucémies et lymphomes, et de tester sa toxicité. Le modèle animal de choix est le primate non-humain compte tenu de sa grande proximité phylogénique avec l'Homme et en particulier du fait des similitudes immunologiques.

Règle des 3Rs : Etant donné que des éléments sur la tolérance à ce nouveau traitement (administrations espacées dans le temps) sont déjà disponibles, un nombre réduit de 5 ouistitis (*Callithrix jacchus*) sera utilisé (réduction). Le remplacement du recours au modèle primate est impossible ici car le ouistiti est la seule espèce animale dont l'épitope de fixation de l'anticorps utilisé ait une homologie de séquence avec celui de l'Homme. La maladie n'a pas besoin d'être induite chez ces animaux puisqu'on ne cherche pas encore à connaître l'efficacité du traitement mais la toxicité potentielle. Afin de limiter les contraintes pour les animaux (raffinement), toutes les interventions se feront sous anesthésie générale. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux avec des programmes d'enrichissement et de socialisation.

4519. Le tube digestif héberge une communauté microbienne complexe, le microbiote intestinal. Il existe une interaction entre le microbiote intestinal et l'hôte, qui s'influencent mutuellement. Le microbiote intestinal a la capacité de transformer un acide aminé essentiel apporté par l'alimentation, le tryptophane, en indole. L'indole est ensuite transformé dans le foie en dérivés oxydés, les oxindoles, qui sont des molécules neuro-actives (agissant sur le cerveau). Des études chez le rongeur ont démontré que les oxindoles avaient des effets sédatif et anxiogène. Nous avons observé que la production chronique d'indole favorise des comportements de type anxieux et dépressif chez l'hôte.

Ce projet vise à rechercher si la production d'indole par le microbiote intestinal joue un rôle dans l'apparition ou l'aggravation de symptômes dépressifs. L'étude sera menée avec des souris sans germes (axéniques) inoculées avec le microbiote fécal recueilli chez des donneurs souffrant de dépression possédant un microbiote intestinal à faible ou fort potentiel de production d'indole. Ce modèle sera appliqué à des souris témoins et à des souris soumises à une procédure de stress chronique modéré, qui induit des altérations neurochimiques et comportementales qui ressemblent à celles observées chez les patients déprimés.

Les souris seront soumises à des tests comportementaux et des analyses biochimiques dont les résultats reflètent les symptômes cliniques et les anomalies biologiques observés dans la dépression humaine. Une cohorte de 48 souris sera nécessaire pour mener à bien cette première étude. A l'issue de ces tests, les souris seront euthanasiées, et le contenu du côlon, du sang et le cerveau seront prélevés afin de doser les oxindoles (dérivés de l'indole produit par les bactéries inoculées) et d'autres marqueurs biochimiques de la dépression.

Le projet, portant sur la relation entre l'hôte et ses bactéries, met en jeu des interactions complexes, il est donc impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Seule l'utilisation d'animaux permet d'étudier ce type d'interactions complexes entre un microbiote intestinal particulier, le fonctionnement du cerveau et la survenue de troubles comportementaux. Nous travaillerons avec des souris axéniques qui seront inoculées avec un microbiote intestinal humain à faible ou fort potentiel de production d'indole. Cette étude permettra de déterminer si la production d'indole par les bactéries intestinales peut moduler l'intensité des symptômes dépressifs, ce qui pourrait alors permettre d'envisager de nouveaux modes d'actions thérapeutiques.

Si cette première étude utilisant des pools de microbiotes fécaux met en évidence une influence de la production d'indole bactérien sur la gravité des symptômes de la dépression, nous rechercherons si ce résultat est reproductible avec le microbiote provenant d'un seul individu.

Le protocole sera répété 4 fois supplémentaires en inoculant les souris soit avec le microbiote fécal à fort potentiel producteur d'indole d'un seul patient (patients A, B, C et D), soit avec le microbiote fécal à faible potentiel producteur d'indole d'un seul patient (patients A', B', C' et D'). En tout, il y aura donc 5 cohortes de 48 souris soit 240 souris.

Le nombre total d'animaux utilisé est le minimum nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables, ainsi qu'à l'exploitation et l'interprétation des résultats biologiques obtenus.

Aucune souffrance animale n'est attendue dans cette étude, du fait de la faible invasivité des protocoles. Les souris non soumises à la procédure de stress chronique modéré et les autres souris en dehors de la période de stress, seront hébergées à 4 par cage dans des conditions d'élevage standard en isolateur et un enrichissement de milieu sous forme de sopalin à déchiqueter et de bâtons de bois à ronger est prévu. L'ensemble des soins donnés aux souris visera à satisfaire le mieux possible leurs besoins physiologiques et comportementaux, conformément à la législation. L'état de santé et de bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement.

4520. Une épidémie de maladie à virus Ebola a débuté en Guinée en décembre 2013 avant de s'étendre au Liberia, à la Sierra Leone et au Nigeria. L'épidémie actuelle, causée par la souche Zaïre du virus, est la plus meurtrière depuis la découverte des premiers cas en 1976. C'est la première fois que le virus est détecté hors d'Afrique centrale.

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'épidémie qui a sévit entre 2013 et 2016 en Afrique de l'Ouest a entraîné plus de 11 300 décès..

La transmission du virus Ebola nécessite un contact physique rapproché avec une personne infectée présentant des symptômes ou un contact avec des surfaces souillées par les liquides biologiques de la personne (vomissements, linge par exemple). Les personnels de santé sur le terrain et les femmes sont particulièrement touchés.

Devant l'urgence de la situation, des traitements expérimentaux sont en cours de développement et doivent être rapidement validés.

Les experts en éthique médicale de l'OMS, devant les circonstances de l'épidémie et sous réserve que certaines conditions soient remplies, ont abouti au consensus estimant qu'il est éthique d'offrir des traitements non homologués dont l'efficacité n'est pas encore connue ainsi que les effets secondaires, comme traitement potentiel ou à titre préventif.

Le T-705 a été développé pour traiter les infections aux virus Influenza. La molécule agit contre les virus à ARN. Dans les modèles animaux, le T-705 a principalement été utilisé par voie orale, mais le fabricant a développé un produit utilisable par voie intraveineuse.

Dans ce projet, la pharmacocinétique de la molécule T-705 en association avec deux molécules antivirales (gemcitabine et ribavirine) est analysée sur 20 macaques dans le but de valider son utilisation chez l'Homme dans le traitement des infections à virus Ebola. Comme le veut la règle des 3Rs, le nombre d'animaux testés a été réduit au strict minimum pour obtenir des données scientifiquement interprétables en accord avec des études similaires déjà réalisées (5 animaux par groupe pour pallier aux variabilités interindividuelles) (Réduction) et les procédures expérimentales s'appuient sur les techniques les moins invasives disponibles en l'état des connaissances actuelles. Une attention particulière est portée aux animaux en termes d'enrichissement et de suivi comportemental (Raffinement). Le choix du primate non humain (macaque) provient du fait qu'il s'agit d'une espèce proche de l'homme et qui s'avère sensible au virus Ebola (développement d'une maladie hémorragique comparable à celle de l'Homme). Il est donc indispensable d'avoir les données pharmacocinétique de la molécule à tester avant de faire les études d'efficacité sur des animaux infectés par le virus (Remplacement).

4521. Le programme de recherche proposé a pour but de mieux comprendre le rôle physiologique de la protéine p16 dans l'homéostasie énergétique et ses conséquences pathologiques dans le développement de l'obésité, du diabète de type 2 et ses complications telles que les maladies du foie gras (stéatose hépatique, NASH et fibrose hépatique) et de tester des molécules à visées thérapeutiques telles que des agonistes de PPARalpha et/ou des inhibiteurs de SGLT2 (gliflozines) en utilisant des approches in vitro (culture primaire d'hépatocyte isolés de souris p16WT littermates et p16KO) et in vivo (souris p16WT littermates et p16KO). L'étude de l'homéostasie énergétique dans des conditions physiologiques et pathologiques nécessite des études sur organisme entier qui ne peut être réalisée que par le biais de modèles animaux adaptés. Le projet a été conçu avec un nombre minimal d'animaux nécessaire pour assurer sa validité scientifique et statistique qui est évalué à 1228 souris (534 p16WT et 694 p16KO) sur 5 ans. Les mâles seront utilisés dans nos expériences car ils sont plus sensibles métaboliquement au régime riche en graisses induisant l'obésité (prise de poids, variation des paramètres métaboliques, insulino-résistance). D'une manière générale, nous utilisons des groupes n=8 à 15 et nous utiliserons principalement des analyses non-paramétriques. Les souris seront hébergées dans un environnement enrichi (4 souris par cage ; présence de petite maison pour améliorer leur bien-être). Les différentes lignées utilisées dans nos procédures ne présentent aucun problème physique ou physiologique. Néanmoins, nous serons attentifs à observer si les animaux souffrent ou présentent un comportement anormal en lien avec le responsable du bien-être suivant les paramètres cliniques suivants, définissant les points limites:

- perte de poids de 20% pour les souris minces déterminée après pesée des animaux et pour une souris obèse perte de poids correspondante au maximum à 20% de perte de poids d'une souris mince correspondante (et, le cas échéant variations de l'ingestion de nourriture et d'eau) :

- apparence physique externe (piloérection, dos rond, signes d'infection, respiration anormale...)

- changement du comportement (hypoactivité, démarche anormale)

- réponses comportementales au stimulus externe

Les animaux présentant un de ces critères seront euthanasiés par dislocation cervicale après anesthésie gazeuse dans une salle dédiée. Ce monitoring sera réalisé en lien avec le responsable du bien-être animal.

4522. L'objectif du projet est de produire un anticorps polyclonal dirigé contre une protéine impliquée dans la division cellulaire des cellules germinales et pour laquelle aucun anticorps spécifique n'est disponible ni dans le commerce, ni auprès d'autres laboratoires scientifiques. L'étude de l'expression des protéines repose principalement sur leur mise en évidence, au moyen d'anticorps dirigés contre des parties spécifiques de ces protéines recherchées. Deux catégories d'anticorps sont à l'usage de la recherche: des anticorps monoclonaux et des anticorps polyclonaux. Dans les deux cas, leur obtention met en œuvre une première injection de l'antigène à un animal.

Les antigènes sont des protéines étrangères à l'organisme capables de déclencher une réaction immunitaire provoquant la production d'anticorps chargés de les neutraliser. Les antigènes que nous étudions sont peu immunogènes et nécessitent l'utilisation d'adjuvants pour renforcer et/ou prolonger la réponse immunitaire. Les anticorps produits au cours du processus d'immunisation seront collectés après prélèvement de sang.

Le présent projet vise à produire des anticorps polyclonaux chez le lapin. Le choix de cette espèce repose sur plusieurs critères. Le premier est que le lapin est suffisamment éloigné phylogénétiquement par rapport à l'espèce source de l'antigène (ici la souris) pour que l'antigène injecté soit reconnu comme substance étrangère et induise la formation d'anticorps dirigés contre lui. Le deuxième critère repose sur la capacité du lapin à fournir des volumes substantiels d'immunsérums puisque le projet en nécessite des quantités relativement importantes afin de mettre au point plusieurs méthodes de caractérisation et de dosage de la protéine d'intérêt.

Les procédés d'immunisation feront appel à trois lapins par antigène injecté (5 antigènes) pour assurer la réussite du protocole (soit 5*3= 15 lapins au total). Une primo-injection sera réalisée suivie de 5 injections de rappel pour augmenter l'efficacité de la production. Les injections seront faites par voie sous-cutanée en mélangeant l'antigène avec un adjuvant afin d'améliorer la réponse immunitaire. Des prises de sang seront nécessaires au départ de l'expérimentation (obtention du sérum pré-immun) puis une dizaine de jours après les rappels afin de contrôler la qualité de production d'anticorps et de les extraire.

Les animaux sont maintenus pendant toute l'expérimentation dans les conditions standards de l'élevage, en cage individuelle, sous environnement enrichi (jouets sous forme de balles de ping-pong) et sans aucune restriction d'alimentation et de boisson. Les animaux seront observés tous les jours par les personnes compétentes.

Aucune douleur, réaction délétère, aucun phénotype particulier ne sont attendus suite à ces injections. Dans le cas peu probable d'une apparition de douleur et/ou de réaction cutanée suite à ces injections, les animaux seraient pris en charge par le vétérinaire référent.

Le respect du principe des « 3Rs » est inclus dans les points suivants :

Réduction du nombre d'animaux : 3 animaux seront traités simultanément, considérant la variabilité de réponse d'un animal à l'autre, variabilité que l'on ne peut pas prédire. Réduire le nombre d'animaux risque de conduire l'expérimentation à l'échec.

Raffinement : En cas d'apparition d'une réaction délétère, les injections seront arrêtées, et l'animal sera examiné par le vétérinaire référent qui donnera son avis sur les soins à apporter. Si l'état de l'animal se dégrade, sur avis du vétérinaire, l'animal sera mis à mort.

Remplacement : Aucune cellule en culture ne permet d'obtenir des anticorps spécifiques.

4523. Objectifs du projet

La crête neurale (CN) est une population cellulaire spécifique de l'embryon des Vertébrés, qui donne naissance à différentes structures telles que le système nerveux périphérique, les cellules pigmentaires, les os et cartilages de la face et du crâne. Des anomalies du développement ou de fonctionnement de la CN sont responsables d'un grand nombre de malformations néonatales (par exemple les syndromes de Digeorge et de Waardenburg). De même, certains cancers tels que les mélanomes, gliomes, neuroblastomes ou neurofibromes résultent de la transformation tumorale de cellules issues de la CN. L'étude des mécanismes qui contrôlent la formation de la CN et sa différenciation est donc cruciale pour en comprendre les dérégulations. De plus, précocement dans l'embryon, les cellules de la CN subissent un processus appelé « transition épithelio-mésenchymateuse (TEM) », qui leur permet de migrer à travers l'embryon vers de multiples organes ou tissus cibles, où elles se différencient en cellules spécifiques. La TEM est un mécanisme général, permettant à des cellules de devenir des cellules migrantes individuelles et c'est ce processus que l'on retrouve lors de la formation de métastases. La CN est donc un modèle de choix pour étudier le contrôle de la TEM, comprendre comment ce phénomène est activé et régulé dans l'embryon et comparer ces régulations aux phénomènes de TEM tumorale.

Le projet proposé concerne l'analyse des molécules qui contrôlent le développement de la crête neurale et notamment la mise en place de la TEM. Ce programme tire parti d'outils moléculaires sophistiqués créés spécifiquement chez l'embryon d'amphibien. Le projet utilisera des embryons de *Xenopus laevis*.

Avantages et dommages escomptés

L'amphibien *Xenopus laevis* est un organisme modèle pour l'étude des processus développementaux chez les vertébrés. Les études réalisées à partir de ce modèle permettent de mieux comprendre les processus développementaux des modèles mammaliens dont l'homme. L'analyse du génome de *Xenopus* montre d'importantes similitudes avec le génome humain, notamment 79% des gènes identifiés dans des maladies humaines ont leur équivalent chez *Xenopus*. L'utilisation de ce modèle permet d'associer aux approches d'embryologie classique, de biochimie et de biologie cellulaire, des études à large échelle de l'expression des gènes et des analyses pharmacologiques.

Etant donné que l'essentiel des expériences que nous réalisons s'effectuent aux stades embryonnaires antérieurs à la forme larvaire autonome, les dommages escomptés sont extrêmement limités.

Nombre et types d'animaux à utiliser sur 5 ans.

Afin d'obtenir les embryons nécessaires à nos expérimentations, nous prévoyons d'utiliser 6-12 xénopes femelles par semaine. Les animaux utilisés seront ensuite mis au repos durant 4 mois. Ainsi, durant les 5 années du projet, nous anticipons d'utiliser au maximum 200 xénopes femelles sauvages adultes qui seront périodiquement stimulées par injection d'hormone (human Chorionic Gonadotropine, hCG recombinante) selon les protocoles standard.

Conformité avec les exigences 3R

Le vertébré tétrapode non mammifère *Xenopus laevis* répond idéalement aux recommandations des 3R. Le choix du modèle et des pratiques expérimentales repose sur les propriétés suivantes :

- i) Un grand nombre d'embryons (plusieurs milliers) sont obtenus par fécondation in vitro à partir d'un nombre limité d'individus adultes, permettant à plusieurs expérimentateurs de travailler simultanément,
- ii) une estimation de la variabilité inter-individuelle naturelle (animaux sauvages non sélectionnés) et une analyse statistique immédiate des résultats obtenus.
- iii) Le développement externe des embryons permet une observation non-invasive.
- iv) De nombreuses expériences peuvent se restreindre aux stades embryonnaires antérieurs à la forme larvaire autonome.
- v) L'amphibien *Xenopus laevis* possède une longévité (20 ans) et une période de reproduction (15 ans) remarquables, ce qui en fait un excellent modèle pérenne pour les études d'ordre génétique.
- vi) Les femelles utilisées dans les expériences impliquant une fécondation in vitro peuvent être induites à pondre plusieurs fois en respectant un intervalle de 4 mois entre chaque ponte, minimisant le stress potentiellement engendré.

Toutes ces caractéristiques minimisent significativement le nombre d'animaux nécessaires au projet, sans compromettre ses objectifs scientifiques. Au contraire, notre projet explore des étapes du développement qui ne pourraient pas être abordées aussi efficacement et simplement dans un modèle mammifère.

4524. Notre groupe travaille sur la mise au point d'approches de thérapies cellulaires pour inhiber l'inflammation ou régénérer le cartilage détruit suite à des pathologies ostéo-articulaires notamment dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde. L'inhibition de

l'inflammation associée à cette pathologie consiste à injecter de manière locale ou systémique des cellules « médicaments » qui vont libérer des facteurs trophiques capables d'inhiber la réponse immunitaire.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer les capacités immunomodulatrices de cellules souches mésenchymateuses (ou de molécules thérapeutiques identifiées à partir de ces cellules) pour diminuer les signes d'arthrite. Cette pathologie a une prévalence importante avec 1% de la population atteinte. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules progénitrices adultes isolées de différents tissus, notamment la moelle osseuse et le tissu adipeux et qui possèdent des capacités de régénération grâce à leur capacité à se différencier en chondrocytes, adipocytes et ostéoblastes. Elles possèdent également des propriétés anti-inflammatoires et chondroprotectrices qui les rendent particulièrement intéressantes pour mettre en place une approche thérapeutique de l'arthrite. Le modèle utilisé couramment est le modèle d'arthrite induite au collagène (CIA) ; nous avons aussi recours au modèle d'arthrite induite par les anticorps (CAIA). Le projet repose sur l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (d'origine humaine ou murine) ou des vésicules extracellulaires qui sont libérées par ces cellules (exosomes ou microparticules). Il est démontré que les cellules humaines ne sont pas rejetées instantanément et possèdent un effet thérapeutique chez la souris. La voie d'injection des cellules ou des molécules thérapeutiques est systémique (intraveineuse).

Nous avons déterminé un programme de travail sur les 5 ans à venir qui tient compte des avancées attendues de notre projet de recherche. Cependant, le nombre d'animaux concerné par chaque procédure est certainement maximal (maximum envisagé : 1040) et sera revu à la baisse si besoin pour tenir compte de la règle des 3R.

Toutes les dispositions seront prises pour respecter la règle des 3R :

- Réduction : le nombre d'animaux a été calculé avec l'aide d'un logiciel permettant d'évaluer le nombre d'animaux minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les paramètres à mesurer (données préliminaires obtenues dans d'autres expériences réalisées au laboratoire)

- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement. Les protocoles utilisés étant de degré de sévérité légère au maximum, les animaux ne présentent pas de signes de souffrance habituellement. Cependant, dans le cas où certains signes seraient observés, un traitement oral avec du paracétamol serait mis en place

- Remplacement : Afin de proposer une thérapie cellulaire chez l'homme, il est important de démontrer l'efficacité thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses humaines et murines dans un modèle préclinique pertinent chez l'animal. Des modèles in vitro ne suffisent pas seuls à évaluer l'efficacité de ces cellules ou des molécules ou des vésicules qui en dérivent.

4525. Notre groupe travaille sur la mise au point d'approches de thérapies cellulaires pour inhiber l'inflammation et protéger des dommages au cartilage articulaire lors de maladies rhumatismales. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) possèdent des propriétés anti-inflammatoires et chondroprotectrices qui les rendent particulièrement intéressantes pour mettre en place un traitement de ces maladies. Dans ce but, nous voulons déterminer leur survie et leur biodistribution après implantation chez la souris.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer le devenir des cellules souches mésenchymateuses après implantation. Nous utiliserons les CSM humaines ou leurs vésicules extracellulaires qui seront injectées en intra-articulaire, intraveineux, intrapéritonéal ou sous-cutané chez des souris immunocompétentes ou immunodéficientes. Nous utilisons des cellules humaines qui seront produites aux normes BPL (Bonnes Pratiques de Laboratoire) afin de disposer de résultats de pharmacocinétique pour les demandes d'utilisation de ces cellules pour des essais cliniques auprès des instances réglementaires (Agence Nationale de Sécurité des Médicaments). S'agissant de cellules humaines, nous utiliserons des souris sans réponse immunitaire fonctionnelle pour éviter le rejet de ces cellules après implantation. Nous les comparerons à des souris qui ont une réponse immunitaire fonctionnelle. L'intérêt de tester différentes voies d'injection est de déterminer si la migration des cellules ou la distribution des vésicules extracellulaires varie en fonction du site d'injection.

Nous avons déterminé un programme de travail sur les 5 ans à venir qui tient compte des avancées attendues de notre projet de recherche. Cependant, le nombre d'animaux concerné par chaque procédure est certainement maximal (maximum envisagé : 1200) et sera revu à la baisse si besoin pour tenir compte de la règle des 3R.

Toutes les dispositions seront prises pour respecter la règle des 3R :

- Réduction : le nombre d'animaux a été calculé avec l'aide d'un logiciel permettant d'évaluer le nombre d'animaux minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les paramètres à mesurer (données préliminaires obtenues dans d'autres expériences réalisées au laboratoire)

- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement. Les protocoles utilisés étant de degré de sévérité légère au maximum, les animaux ne présentent pas de signes de souffrance habituellement. Cependant, dans le cas où certains signes seraient observés, un traitement oral avec du paracétamol serait mis en place

- Remplacement : Afin de proposer une thérapie cellulaire chez l'homme, il est important de démontrer l'efficacité thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses humaines et murines dans un modèle pré-clinique pertinent chez l'animal. Des modèles in vitro ne suffisent pas seuls à évaluer l'efficacité de ces cellules.

4526. En dépit des avancées en matière de traitements hormonaux concernant le cancer de la prostate, la maladie progresse et on parle alors de cancer résistant à la castration. Des données récentes ont montré le rôle important du microenvironnement dans la progression métastatique. De plus, dans le cadre du suivi de ces patients, on peut détecter une récurrence grâce à l'augmentation d'un

marqueur sanguin, le PSA (Prostate Specific Antigen). Malheureusement, la localisation des foyers de récurrence n'est possible qu'avec l'imagerie TEP-scan à la F-choline uniquement lorsque le taux de PSA est élevé.

Dans ce contexte, on va s'intéresser à deux points particuliers : le développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique et le développement d'une nouvelle technique d'imagerie multimodale permettant la détection des récurrences précoces du cancer de la prostate.

Pour l'approche thérapeutique, notre unité développe une nouvelle stratégie thérapeutique bi-spécifique qui vise à exploiter les caractéristiques du microenvironnement (hypoxie et protéoglycanes). Pour cela, une prodrogue activable en hypoxie et vectorisée vers les protéoglycanes a été synthétisée et sélectionnée sur la base de son activité *in vitro*. Cette prodrogue a déjà montré son efficacité pour le traitement du chondrosarcome.

Pour les approches diagnostiques, notre laboratoire, participe à une collaboration qui consiste à développer des nanoparticules au cœur de fluorure dopé par des ions de lanthanide permettant la réalisation d'imagerie fluorescente. Ces nanoparticules sont fonctionnalisables pour permettre le ciblage du PSMA, antigène surexprimé par des cellules cancéreuses de prostate.

Les objectifs de cette étude seront répartis en trois phases: (i) détermination de l'efficacité antitumorale de la prodrogue, comparativement à son équivalent non vectorisé et à un groupe contrôle ainsi que l'évaluation des effets indésirables suite au traitement et la caractérisation de l'activité anticancéreuse sur les tumeurs. L'efficacité antitumorale de la prodrogue sera déterminée sur un modèle de cancer de la prostate humain (LNCaP-Luc) implanté en sous cutanée sur des souris de type NMRI-Nude (Foxn1 nu/ Foxn1nu) : 8 souris par groupe seront utilisées, pour un total de 24 souris nécessaires; (ii) étude de la tolérance des nanoparticules sur des souris saines et porteuses de tumeurs de prostate. La tolérance des nanoparticules sera évaluée après injection sous cutanée, intra musculaire et intraveineuse chez des souris saines de type NMRI-Nude (Foxn1 nu/Foxn 1nu) ainsi que des souris porteuses de tumeurs de cancer de la prostate (LNCaP-Luc). La biodistribution des nanoparticules sera évaluée chez des souris saines de type NMRI-Nude (Foxn1 nu/FOXn1 nu) et des souris C57Bl6 à différents temps. Pour cela un total de 31 souris seront nécessaires : 10 pour les tests de tolérance et 21 pour l'étude de biodistribution. (iii) développement de deux nouveaux modèles précliniques pour le cancer de la prostate : un modèle de xénogreffes sous cutanées après injection de sphéroïdes de cellules LNCaP-Luc et un modèle orthotopique permettant de se rapprocher au plus près du microenvironnement tumoral retrouvé chez les patients. 15 souris seront étudiées pour le modèle xénogreffe avec des sphéroïdes et 10 pour le modèle orthotopique.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Concernant le Raffinement, une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée en surveillant les points limites (Perte de poids, Œil clos, diarrhée...). Toute observation d'un de ces points limites conduira à la sortie de l'animal du protocole et à son euthanasie. Cette décision sera prise par le responsable du projet.

Au finale, ces études précliniques devraient permettre de démontrer l'efficacité de la double approche de sélectivité de la prodrogue pour la prise en charge du cancer de la prostate et d'évaluer la tolérance des nanoparticules *in vivo*. La mise au point de modèles précliniques plus proche de l'environnement tumoral prostatique permettra par la suite une meilleure évaluation de notre approche diagnostique et thérapeutique.

4527. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant de lutter contre des maladies de la peau, incluant dermatite atopique, psoriasis, allergies de contact. L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et est mis en œuvre à grande échelle au sein des laboratoires de pharmacologie. Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs et de porcs et ne peuvent être totalement remplacés par des méthodes alternatives. Même si des tests *in vitro* peuvent être réalisés au préalable afin de mettre en évidence les propriétés des substances testées, ces propriétés devront être confirmées *in vivo* dans des modèles animaux (étude du comportement de grattage, de l'évolution d'un érythème par exemple). L'utilisation d'animaux (rongeurs et porcs principalement) est donc indispensable. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substances pharmacologiques de façon à prédire leur efficacité clinique. Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à pouvoir interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et les traitements le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre de rongeurs et de porcs qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 2500 et de 180 respectivement. Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

4528. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant de lutter contre des maladies neurodégénératives incluant la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington ou contre les accidents vasculaires cérébraux tels que l'ischémie cérébrale.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et sont mises en œuvre à grande échelle au sein des laboratoires de neuropharmacologie. Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substances pharmacologiques sur le comportement animal de façon à prédire leur efficacité clinique. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque test a été optimisé de façon à pouvoir interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre de rongeurs qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 6150. Dans

le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

4529. La Giantine (Golgb1) est une large protéine à domaines coiled-coil qui se localise dans l'appareil de Golgi et joue un rôle dans l'organisation des saccules golgiens et le trafic vésiculaire. Les fonctions précises de Golgb1 dans le trafic intracellulaire sont cependant inconnues et restent à élucider en particulier dans les neurones où l'on sait que le transport axonal joue un rôle physiologique essentiel pour acheminer l'information nerveuse. Des données récentes de notre laboratoire indiquent que Golgb1 co-localise et interagit avec la Dymecline (Dym), autre protéine golgienne dont la déficience est responsable du syndrome de Dyggve-Melchior-Clausen. Le DMCS est une maladie autosomique récessive rare qui se caractérise par une ostéochondrodysplasie associée à une microcéphalie et un déficit intellectuel sévère. Nous disposons d'une souris invalidée pour Dym et nous disposerons dans les mois qui viennent d'une souris invalidée pour Golgb1.

Nos travaux actuels sur les souris Dym-/- indiquent que, comme cela pourrait bien être le cas aussi pour Golgb1, la Dymecline est impliquée à la fois dans l'organisation structurelle de l'appareil de Golgi et dans le trafic des vésicules entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. En 2011, une équipe japonaise a rapporté une mutation spontanée de Golgb1 chez le rat, induisant une ostéochondrodysplasie congénitale sévère avec une létalité quelques jours après la naissance liée à des difficultés respiratoires. Bien que son phénotype cérébral n'ait pas été analysé, les images publiées suggèrent une forte réduction de la boîte crânienne avec très probablement des anomalies du cerveau. Cependant, ce modèle n'est plus disponible et ne pourrait de toute façon pas être croisé avec nos souris Dym. A l'issue de la sélection de notre projet par l'appel d'offre PHENOMIN en mars 2014, un modèle de KO conditionnel de Golgb1 chez la souris a été créé.

A partir de ce KO conditionnel de Golgb1 (souris Golgb1-lox), nous prévoyons de générer dans un premier temps des animaux KO constitutifs par croisement avec une souris PGK-Cre. Dans l'hypothèse où le modèle résultant serait létal à la naissance, nous ne l'utiliserons que pour étudier les stades embryonnaires. Nous générerons également des souris où Golgb1 n'est inactivé que dans le système nerveux en croisant la souris Golgb1-lox avec une souris Nestin-Cre. Enfin, les souris Golgb1-Nestin seront croisées avec les souris Dym pour générer des double-mutants destinés à comprendre la relation entre Golgb1 et Dym dans le cerveau.

Dans chaque contexte, nous analyserons le phénotype cérébral des mutants et dériverons des cultures de cellules neurales primaires et de cellules souches embryonnaires (ES) à partir desquelles nous analyserons le trafic intracellulaire et la différenciation neurale. Dans chaque contexte aussi, nous aurons le souci permanent de respecter la règle des 3R : (i) Les procédures envisagées répondent toutes à une question réfléchie et justifiée scientifiquement, (ii) le nombre d'animaux par groupe sera limité à 20, (iii) des croisements raisonnés seront entrepris pour limiter le nombre de générations nécessaires à l'obtention des mutants conditionnels (cf plus bas), (iv) les animaux constitutifs et conditionnels seront obtenus par croisements avec des lignées PGK-Cre et Nestin-Cre partagées avec d'autres projets du laboratoire (v) aucun protocole douloureux ou stressant ni aucune chirurgie ne sont prévus, (vi) les animaux seront euthanasiés selon les procédures appropriées (cf paragraphe 3.3.3 et procédures expérimentales), (vii) enfin, bien que seulement complémentaires, des modèles in vitro pour mesurer le trafic intracellulaire sont prévus pour limiter là encore le nombre d'animaux (600 en total).

4530. Très peu de données anatomiques existent au cours de la croissance chez le poulet. Notre objectif est de mener une étude de développement des organes, tissus et os sur l'espèce gallus gallus domesticus, à l'aide des outils d'imagerie IRM et scanner. Pour cela nous utiliserons 20 mâles et 20 femelles que nous suivrons tous les deux mois de l'éclosion à l'âge adulte (30 semaines). A la suite du passage au scanner et IRM, des pesées régulières et des dosages sanguins seront réalisés afin de relier les données d'imagerie à des données métaboliques.

L'utilisation des animaux lors de nos expérimentations s'effectuera dans le respect de la règle des 3R :

-Remplacer : L'identification d'indicateurs qui relie composition corporelle et fertilité chez la poule ne peut s'effectuer qu'in vivo sur des animaux élevés et abattus en conditions usuelles de production. Les poules sont des animaux domestiques produites et élevées classiquement pour la production de viande ou d'œufs et qui sont aussi régulièrement utilisées pour des expérimentations à visée agronomique.

-Réduire : des expériences préliminaires ont été effectuées pour estimer le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de ce protocole.

-Raffiner : Toute intervention sur les animaux sera réalisée par un personnel compétent. Les animaux seront surveillés tous les jours y compris les week-ends. Le comportement, la prise alimentaire, et la croissance des animaux sont des indicateurs de leur état de santé. Les poules et les coqs seront séparés et élevés au sol dans des conditions comparables à celles d'élevages classiques.

4531. Dans le cadre de la collaboration des agences sanitaires, nous pouvons être conduits à effectuer des essais de sécurité.

Dans le cas de cette demande d'autorisation de projet, l'objet de la saisine est l'évaluation du potentiel sensibilisant de substances chimiques présentant des risques d'allergie et d'intolérance pour les consommateurs et susceptibles d'être présents, dans des articles textiles, dans les produits de santé type dispositifs médicaux.

Les premières investigations suites aux signalements de vigilances ont permis d'identifier des substances chimiques de la famille des azines. Devant la difficulté d'évaluation de la sécurité de ces substances très réactives, très utilisées en chimie, il a été convenu d'évaluer le potentiel sensibilisant de ces substances sur deux modèles pertinents qui font l'unanimité :

-le modèle réglementaire, le test du Local Lymph Node Assay (LLNA) sur souris, selon la norme OCDE 429 et 442 B.

-un modèle in vitro alternatif, le human Cell line Activation test (h-CLAT), qui doit être associé au test LLNA.

Le modèle in vivo reste le modèle validé et reconnu faisant l'objet d'un consensus général, un modèle in vitro sera associé pour mieux identifier le mécanisme.

La réalisation du test LLNA, nécessite l'acquisition de souris femelles consanguines, CBA et Balb/c jico de 7 à 12 semaines.

Les animaux sont hébergés selon les recommandations de la Directive UE 2010-63.

L'esprit de la règle des 3R est respecté au mieux des exigences du test : nombre restreint d'animaux, applications successives des produits qui permettent l'évaluation du traitement et l'arrêt en cas de nécessité.

10 essais sont prévus, à raison de 25 souris par essai, réparties par lot de 5 soit un total de 250 souris.

4532. Les consommateurs se soucient de plus en plus du ratio élevé acides gras saturés/acides gras insaturés des produits laitiers. En effet, les régimes riches en graisses saturées pourraient à long terme nuire à la santé, tandis que ceux riches en acides gras insaturés (de type oméga-3) pourraient réduire le risque de maladies cardio-vasculaires. L'intérêt pour modifier le profil en acides gras du lait est donc croissant. Des pistes ont été explorées dans le domaine de l'alimentation des vaches laitières. Cependant, hormis les travaux publiés sur le gène DGAT1, il existe peu de données sur la variabilité génétique des acides gras du lait. L'objectif de ce projet est donc de mieux comprendre la variabilité génétique de la composition en acides gras des laits.

Des données récentes montrent que le gène de la bêta-lactoglobuline affecte également la teneur en acides gras insaturés des laits. Le présent projet vise à expliquer le rôle de cette lactoprotéine dans la composition en acides gras du lait. Il s'agira de phénotyper les profils en acides gras et en protéines des laits et de caractériser les interactions entre la beta-lactoglobuline, les acides gras et la cellule épithéliale mammaire. Cela permettrait d'apporter des arguments sur la fonction de la beta-lactoglobuline au sein de la cellule mammaire pour (à terme) évaluer les possibilités d'améliorer, par la sélection, les propriétés nutritionnelles de la matière grasse laitière.

Dans l'essai qui sera conduit, des laits de vaches seront prélevés à stade de lactation et niveau d'alimentation connus. Les analyses de laits seront répétées sur 12 individus de génotypes différents pour la beta-lactoglobuline et le gène DGAT1, qui impactent la biosynthèse des acides gras du lait et celle des lactoprotéines. Des biopsies mammaires pratiquées sur 2 individus à même stade de lactation mais de génotypes extrêmes permettront d'analyser la fonction de la beta-lactoglobuline dans la mamelle.

Remplacement : il n'est pas possible de réaliser cette étude autrement que sur des vaches en lactation.

Réduction : le nombre d'animaux a été réduit au maximum en choisissant de prélever des vaches de génotypes extrêmes afin de constituer des échantillons très contrastés pour la composition en acides gras insaturés. Ces échantillons peuvent alors faire l'objet d'analyses approfondies. Nous avons privilégié les prélèvements sur le lait.

Raffinement : la conduite d'élevage sera une conduite classique respectueuse du bien-être des animaux. Chaque procédure de prélèvement d'échantillons biologiques sera accompagnée par une procédure analgésique et anesthésique adaptée et un suivi du comportement des animaux.

4533. Les objectifs de ce projet sont de valider in vivo la pertinence de plusieurs cibles moléculaires dans les cancers du sang de type leucémie aiguë. Nos résultats in vitro nous laissent penser que ces molécules exprimés par les cellules tumorales pourront s'avérer des cibles thérapeutiques. La confirmation de l'importance de ces molécules dans les leucémies nécessite l'utilisation d'un modèle in vivo afin de les valider et ainsi de proposer un essai clinique chez les patients leucémiques.

Le recours au modèle animal se justifie car il n'existe pas de modèle in vitro ou in silico permettant de reproduire la complexité du processus étudié. Il est en effet impossible de maintenir en culture les cellules à l'origine des leucémies.

De plus, nous prenons pleinement en compte les objectifs de réduction et de raffinement de la règle des 3R :

1) Le nombre d'animaux a été calculé par rapports aux questions posées et au nombre optimal pour valider statistiquement les résultats quantitatifs obtenus. Nous prévoyons d'utiliser 25 souris pour chaque expérience avec 5 souris permettant d'obtenir des résultats quantitatifs moyennés et ainsi une interprétation statistique par trois répétitions. Comme nous avons à ce jour 3 cibles identifiées (3 kinases : AXL, LYN et SYK) nous utiliserons au maximum 450 souris sur 3 ans.

2) Seules les procédures expérimentales strictement nécessaires seront mises en œuvre. Les procédures de greffe (administration de substance) et de prélèvements (moelle, sang) seront faites sur animaux analgésiés et anesthésiés. Les cellules greffées à l'animal pourraient provoquer une leucémie. L'estimation de la souffrance sera réalisée par le personnel de l'animalerie quotidiennement. Des points limites claires détaillées ci-après seront mise en place pour éviter toutes souffrances animale.

Deux approches in vivo seront utilisées. Premièrement la greffe sous-cutanée pour tester la prolifération des cellules cancéreuses et leur réponse au traitement. Deuxièmement, la greffe hématopoïétique par voie intraveineuse nécessitant une myéloablation au préalable sur de femelles, l'injection des cellules, le suivi de la maladie et de la réponse.

4534. La tétraploïdie est une aberration génétique survenant dans les premiers stades du cancer. Cette modification conduit à la formation de cellules ayant doublé leur nombre de chromosomes et qui sont dans un état intermédiaire entre la diploïdie (cellules avec un contenu en chromosomes normal) et l'aneuploïdie (cellules que ne possèdent pas le nombre normal de chromosomes) caractéristique des cellules tumorales de mauvais pronostic. Nous avons démontré que les cellules tétraploïdes (cellules avec le double de chromosomes que la normale) cancéreuses sont plus résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie comparativement aux cellules diploïdes cancéreuses. De plus, nous avons prouvé que le système immunitaire peut reconnaître et détruire les cellules tétraploïdes, empêchant ces cellules génératrices de cancer de se propager et de générer des cellules aneuploïdes. Néanmoins, les facteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans cette reconnaissance ne sont pas encore élucidés.

Ce projet vise à étudier quels sont les effecteurs cellulaires et moléculaires spécifiques du système immunitaire impliqués dans la reconnaissance de cellules tétraploïdes cancéreuses. Pour cela nous allons utiliser un modèle de greffes syngéniques chez la souris. C'est-à-dire, nous allons utiliser des clones (cellules identiques les unes aux autres) diploïdes et tétraploïdes développés à partir d'une même lignée cellulaire et les injecter en sous-cutané dans de souris compatibles génétiquement à ces cellules pour éviter le rejet du greffe.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. Etant donné que l'objectif de notre travail est d'identifier les effecteurs du système immunitaire responsables de la reconnaissance des cellules tétraploïdes cancéreuses, nous avons besoin de réaliser des expériences in vivo chez la souris, notamment moyennant un modèle de greffe de cellules diploïdes versus cellules polyploïdes, donc nous avons besoin d'un organisme entier, ayant les caractéristiques de souris immunocompétentes ou immunodéficientes.

Ce projet nécessitera au maximum 8160 souris, si nous avons besoin de doubler certains groupes de la procédure. Ce nombre d'animaux se justifie par la grande diversité de facteurs cellulaires et moléculaires du système immunitaire à étudier. Nous allons utiliser des souris déficientes pour chacun de ces facteurs et/ou nous allons les réduire de façon chimique à des souris immunocompétentes. Des souris contrôles seront utilisées pour montrer l'efficacité de nos modèles.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Ces expériences ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants, car le recours à un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur est nécessaire et parce qu'il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire ex-vivo du fait de sa complexité. Les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Le nombre de souris par lot a été calculé par des méthodes de calcul de puissance (avec un seuil de 5% et une puissance de 90%). Enfin, nous pourrions utiliser moins de souris si nous trouvons une significativité avec moins de souris. De plus, nous chercherons à regrouper les expérimentations dans le but de garder un nombre minimum d'animaux pour les groupes contrôles. 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'angoisse (L'environnement sera enrichi par des cocoons en tout temps). Les animaux immunodéficients seront hébergés dans des portoirs ventilés en conditions stériles. Afin de soulager l'inconfort, et l'angoisse que les souris peuvent subir au moment des injections sous-cutanées, nous allons les anesthésier à l'isoflurane.

4535. Malgré les progrès considérables accomplis ces trente dernières années, les techniques de recouvrement dermiques restent insatisfaisantes en termes cicatriciels, de fonctionnalités et de coûts.

L'objectif de ce projet est la mise au point d'une nouvelle génération de dermes équivalents à partir de biomatériaux innovants à base de fibrine. L'originalité de ces matériaux réside en ce qu'ils sont élaborés à partir de réseaux interpénétrés de polymères faisant d'eux des matériaux autosupportés qui ne se rétractent pas. Ces propriétés leur offrent des perspectives intéressantes en médecine régénératrice. Les dermes équivalents développés pour ce projet sont ainsi destinés à être utilisés en clinique pour la reconstruction de peaux complètes ainsi qu'en tant que produits de comblement pour l'augmentation de tissus mous.

Ce projet ambitionne de répondre sur le court terme au besoin actuel en médecine régénératrice en mettant au point des substituts dermiques commercialisables. Après avoir caractérisé biologiquement et physiquement les matrices de fibrine et avoir testé leur biocompatibilité in vitro (culture cellulaire 2D et 3D), il est désormais nécessaire d'évaluer leur biocompatibilité in vivo afin de répondre à la norme ISO-10993 relative à l'évaluation biologique des dispositifs médicaux.

L'ensemble de ce projet se déroulera en accord avec les 3 Rs (remplacement, raffinement, réduction). Pour cette étude, la souris, mammifère reconnu comme moins sensible que le singe ou le chien mais permettant d'obtenir des résultats fiables, a été choisie (remplacement). Conformément à la norme les essais précliniques seront donc menés sur des souris athymiques (nude) et consisteront en l'implantation sous-cutanée des matrices de fibrine. Le volume de ces matrices étant relativement faible, elles ne devraient occasionner que peu de douleurs. Cependant, afin de minimiser toutes angoisses, souffrances ou douleurs, un ensemble de procédures (enrichissement du milieu, antalgiques, anesthésies basés sur des marqueurs précoces) ont été établis (raffinement). En outre, nos protocoles expérimentaux ont été rédigés dans le but de diminuer au minimum le nombre d'animaux impliqués comme par exemple en permettant l'implantation de plusieurs matrices par individu (réduction). Fort de ces éléments, le nombre minimal d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats fiables et statistiquement significatifs a été calculé et correspond à 60 souris pour l'ensemble de l'étude auxquelles s'ajoutent 10 animaux surnuméraires pour compenser d'éventuelles exclusions liées à des événements imprévus. Le nombre total d'animaux pour ce projet est de 70.

4536. Comme tout cancer, les leucémies se développent via l'accumulation de changements génétiques précis. Les leucémies myéloïdes aiguës sont une classe hétérogène des leucémies de l'âge adulte. Avec le vieillissement progressif de la population, leur fréquence est destinée à augmenter et elles seront sans doute un problème majeur de santé publique dans les années à venir. Comprendre leur origine et leurs caractéristiques moléculaires sera donc de grande utilité pour une meilleure prise en charge des patients. Notre objectif est de définir quels changements génétiques sont importants lors de l'initiation et de la progression d'une des formes de leucémie myéloïde aiguë. Nous disposons d'une lignée de souris qui surexprime le facteur de transcription Spi-1, facteur qui contrôle la différenciation hématopoïétique. La surexpression de Spi-1 conduit au développement rapide d'une anémie et d'une splénomégalie (étape pré-leucémique). Nous avons observé que la combinaison, dans une même souris, de la perte du gène de la protéine Fanca, qui participe au contrôle du bon déroulement du processus de réplication du matériel génétique, et de la surexpression du facteur de transcription Spi-1, conduit au développement d'une leucémie agressive. Notre objectif est d'utiliser

ces souris génétiquement modifiées pour découvrir les altérations géniques somatiques subséquentes associées à la transformation tumorale, dans le contexte de ces souris développant une leucémie.

Pour ce projet il est indispensable d'utiliser des animaux car le projet porte sur l'identification des mécanismes de prédisposition au cancer et sur le suivi du processus de développement tumoral dans l'organisme entier. Aucun autre modèle biologique n'apporte le même niveau d'information: les données in vitro que nous avons obtenues sont incomplètes car, dans le processus étudié, les facteurs environnementaux (cytokines, facteurs de croissance, autres cellules) exercent un rôle extrêmement important, et ceci ne peut être mesuré, avec toutes les interactions, que dans un organisme vivant entier. Les résultats préliminaires sur la base desquels ce projet a été établi sont encourageants et ont été obtenus in vitro par des expériences sur des cultures de cellules humaines et murines. C

Au vu des premiers résultats encourageants, nous proposons de démontrer l'implication de deux facteurs (protéines Fanca et Spi-1) dans le processus leucémique dans un modèle de souris génétiquement modifiée. Les expérimentations in vivo nous permettront de démontrer clairement l'action tumorigène de ces deux facteurs, le processus étudié de tumorigenèse s'appliquant à des organismes vivants dans leur intégrité et leur complexité. Notre objectif est d'utiliser les souris génétiquement modifiées pour découvrir les altérations géniques associées à la transformation tumorale.

Nous mettrons en œuvre deux procédures utilisant, la première: 160 souris, et la deuxième: 50 souris, soit un nombre total maximum de 210 animaux. Afin de limiter la souffrance au minimum, les animaux seront suivis 2 fois par jour et les mesures de soins palliatifs ou d'arrêt seront mises en place dès que les points limites que nous avons définis seront atteints. Toutes les injections seront faites sous anesthésie, et les animaux génétiquement modifiés ou expérimentés seront examinés deux fois par jour.

Nous avons prévu un seul groupe contrôle commun aux deux groupes d'animaux étudiés, ceci est un point de réduction. Nous avons aussi envisagé d'optimiser les données obtenues sur chaque animal en analysant simultanément plusieurs organes du même animal, ce qui est un point de réduction et de raffinement (optimisation).

4537. A l'aide d'approche in vitro (tests cellulaires sur 4 lignées tumorales, analyses moléculaires), nous avons identifié une molécule biologique, appelée miR-4510, qui agit comme un gène suppresseur de tumeur dans le cancer du foie chez l'adulte et chez l'enfant. Cette molécule inhibe l'activité de plusieurs oncogènes et bloque la croissance des cellules tumorales tout en induisant leur mort par apoptose. Nous avons également découvert que l'association de miR-4510 et du sorafenib entraîne la mort d'un nombre plus important de cellules tumorales par rapport à chaque molécule utilisée seule, sachant que le Sorafenib est le seul traitement chimiothérapeutique disponible en clinique pour traiter les patients adultes atteints d'un cancer du foie non-opérable. Ces résultats soulignent l'intérêt potentiel de miR-4510 en clinique et de son association éventuelle avec le sorafenib. Les résultats in vitro de notre étude ont fait l'objet d'un brevet et la SATT locale, Aquitaine Science Transfert, finance la partie « étude in vivo chez l'animal ». Ce projet, originellement financé par l'INCa, est également soutenu par le programme MATWIN qui vise à accélérer le transfert de molécules thérapeutiques vers les industriels et les patients à travers des études précliniques puis des essais cliniques.

Les objectifs de ce projet sont (i) de confirmer que miR-4510 est bien capable de bloquer la croissance tumorale et d'induire la mort des cellules cancéreuses du foie par apoptose dans un modèle in vivo chez la souris et (ii) d'évaluer le bénéfice d'une association miR-4510 + sorafenib. L'évaluation du potentiel thérapeutique de miR-4510 sera comparée à celle d'un petit ARN contrôle et à celle de l'association miR-4510+sorafenib. Pour répondre à cette question, nous utiliserons le modèle de xénogreffe sous-cutanée de cellules tumorales de carcinome hépatocellulaire chez la souris immunodéprimée. La lignée cellulaire utilisée sera la lignée cancéreuse hépatique « Hep3B » pour sa pertinence comme modèle cellulaire et la bonne reproductibilité des tumeurs sous-cutanées qui se développent chez la souris à partir de ces cellules.

Les microARNs, une famille de molécules à laquelle appartient miR-4510, sont des molécules biologiques et après plusieurs années d'étude et de nombreuses analyses chez la souris, aucun effet toxique de ces molécules n'a été observé chez l'animal. Le sorafenib a lui aussi été largement utilisé chez l'animal avant son transfert vers la clinique. Les conditions d'utilisation tiendront compte des travaux réalisés précédemment.

Pour réaliser l'ensemble de nos expériences, nous demandons l'utilisation de 100 animaux. Dans le respect de la règle des 3R et afin de réduire le nombre global d'animaux, deux lots contrôles (souris non traitées et souris traitées avec le système de vectorisation des petits ARNs seul) seront parallèlement comparés à trois lots Tests (microARN d'intérêt, microARN d'intérêt + Sorafenib et microARN de référence). De plus, cette étude se fera de façon longitudinale sur les mêmes animaux, sans en inclure d'avantage au cours de l'expérimentation. Le nombre d'animaux par lot (20) est donc cohérent avec le design expérimental et est suffisant pour réaliser des analyses statistiques solides et fiables. Des études préliminaires sur cultures cellulaires ont été réalisées et ont largement validé l'effet antitumoral du microARN. A cette étape de l'étude, il n'est donc pas possible de se passer de l'utilisation d'animaux et de les remplacer par une autre approche expérimentale.

Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance jusqu'à leur mort. Toute procédure légère ou moyenne (aucune sévère prévue dans ce projet) sera réalisée sous anesthésie et sous surveillance attentive des animaux dans un environnement enrichi et adapté aux animaux. L'estimation de la souffrance est réalisée quotidiennement par le personnel de l'animalerie. Les critères utilisés sont ceux de Lloyd et al. (Lab Animal 1998). Le score limite est de 14 (voir fichier « Points limites »). Au-delà l'animal sera mis à mort (euthanasie par dislocation cervicales) sans attendre.

De façon plus précise, si le score est inférieur à 5, les animaux sont surveillés sans autre intervention. Si le score est entre 5 et 10, les animaux seront surveillés de près et nous considérerons la prise d'analgésique comme une option pour limiter au maximum les souffrances éventuelles sans perturber les mesures. Si le score est entre 10-14, ce sera le signe d'une souffrance de l'animal évidente. Un deuxième avis sera demandé auprès d'un chercheur ayant utilisé ce même modèle et les moyens pour palier la

souffrance seront mis en place par le biais d'analgésiques. Si le score s'améliore, les expérimentations seront maintenues. Dans le cas contraire, les animaux seront mis à mort (euthanasie par dislocation cervicales), sans attendre.

4538. La sclérose en plaque est une maladie très invalidante, inflammatoire et auto-immune qui est définie par la destruction de la gaine de myéline entourant les neurones dans le système nerveux central. Cette gaine de myéline est cruciale pour la communication nerveuse. De ce fait, sa destruction entraîne des troubles moteurs et cognitifs. L'étiologie de cette maladie est très mal connue mais une molécule semble être positivement impliquée.

une molécule membre de la famille des tumor necrosis factor est connu pour améliorer la survie des plasmocytes, les cellules produisant les anticorps.

Des données préliminaires du laboratoire suggèrent un rôle neuroprotecteur de notre molécule d'intérêt. On souhaite donc pouvoir étudier l'effet de la molécule dans cette maladie, et pour cela nous utiliserons un modèle de souris de sclérose en plaque induite appelé encéphalite auto-immune et bien décrit dans la littérature scientifique. Actuellement, la seule manière d'évaluer l'évolution de la maladie chez ses souris est le monitoring du score clinique selon l'apparition des différents symptômes. C'est pourquoi dans ce projet, nous proposons d'évaluer directement les lésions du système nerveux central via l'IRM à la fois dans le cerveau et au niveau de la moelle épinière chez des souris après injection de la molécule d'intérêt. Notre objectif pour cette demande est de pouvoir évaluer l'évolution de la maladie chez les souris d'une autre manière que celle de l'évaluation du score clinique

Le projet est composé de 2 procédures expérimentales et requerra l'utilisation d'un maximum de 180 souris au total sur 5 ans.

Nous avons pensé notre approche en respectant la méthode des 3R.

Réduction: Ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

Raffinement: le projet implique la mise en place d'un état pathologique chez le rongeur de classe modéré. Cependant, 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. Remplacement: Ce projet a pour but d'évaluer par IRM les lésions du SNC après injection de notre molécule d'intérêt dans les souris atteintes d'encéphalite auto-immune. De ce fait, il est impossible de remplacer notre préparation in vivo par un modèle cellulaire ou une simulation computationnelle. L'utilisation de ce modèle à cette étape est indispensable.

4539. Le virus de la fièvre de la vallée du Rift (vFVR) est responsable d'une maladie infectieuse grave chez les ruminants (ovins, bovins, caprins) mais également chez l'homme. Chez les animaux, la FVR entraîne des taux de mortalité chez les nouveau-nés ainsi que des avortements chez les femelles gestantes extrêmement élevés. Chez l'homme, les symptômes peuvent être bénins (fièvre, douleurs musculaires, maux de tête) à sévères (hépatite fulminante parfois associée à une hémorragie ou des lésions oculaires). Les épidémies périodiques de FVR sont principalement localisées en Afrique sub-saharienne, mais elles se sont étendues plus récemment à la péninsule arabique (Arabie Saoudite et le Yémen, 2000), Madagascar (2008) et l'Afrique du Sud (2010) avec d'importantes pertes économiques et des milliers de morts humains. L'émergence récente de plusieurs viroses venues d'autres continents met en évidence le risque d'introduction du vFVR en Europe, à la faveur de l'intensification des échanges internationaux mais également du fait de la présence d'espèces de vecteurs compétents (moustiques du genre aedes et culex) pour la transmission de ce virus.

La vaccination est un moyen très efficace de prévention des maladies infectieuses. Il existe plusieurs types de vaccins à usage vétérinaire contre la FVR (virus vivants atténués ou virus inactivés). La vaccination plasmidique (ou ADN nu) est un mode alternatif de vaccination qui présente de nombreux atouts. Il s'agit d'inoculer au mammifère un plasmide codant pour un antigène vaccinal, qui induit une réponse immunitaire et protectrice contre un agent pathogène. Cette présente DAP s'inscrit dans la continuité de la précédente DAP (15-080). L'objectif de ce projet est de poursuivre les tests des candidats vaccins plasmidiques contre le virus de la fièvre de la vallée du rift (FVR) chez la souris et d'évaluer le pouvoir immunogène et la protection induite par ces vaccins chez cet animal. Des études préalables in vitro ont montré une très bonne expression des antigènes viraux à partir des plasmides que nous allons tester. Au vu des résultats déjà obtenus, il nous semble intéressant d'intégrer dans cette nouvelle DAP une procédure de transfert passif permettant d'évaluer plus précisément quels types de réponses (T ou B) sont impliqués dans la protection des souris.

Le projet portant sur la vaccination, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Le projet prévoit le recours à un maximum de 504 souris provenant d'élevages autorisés sur les 2 ans. Le suivi clinique des animaux sera réalisé tout au long des expériences et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur éventuel. Lors de l'administration des vaccins, les souris seront toutes anesthésiées à l'isoflurane pour éviter tout inconfort. La grille nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance (un point limite a été fixé). Si une inflammation aigue avec début de nécrose était observée de manière inattendue après l'immunisation, les souris concernées seraient euthanasiées.

4540. La carence martiale, c'est à dire la diminution des réserves en fer de l'organisme, constitue le déficit nutritionnel le plus répandu dans le monde. Sa prévalence est augmentée chez les patients, en particulier en chirurgie, réanimation et chez les patients insuffisants cardiaques. Cette carence martiale peut être responsable d'une anémie si elle se prolonge, mais également de l'apparition d'une fatigue, même en l'absence d'anémie. Des études récentes ont montré l'intérêt de la correction de cette carence

par le traitement en fer pour diminuer la fatigue, et chez l'insuffisant cardiaque, pour améliorer les symptômes, la distance de marche et la qualité de vie.

Les mécanismes expliquant le rôle propre de la carence martiale dans le développement d'une fatigue musculaire et cardiaque restent mal connus. Le fer est un constituant majeur des mitochondries, au sein des cytochromes et des protéines fer-soufre des complexes de la chaîne respiratoire, nécessaires à la production d'énergie. La fatigue liée à la carence martiale pourrait donc être secondaire à une altération de ce métabolisme mitochondrial.

De même, le bénéfice et l'innocuité du traitement martial sur la récupération physique et sur le métabolisme mitochondrial restent à explorer. Le fer, élément indispensable à la vie, est aussi potentiellement toxique par sa capacité à créer du stress oxydant. La connaissance précise de l'impact de ce traitement sur ces différentes fonctions pourrait élargir ses indications afin d'améliorer la fatigue physique et la récupération des patients.

Les objectifs de notre étude, après mise au point d'un modèle murin de carence martiale sans anémie, sont d'évaluer : - le rôle propre de cette carence sur la fatigue musculaire

- les modifications de la fonction cardiaque
- les modifications du métabolisme mitochondrial musculaire squelettique et myocardique
- les modifications histologiques myocardiques
- l'effet du traitement martial sur ces différentes fonctions

Un modèle animal est nécessaire pour évaluer l'impact de la carence martiale sur la fonction musculaire et myocardique, en particulier pour réaliser les tests physiques. Des souris mâles C57BL/6 âgées de 8 semaines seront utilisées pour l'étude et seront séparées en un groupe « carence martiale » recevant une alimentation pauvre en fer et un groupe contrôle recevant une alimentation normale. Au total, 170 souris seront nécessaires pour obtenir le modèle murin de carence martiale sans anémie et y réaliser les expérimentations. Le nombre d'animaux dans chaque sous-groupe sera réduit à son minimum pour pouvoir réaliser les différentes expérimentations et examens biologiques (entre 6 et 10 par sous-groupe selon les techniques). L'utilisation des organes prélevés sera optimisée (un même organe sera utilisé pour différentes techniques dès que possible). Pour limiter l'apparition de douleur ou de souffrance, les souris seront surveillées quotidiennement et pesées une fois par semaine. Un arrêt de l'expérimentation aura lieu en cas d'apparition de ces signes.

Ce projet devrait nous permettre de mieux comprendre les liens entre carence martiale, fatigue musculaire, insuffisance cardiaque et métabolisme mitochondrial. Nous espérons obtenir une amélioration de ces différents paramètres avec le traitement martial. Ces données ouvriront des perspectives de recherche dans plusieurs domaines (cardiologie, péri-opératoire...).

4541. Le virus de la fièvre de la vallée du Rift (vFVR) est responsable d'une maladie infectieuse grave chez les ruminants (ovins, bovins, caprins) mais également chez l'homme. Chez les animaux, la FVR entraîne des taux de mortalité chez les nouveau-nés ainsi que des avortements chez les femelles gestantes extrêmement élevés. Chez l'homme, les symptômes peuvent être bénins (fièvre, douleurs musculaires, maux de tête) à sévères (hépatite fulminante parfois associée à une hémorragie ou des lésions oculaires). Les épidémies de FVR sont principalement localisées en Afrique sub-saharienne, mais elles se sont étendues à la péninsule arabique (Arabie Saoudite et le Yémen, 2000), Madagascar (2008) et l'Afrique du Sud (2010) avec d'importantes pertes économiques et des milliers de morts humains. L'émergence récente de plusieurs viroses venues d'autres continents met en évidence le risque d'introduction du vFVR en Europe, à la faveur de l'intensification des échanges internationaux mais également du fait de la présence d'espèces de vecteurs compétents (moustiques du genre aedes et culex) pour la transmission de ce virus

La vaccination est un moyen très efficace de prévention des maladies infectieuses. Il existe plusieurs types de vaccins à usage vétérinaire contre la FVR (virus vivants atténués ou virus inactivés). Le vecteur poxvirus recombinant (MVL : Modified Vaccinia Lister) a été développé et breveté sur la base du vaccin antivariolique. Certaines mutations similaires à celles observées sur le candidat vaccin MVA (Modified Vaccinia Ankara) ont été reproduites afin d'augmenter l'innocuité du vaccin antivariolique et créer ainsi des zones de délétions pouvant servir à l'insertion de gènes exogènes. Ce vecteur recombinant a donc été utilisé pour développer des candidats vaccins FVR.

L'objectif du présent projet est de tester ces candidats vaccins MVL-FVR chez la souris et d'évaluer le pouvoir immunogène et la protection induite par ces vaccins chez cet animal.

Deux candidats vaccins MVL-FVR ont déjà été développés : le MVL-FVR-NP exprimant la nucléoprotéine du vFVR et le virus MVL-FVR-eGn, exprimant l'ectodomaine de la glycoprotéine Gn du vFVR. Différents schémas vaccinaux seront testés et pour chaque schéma vaccinal, deux critères seront évalués : l'immunogénicité (humorale et cellulaire) et la protection contre une épreuve létale avec le vFVR. Les schémas vaccinaux évalués porteront sur une vaccination avec un candidat vaccin seul ou une combinaison des deux candidats vaccins. Une seule dose sera évaluée pour la vaccination, basée sur la vaccination antivariolique.

Le projet portant sur la vaccination, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Le projet prévoit le recours à un maximum de 240 souris provenant d'élevages autorisés sur les 5 ans. Le suivi clinique des animaux sera réalisé tout au long des expériences et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur éventuel. Lors de l'administration des vaccins et du virus d'épreuve, les souris seront toutes anesthésiées à l'isoflurane pour éviter tout inconfort. La grille nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance aussi bien lors de la phase d'immunisation que de la phase d'épreuve virale (un point limite a été fixé).

4542. La fibrose pulmonaire est une pathologie qui conduit à un dysfonctionnement des organes et une insuffisance respiratoire, ceci a un impact considérable sur la qualité de vie. Malgré une avancée majeure dans ce domaine, il est nécessaire d'améliorer davantage nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la fibrose pulmonaire, afin d'améliorer le management

thérapeutique de cette pathologie ainsi que la qualité de vie des patients. Plusieurs facteurs peuvent causer la fibrose pulmonaire, entre-autre les traitements anti-cancéreux (la radiothérapie et la chimiothérapie). En effet les données cliniques montrent que les patients guéris de leurs cancers développent à long terme une fibrose au niveau du site ayant reçu la radiothérapie et dans la plus part des cas ses patients décèdent suite aux complications causées par la fibrose (ex: insuffisance respiratoire dans le cas de la fibrose pulmonaire ou insuffisance cardiaque dans le cas de la fibrose cardiaque). Des études ultérieures avaient bien mis en évidence les facteurs cellulaire et moléculaire impliqués dans la fibrogénèse et qui sont le fibroblaste et le TGF β 1 respectivement. Cependant, des études récentes ont suggéré un rôle des macrophages en tant que régulateurs cellulaires critiques de la fibrose pulmonaire et en particulier les macrophages polarisés M2 qui produit de grandes quantités de TGF β 1. De manière intéressante, il a été démontré que la fibrose pulmonaire induite par les irradiations est souvent associée à une importante infiltration de macrophages. Cependant le profil des macrophages ainsi que leur implication dans le processus de fibrose radio-induite n'ont jamais été déterminés.

L'objectif de ce projet est de : 1/Caractériser le profil des macrophages qui infiltrent la fibrose pulmonaire, 2/déterminer le rôle des macrophages dans le développement de la fibrose pulmonaire, 3/ évaluer si les macrophages constituent une cible thérapeutique potentielle pour prévenir le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite.

La radiothérapie et la chimiothérapie engendrent des effets secondaires sévères aux niveaux des tissus sains comme la fibrose, provoquant ainsi la perte de fonction de l'organe touché. Une avancée importante dans ce domaine va permettre d'améliorer la qualité de vie des patients guéris de leurs cancers. Afin de pouvoir comprendre la pathologie de fibrose et proposer des solutions thérapeutiques, le recours à l'utilisation d'un modèle animal (organisme vivant entier) est nécessaire et indispensable du fait que la fibrose est un processus physiopathologique qui implique plusieurs composantes cellulaires et moléculaires. De plus, l'efficacité des molécules thérapeutiques ne peut se vérifier que sur un modèle *in vivo*.

Nous avons mis en place des stratégies d'expérimentation et d'observation afin de réduire au minimum la souffrance et la douleur des animaux. En effet, l'induction de fibrose par des rayonnements ionisants sera pratiquée sous anesthésie générale de la souris afin de réduire au minimum la souffrance et l'angoisse des animaux. Les souris seront hébergées en groupe pour minimiser le stress de l'isolement. L'environnement des animaux sera enrichi en permanence par du coton ou des nids en carton afin de diminuer leur angoisse et favoriser leur bien-être. Une pesée sera effectuée régulièrement. Les points limites seront strictement appliqués.

Le nombre d'animaux sera adapté pour atteindre les objectifs du projet et réduire au minimum le nombre d'animaux. En effet, une analyse statistique *a priori* a été effectuée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaires pour détecter des différences significatives et qui permet de réduire au minimum le nombre d'animaux, qui a été estimé au maximum à 482 souris.

4543. Dans les pathologies neurodégénératives Alzheimer (AD) ou Parkinson (PD), les protéines respectives amyloid protein precursor APP (AD) et α -synucléine (PD), fixant habituellement le cuivre et permettant par réduction de ce métal de l'état cuivrique Cu⁺⁺ à l'état cuivreux Cu⁺ une protection contre les effets délétères des radicaux libres, ne sont plus en mesure d'assurer cette protection, suite à un déficit cérébral en cuivre. Dans ces maladies neurodégénératives une diminution de la teneur en cuivre a en effet été montrée au niveau du cortex et de l'hippocampe pour AD, et au niveau du locus niger pour PD. Ce déficit en cuivre s'accompagne d'une augmentation en fer et en zinc dans le cortex et l'hippocampe pour AD et dans le locus niger pour PD. Les radicaux libres n'étant plus détruits, il s'en suit une destruction neuronale régionale sélective qui affecte de manière précoce les systèmes neurotransmetteurs prépondérants dans ces régions à savoir les systèmes cholinergique et glutamatergique pour AD et le système dopaminergique pour PD. Les radicaux libres qui ne sont plus détruits vont aussi être capables de générer dans les structures protidiques, par un mécanisme de réactions radicalaires en chaîne, la transformation d'acides aminés de la conformation L à la conformation D générant des peptides non recyclables par le protéasome qui vont alors se déposer au niveau du cerveau sous forme anormale d'amas neurofibrillaires (neurofibrillary tangles) ou de feuillettes β (β -amyloïde).

Objectifs

Pour restaurer la protection radicalaire cuivrique des métalloprotéines APP et α -synucléine il importe de déplacer le fer et le zinc anormalement présents dans ces métalloprotéines APP et α -synucléine par du cuivre au niveau du cortex, de l'hippocampe ou du locus niger. On se propose de vérifier chez le rat le passage au travers de la barrière hémato-encéphalique de différents complexes cuivriques marqués au ⁶⁴Cu. Ce radionucléide qui est un émetteur β^+ de période courte (T_{1/2}=12,7 heures) permettra de visualiser par imagerie de positon (TEP scan) la localisation cérébrale du ⁶⁴Cu et de sélectionner des vecteurs spécifiques du cuivre vers ces différentes régions cérébrales, le but final de ce travail étant de proposer des thérapies préventives cuivriques sélectives contre les effets délétères des radicaux libres dans les affections neurodégénératives AD ou PD.

Nous étudierons par TEP-scan le passage de 18 complexes de cuivre marqués au ⁶⁴Cu. Chaque complexe sera injecté par voie intraveineuse à 10 rats. L'ensemble des procédures se déroulera sous anesthésie générale. Le nombre d'animaux fixé pour l'ensemble de l'expérimentation est donc de 180 rats.

Ce projet est conçu dans le respect de la règle des 3 R :

Remplacement : l'évaluation du transfert des molécules au travers de la barrière hémato-encéphalique BHE ne peut être étudié que sur le modèle *in vivo* d'où la nécessité d'utiliser des animaux. Selon la littérature, le rat reste le modèle de choix pour cette approche. Le rat Wistar constitue un bon modèle pour étudier le passage de la BHE en raison de la grande similitude qui existe entre le cerveau humain et le cerveau de rat.

Réduction : le nombre d'animaux prévu dans ce projet est réduit au minimum avec un objectif fixé afin d'obtenir des résultats significatifs permettant de conclure sur la pertinence de notre approche.

Raffinement : les animaux seront hébergés dans des conditions adaptées à l'espèce avec un enrichissement du milieu. L'ensemble des procédures se déroule sous anesthésie générale afin de d'éviter toute souffrance.

4544. L'infection congénitale à cytomégalovirus (CMV) est la première cause de malformation congénitale résultante d'une infection virale et la première cause de retard mental et de surdité après les causes génétiques. En France, cela correspond à 1% des grossesses; les nouveau-nés infectés sont à risque de développer des séquelles neurosensorielles et neurocognitives. Actuellement, les mécanismes et les marqueurs biologiques prédictifs de survenue de complications à long terme ne sont pas tous connus. Après transmission materno-foetale, le CMV cible la strie vasculaire au sein de la cochlée, organe neurosensoriel de l'audition, ainsi que les cellules souches du système olfactif et de l'hippocampe. Cependant, aucune étude n'a à ce jour évalué l'impact du CMV sur l'olfaction.

Afin de répondre à cette question, nous proposons une approche utilisant différentes techniques de détection virale et de retentissement comportemental. Nous évaluerons l'impact de l'infection congénitale par le CMV sur l'olfaction, l'audition et sur le comportement neurocognitif des souris. Chez des souris infectées congénitalement par le CMV, nous évaluerons leurs performances neurosensorielles et neurocognitives et définirons l'utilisation de l'olfaction comme biomarqueur pronostique.

Selon le protocole utilisé depuis plusieurs années d'infection congénitale de souris par le CMV, 30 souris femelles seront injectées en intraplacentaire soit avec du virus MCMV, soit avec du sérum physiologique; parmi les souriceaux de ces portées, 20 souris mâles infectées et 20 souris mâles témoins seront évaluées sur le plan auditif et olfactif ainsi que du point de vue de leur comportement: ces expériences seront menées par une équipe travaillant en collaboration sur le projet au sein d'une structure A2 de l'institut Pasteur. Les souris y seront ainsi transférées à l'âge de 1 mois pour la suite des expérimentations. Les autres souris femelles et s'il y a lieu, les souris mâles excédentaires seront sacrifiées.

Ces explorations devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes centraux et périphériques responsables des handicaps neurosensoriels des enfants infectés congénitalement par le CMV et peut être d'optimiser le suivi médical de ces enfants.

Règle des 3 R :

- Réduction : Compte-tenu de la forte mortalité liée au modèle d'infection congénitale, nous avons déterminé le nombre minimal de souriceaux nécessaire permettant d'avoir une analyse statistique, significative ou non, soit un minimum de 20 souris pour cette étude d'olfaction et 20 témoins.

- Raffiner : Les signes extérieurs de souffrance, chez la mère gestante injectée, ou chez le souriceau (souris prostrée ou au contraire très agitée, fuyante, aux poils hérissés) seront les critères de points limites, à partir desquels la souris sera euthanasi  e.

- Remplacer : compte-tenu de la spécificité d'espèce du virus et de la complexité de structure de l'oreille interne, et en particulier du vestibule, il n'est pas possible de remplacer ce modèle animal par d'autres modèles.

4545. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques qui pourraient agir au niveau du système nerveux autonome, impliqué dans la régulation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle. Certaines substances sont par exemple susceptibles d'induire une hypotension orthostatique (diminution abrupte de la pression artérielle lors d'un passage d'une position allongée à debout) pouvant conduire à une syncope, alors que d'autres substances peuvent au contraire réduire cette hypotension.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et est mise en œuvre au sein des laboratoires de pharmacologie. Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent étudier les effets de substances pharmacologiques sur le système nerveux intact de l'animal de façon à prédire leur efficacité clinique ou leur innocuité. Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à pouvoir interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre de rongeurs qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 300. Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

4546. Les immunothérapies ciblant les checkpoints immunologiques PD1 et CTLA4 ont montré un impact sur la survie des patients atteints de mélanome, de cancer pulmonaire ou de cancer du rein et des réponses antitumorales sont observées dans de très nombreux sous-types de cancer. Cependant, tous les patients ne bénéficient pas de ces nouveaux traitements et les biomarqueurs associés à la réponse sont mal connus.

Récemment, il a été montré que le nombre de mutations présentes dans le génome de la tumeur favorise une meilleure réponse aux immunothérapies. Au-delà des mutations liées au tabac ou à l'exposition solaire, l'analyse du génome des tumeurs a révélé que certaines protéines (APOBEC) sont impliquées dans la diversité des mutations des cancers. Les protéines APOBEC qui sont des cytidine- désaminases sont responsables de mutations spécifiques identifiables dans le génome tumoral de nombreux cancers humains.

Si d'ordinaire l'expression de ces protéines APOBEC est faible, voire absente dans la plupart des cellules normales, il a été montré qu'elle peut être élevée dans certains cancers. Il existe peu de données sur les causes et conséquences d'une expression élevée de ces protéines APOBEC.

Au sein de notre centre, un projet clinique a été mis en place sur l'étude de l'impact de l'expression de cette protéine mutagène sur la réponse aux traitements par immunothérapies et il semblerait que les mutations liées à APOBEC soient associées à une meilleure réponse aux immunothérapies.

Ce projet consiste à traiter par anti-PD1 ou anti-CTLA4 des souris porteuses de tumeurs surexprimant ou non la protéine APOBEC afin de décrire et comprendre les mécanismes immunitaires favorisés par la protéine APOBEC au niveau tumoral (tumeur, ganglion de drainage) et des organes impliqués dans la réponse immunitaire périphérique (sang, rate). D'après les données obtenues in vitro, l'expression de la protéine APOBEC au sein de la tumeur pourrait favoriser la production de néoantigènes tumoraux. Ces nouveaux antigènes ainsi produits dans la tumeur à cause d'APOBEC pourraient favoriser une meilleure reconnaissance de la tumeur par le système immunitaire et ainsi améliorer la réponse aux immunothérapies anti-PD1 et anti-CTLA4.

Un modèle animal proche de l'homme (souris) se révèle essentiel puisque nous voulons comprendre le rôle de l'expression d'APOBEC sur le système immunitaire et son impact sur la réponse aux immunothérapies. L'utilisation d'animaux vivants immunocompétents est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans sa globalité, l'immunité et l'effet des traitements sur la réponse immunitaire. L'utilisation du modèle murin d'autant plus appropriée car ces immunothérapies ont déjà été testées et développées par une utilisation chez ces animaux.

Enfin, il reste actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire ex-vivo du fait de sa complexité.

Un maximum de 750 souris sera nécessaire à la mise en œuvre de ce projet. Le nombre de souris se justifie par la diversité des traitements, leurs modalités, les mécanismes immunologiques étudiés et afin de s'assurer de la reproductibilité et donc de la fiabilité statistique des résultats obtenus. Dans le cas où une procédure ne donnerait pas d'effet notable, elle ne sera pas renouvelée. De plus, beaucoup de paramètres immunologiques seront étudiés au cours d'une même procédure afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduction).

Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au minimum l'inconfort et la souffrance des animaux: hébergement en groupe avec enrichissement environnemental en tout temps, stricte application des points limites, mise en place d'analgésie en cas de douleur. Les méthodes à l'état de l'art, les plus raffinées, seront toujours utilisées.

4547. Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux...) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès à de meilleurs soins.

Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation : des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit être efficace lors de son utilisation clinique.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (directive 2007/47/CE, 21CFR820...) de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulations d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Chaque animal bénéficie d'une attention et des soins de qualité en post-opératoire afin d'assurer un bien être optimal. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (analgésie).

Les animaux arrivent dans l'EU (Etablissement Utilisateur) après la période post-opératoire réalisé dans l'EU concepteur (conception des protocoles, interventions chirurgicales et suivi post-opératoire). Notre EU assure, sous la responsabilité de l'EU concepteur, l'hébergement et le suivi clinique des animaux, réceptionné en bon état clinique, sanitaire et comportemental.

Par ailleurs, les ruminants sont hébergés en groupes sociaux harmonieux dès que le protocole le permet et bénéficient d'un suivi quotidien par des animaliers qualifiés. La structure "Bien-être animal" et les vétérinaires des sites veillent à l'application du meilleur niveau de soins.

Il est prévu d'utiliser 750 ovins et 100 caprins sur la période de 5 ans.

4548. Les cellules de Sertoli sont de grandes cellules somatiques de soutien qui constituent, avec les cellules germinales et les gamètes, un épithélium unistratifié qui tapisse la paroi des tubes séminifères du testicule chez les mammifères. Elles jouent également un rôle nourricier et protecteur pour le spermatozoïde en maturation ainsi que pour les cellules de Leydig qui produisent la testostérone et pour les cellules myoïdes, des cellules contractiles périvitubulaires participant à la propulsion des spermatozoïdes vers l'épididyme. Les cellules de Sertoli sont des cellules polarisées dotées d'un métabolisme énergétique adapté au support nourricier des gamètes et ces deux caractéristiques majeures sont cruciales pour leur fonction de régulation des autres types cellulaires. Notre protéine d'étude est un régulateur du métabolisme et de la polarité cellulaire bien connu. Mais son rôle dans la polarité et le métabolisme des cellules de Sertoli est encore mal compris. Une meilleure compréhension de la fonction de cette protéine dans les cellules de Sertoli nécessite d'utiliser les outils génétiques d'inactivation de gènes disponibles pour les modèles murins. Pour cela, un modèle murin a été généré pour permettre l'inactivation conditionnelle du gène codant cette protéine dans les cellules de Sertoli au cours de l'embryogenèse. Les conséquences de l'absence de cette protéine dans les cellules de Sertoli seront étudiées pour la maturation des cellules de Sertoli mais également pour les autres types cellulaires qui dépendent des cellules de sertoli : les gamètes, les cellules de Leydig et les cellules myoïdes. Cette étude est menée en respectant la règle éthique des 3R. En effet, nous réduisons au maximum les élevages en croisant des individus de génotype optimal pour l'obtention au sein des portées d'un maximum d'individus de génotype d'intérêt suivant les expériences. Des analyses statistiques détaillées des résultats ont permis de raffiner le nombre d'animaux nécessaires car le modèle est nouveau. Enfin, nous avons également

développé en parallèle un modèle in vitro (lignée de cellules de Sertoli) pour décortiquer les mécanismes moléculaires sous-jacents en remplacement du modèle murin. Le nombre d'individus de phénotype dommageable prévu pour cette étude est de 60 environ. Les causes de l'infertilité masculine sont nombreuses et multifactorielles. L'origine génétique de l'infertilité masculine pourrait concerner 1 homme sur 40. Nous essayons de mieux comprendre le rôle de notre protéine d'intérêt dans ces syndromes en collaboration avec des équipes spécialistes de ces pathologies. Mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la spermatogenèse permettra à terme d'étudier de nouvelles solutions thérapeutiques pour lutter contre l'infertilité masculine.

4549. Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est une maladie infectieuse d'origine virale se traduisant par un déficit profond de l'immunité cellulaire. Deux types de virus ont été isolés des lymphocytes de patients atteints de SIDA ou de ses prodromes. Le premier nommé VIH1, le second nommé VIH2.

Le diagnostic de l'infection VIH est réalisé aujourd'hui à l'aide de tests sérologiques permettant le dépistage et la confirmation de l'infection basés sur le principe de l'ELISA (tests de screening ou tests rapides d'orientation diagnostique, TROD) ou de tests moléculaires. En France, suite au décret du 28 mai 2010 les tests de 4^{ème} génération sont utilisés pour le sérodiagnostic. Ces tests permettent la détection simultanée de l'antigène P25 circulant et des anticorps anti HIV-1 et anti HIV-2. Cette entreprise propose depuis 2005 un test de détection simultanée Ag/Ac unitaire en microplaques, avec ses propres biologiques.

L'intérêt de la détection de l'antigène P25 réside dans le fait qu'il apparaît avant les anticorps et donc permet une réduction de la fenêtre sérologique. De ce fait le risque transfusionnel est largement diminué.

Cette entreprise travaille aujourd'hui sur la mise au point d'un nouveau test de dépistage simultané de l'antigène P25 VIH-1 et des anticorps anti-VIH1 et anti-VIH2. Le dépistage des antigènes VIH se fait à l'aide d'anticorps monoclonaux et/ou polyclonaux. L'utilisation d'anticorps polyclonaux présente l'avantage de couvrir tous les sites antigéniques présents sur l'antigène P25 alors qu'un anticorps monoclonal ne reconnaît qu'un seul site pouvant induire une erreur de diagnostic. C'est dans ce contexte que nous réalisons un protocole d'immunisation. Celui-ci conduira à l'obtention d'un immusérum qui, une fois purifié, fournira les anticorps polyclonaux qui seront utilisés dans le test. Le choix des animaux (1 à 4 lot de 3 à 5 mouton soit 20 moutons) l'immunogène et le protocole ont été définis de manière à minimiser le nombre d'injections et à obtenir la meilleure réponse immunitaire possible. Les 20 animaux sélectionnés devraient permettre de constituer un stock d'anticorps suffisant pour couvrir de nombreuses années de production.

Les moutons, animaux grégaires, sont stabulés en petits groupes dans des conditions adaptées à l'espèce et conformes à la réglementation.

4550. L'embolisation artérielle est une procédure de radiologie interventionnelle réalisée en clinique en complément du traitement cytotoxique des hépatocarcinomes de stade intermédiaire. Elle a pour objectif d'arrêter le flux sanguin de l'artère nourricière de la tumeur et de ce fait de la priver en nutriments car ceci concourt à améliorer l'efficacité du traitement. L'enchaînement des deux procédures est appelé TACE (Trans Arterial Chemo Embolization). Il est envisageable de regrouper ces deux procédures en une seule en utilisant des agents contenant le cytotoxique, qui soient suffisamment visqueux pour emboliser en même temps l'artère. Le projet sera réalisé sur maximum 270 lapins. Un premier tri des agents potentiellement intéressants est fait à partir des mesures physico-chimiques et des techniques in vitro (méthode de flux) pour ne sélectionner que les plus prometteurs. De plus, afin de diminuer le nombre d'animaux du projet la mise au point commence par des méthodes non invasives permettant de caractériser l'embolisation et de faire un suivi longitudinal sur le même lapin. Ce n'est qu'en cas d'échec que seront utilisées des méthodes plus invasives telles que les angiographies voire pose de bagues de débit sur l'artère. L'expérimentation animale est réalisée par des techniciens très expérimentés qui de plus ont l'habitude du travail en milieu stérile avec réveil des animaux. La prémédication des animaux (analgésique/antalgique), le suivi per (anesthésie chimique - kétamine, xylazine, Bromure de glycopyrronium ou gazeuse - isoflurane) et post opératoire (réhydratation sous cutanée Ringer lactate, anti inflammatoires - Flunixin) sont mis en place puis suivis d'une observation journalière des animaux. Un enrichissement de l'hébergement (tablette dans la cage + tasseaux de bois suspendus) est mis en place pour améliorer le bien-être des lapins.

4551. Ce projet a pour but d'étudier l'implication de cellules microgliales, macrophages du système nerveux central, au cours de la maladie Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA). Cette maladie neurodégénérative touche les neurones moteurs et entraîne une paralysie progressive et la mort des patients en moyenne 2 à 5 ans après le diagnostic sans qu'aucun traitement n'existe à ce jour. Les cellules microgliales sont impliquées dans la dégénérescence des neurones moteurs et nous recherchons les voies impliquées dans ces mécanismes. Pour étudier cette maladie, nous utilisons des modèles de souris SLA afin de comprendre les mécanismes pouvant entraîner la mort des neurones dans le but de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans ce projet, nous allons croiser les souris SLA avec des souris délétées pour une protéine intervenant dans le processus de neuroinflammation et suivre l'évolution de la maladie. Nous espérons une augmentation de la survie de ces souris. Ce projet utilisera 360 souris sur une durée de 5 ans. Tout au long de ce projet, nous nous assurerons de mettre en œuvre les règles de réduction, remplacement et raffinement (3Rs). Concernant la réduction, nous utiliserons le nombre d'animaux minimal nous permettant d'obtenir un résultat statistiquement significatif afin de pouvoir obtenir une conclusion scientifique à l'ensemble de nos travaux. Concernant le remplacement, ces modèles sont actuellement les seuls qui permettent de reproduire la paralysie progressive chez l'adulte et donc de modéliser la physiopathologie humaine, raison pour laquelle notre projet nécessite l'utilisation de souris. Cependant, dans un souci de raffinement, toutes les précautions seront prises afin de n'imposer aucune souffrance ou une contrainte minimale aux

souris utilisées et avons, pour chaque procédure, défini un point limite. Un programme d'enrichissement sera suivi en ajoutant dans la cage les éléments suivants : « Mouse house » ou carrés de coton pour nids.

4552. Nous nous intéressons à la réponse immunitaire dirigée contre le cytomégalo virus (CMV), un herpès virus qui infecte une grande partie de la population humaine dès le plus jeune âge, le plus souvent de manière asymptomatique. En transplantation d'organe solide ou de moelle osseuse, du fait de l'immunodépression induite, l'infection à CMV peut entraîner des atteintes organiques sévères.

Notre projet découle d'une observation faite par notre équipe de recherche il y a plusieurs années : les patients transplantés infectés par le CMV présentent une augmentation dans le sang de cellules immunitaires particulières : les lymphocytes T gamma delta (LTgd). In vitro, ces LTgd reconnaissent et tuent des cellules infectées par le CMV et des cellules cancéreuses. Ces résultats suggèrent un rôle protecteur antiviral et anti-tumoral des LTgd induits dans le contexte de l'infection à CMV. Cette hypothèse intéressante est difficile à prouver chez l'homme. Notre but est donc de compléter ces données en utilisant le modèle murin de l'infection à CMV connu pour sa pertinence. Nous disposons en outre de souris déficientes pour des composants importants du système immunitaire nous permettant d'appréhender leur implication dans ce contexte. Nous avons ainsi pu prouver le rôle protecteur des LTgd contre le CMV, puisque des souris sans LT meurent de l'infection avec des atteintes organiques (poumons, foie), alors qu'en présence des LTgd les souris guérissent. Nous souhaitons continuer ce projet pour éclaircir le rôle des LTgd dans l'infection à CMV. Nous souhaitons également mieux appréhender le rôle de ces cellules dans le contrôle du développement de cancers. Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences 1640 animaux sur 5 ans. Dans le respect de la règle des 3R, nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leurs naissances à leurs morts.

4553. Ces dernières années, de nombreux travaux ont démontré le rôle crucial du système immunitaire dans l'efficacité des traitements anticancéreux. En effet, certains traitements antitumoraux induisent non seulement la mort des cellules cancéreuses mais stimulent aussi une réponse immunitaire antitumorale cytotoxique. De façon intéressante, il a été montré 1°) qu'une restriction calorique par le jeûne avant traitement anticancéreux permettait d'améliorer l'efficacité du traitement notamment par régénération de cellules immunes et 2°) que la flore intestinale peut jouer un rôle important dans l'établissement de la réponse immunitaire antitumorale.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de traitements anticancéreux immunomodulants combinés à des composés capables de mimer les effets biochimiques du jeûne. Par la suite, nous évaluerons le rôle de la flore intestinale dans cette stratégie thérapeutique. Cette question ne peut être abordée qu'in vivo car il n'existe pas de modèles alternatifs pour étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale. Pour se faire, nous projetons d'utiliser des souris (nombre estimé maximum de 3960). Ce projet implique des études de croissance tumorale et des analyses immunologiques ex vivo.

Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations ont été conçues afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement et permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal.

Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable pour étudier l'immunité et l'efficacité des traitements combinés sur la réponse anti-tumorale. L'utilisation d'animaux est également indispensable pour étudier les interactions entre la flore commensale intestinale et le système immunitaire dans ce contexte thérapeutique.

Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux témoins (point de réduction). Le nombre d'animaux par groupe sera de 5 ou 8 (selon les procédures envisagées) et les expériences seront effectuées au maximum 3 fois pour permettre une analyse statistique robuste des effets observés. Nous pourrions être amenés à utiliser moins de souris si l'effet observé s'avère significatif au cours des premières expériences. Le projet regroupe 5 procédures séquentielles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail (point de réduction). Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation (optimisation). Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés (réduction). Les conditions d'hébergement sont 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 cocoons de nidification). 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.

4554. Les microalgues sont sujettes à un fort engouement en nutrition et santé humaine, par leur richesse en nutriments et l'effet avéré de certaines molécules sur la protection de l'organisme : activités anti-oxydante, anti-microbienne, anti-virale... Cet intérêt pour leur potentiel touche depuis peu le secteur de la nutrition animale, car leur culture nécessitant peu d'espace, s'inscrit dans un contexte de compétition pour l'utilisation des ressources agricoles entre l'alimentation humaine et l'alimentation animale. De plus, les effets bénéfiques de certains composés des microalgues sur la santé des organismes peuvent également constituer une alternative à l'utilisation des antibiotiques en élevage. Cependant, les effets de l'introduction des microalgues dans la ration sur les performances et la santé des animaux d'élevage sont peu connus.

Ce protocole, impliqué dans un programme de thèse, vise à étudier l'effet de l'incorporation de biomasse de deux microalgues (*Chlorella vulgaris* et *Spirulina platensis*) à hauteur de 1% dans l'aliment du porcelet en post-sevrage (stade critique de l'élevage porcin lié à une forte sensibilité aux troubles digestifs) sur trois critères :

- Effet sur les performances zootechniques (croissance, ingestion, mortalité, morbidité)
- Effet sur la santé digestive et la santé générale (statut inflammatoire, intégrité du tube digestif, diversité du microbiote et colonisation par des pathogènes)
- Effet sur l'assimilation des nutriments (digestibilité)

Les effets seront étudiés par comparaison à un groupe recevant un aliment standard premier âge pour porcelet sevré, sans antibiotique (contrôle négatif) et un groupe recevant l'aliment standard + antibiotique (contrôle positif).

Le protocole comprendra quatre lots de 24 porcelets sevrés à 28 jours, recevant chacun un régime expérimental (un aliment sans supplémentation et trois aliments supplémentés avec l'une des deux biomasses de microalgues ou un antibiotique) pendant le premier âge (deux semaines), puis un aliment standard deuxième âge (quatre semaines). Un effectif de 18 animaux par lot sera logé en cage individuelle pendant trois semaines pour contrôle journalier de l'ingestion d'aliment et pesées hebdomadaires. Les scores de diarrhées seront relevés quotidiennement. Puis, les animaux seront hébergés en loges collectives avec contrôle du poids vif hebdomadaire et recensement des scores de diarrhées, jusqu'à 70 j. En parallèle, six porcelets par lot seront suivis pendant les deux semaines de régime expérimental en cages à digestibilité pour mesurer les performances de croissance (ingestion, poids vif), l'utilisation digestive des nutriments et la perméabilité intestinale (mesures dans les fèces et urines). A la fin des deux semaines de régime expérimental (42 j), ces 24 animaux seront abattus et subiront un prélèvement de sang (mesure du statut inflammatoire et de la perméabilité intestinale), d'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) pour l'analyse de son intégrité et de sa fonctionnalité (perméabilité intestinale, histologie) et de contenu caecal pour analyse du microbiote (diversité bactérienne). Ces mesures seront répétées sur six animaux par lot après abattage en fin de protocole (70 j).

Ce protocole prévoit le respect de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement). Réduction : le nombre d'animaux et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin d'atteindre le niveau de précision souhaité pour la comparaison des performances de croissance et des mesures de santé digestive. Le protocole prévoit la réutilisation des animaux au-delà de sa durée, dans le circuit commercial ou dans le cadre d'autres expériences. Raffinement : les procédures de mesures, prélèvements et abattage ont été construites de manière à réduire au minimum le stress et la douleur occasionnés à l'animal. Remplacement : l'étude ne permet pas de remplacer le modèle animal par des méthodes alternatives.

4555. La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire des articulations. Il s'agit de la 1ère maladie auto-immune en fréquence en France. Les thérapeutiques disponibles ont longtemps été limitées avec une efficacité modérée entraînant des déformations articulaires et une gêne fonctionnelle majeure chez les patients. Le développement de thérapies ciblées dans les années 2000 a révolutionné la prise en charge des patients. Ainsi les traitements anti-TNF ont changé le devenir des patients. D'autres molécules ont ensuite été développées ciblant différents acteurs du système immunitaire. Ces molécules ont des profils d'efficacité assez similaires (efficaces chez environ 70% des patients). La question de la tolérance au traitement est un enjeu majeur. Il existe un risque infectieux accru associé à la plupart de ces traitements. Le développement de cancers solides ou d'hémopathies malignes est également étroitement surveillé, ce d'autant que les patients atteints de PR ont, du fait de leur maladie, un sur risque de lymphome B. La question est donc de savoir si les nouveaux traitements majorent ou minorent ce risque. L'objectif primaire de ce projet est d'étudier les conséquences des traitements les plus récents sur l'incidence de lymphome B chez les patients atteints de PR.

Les objectifs secondaires seront l'étude de l'impact de ces traitements sur les différents mécanismes de défense de l'organisme contre les cancers.

De telles études nécessitant l'analyse des phénomènes dans plusieurs types d'organes et plusieurs types cellulaires et ne peuvent, en conséquence, qu'être réalisées que sur des organismes entiers. Le modèle animal est donc nécessaire pour réunir le maximum d'informations permettant de comprendre ces mécanismes aboutissant aux complications des traitements chez les patients. .

Le modèle animal retenu pour ce projet est la souris. Ce choix s'appuie sur le délai relativement court nécessaire à l'émergence de lymphome chez la souris alors que cette complication survient après plusieurs années chez l'homme. De plus, la mise au point d'un modèle murin spécifique permet de mimer la PR dans ses manifestations cliniques, biologiques et immunologiques y compris le développement de lymphome qui est l'objet de notre étude.

La mise en place d'une étude pilote permettra d'affiner au maximum le nombre d'animaux nécessaire par groupe pour un effectif maximal de 145 souris/groupe. Le nombre de groupes expérimentaux (n=8) a également été réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non-paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies afin d'éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administrations et prélèvements sous anesthésie, limitations des volumes de sang prélevés). La durée de la phase de traitement sera réduite au minimum (12 mois) alors que l'ensemble des analyses biochimiques et immunologiques s'étalera sur trois ans.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 1000 animaux provenant d'élevages autorisés. Les animaux seront hébergés en groupes. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires des traitements). Dans ce cas, des traitements appropriés seront mis en œuvre.

Ce travail doit permettre de mieux définir le profil de tolérance des nouveaux traitements et éventuellement de pouvoir identifier les patients qui seraient les plus à risque de complications selon les mécanismes mis en jeu.

4556. La mitochondrie est un réseau tubulaire dynamique ayant un rôle essentiel dans la production d'énergie. Le mouvement et la répartition des mitochondries nommés « dynamique mitochondriale » permet à la cellule de s'adapter à son environnement. Il correspond à un équilibre entre le niveau de fusion et de fission des mitochondries et est médié par des protéines impliquées soit dans la fission (Fis-1 et Drp1), soit dans la fusion (Mfn-1, Mfn-2 et OPA-1). De part ses fonctions et sa dynamique, un lien entre la mitochondrie et des pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension a pu être décrit par de nombreuses études. A ce niveau, une augmentation des ROS mitochondriaux (mROS) a pu être associée à la mise en place d'une hypertension. Par ailleurs, un lien entre les mROS et la NADPH oxydase a pu être décrit comme exacerbant le stress oxydatif.

Au niveau vasculaire, aucune étude ne détermine ni sur des vaisseaux de complaisance ni sur des vaisseaux de résistance le rôle de DRP1. Notre hypothèse est que les fonctions vasculaires et mitochondriales évoluent en parallèle et que l'altération progressive des mitochondries perturbe la réactivité et l'adaptation vasculaire (notamment à l'hypertension) avec des conséquences dramatiques pour les organes clés comme les reins, le cœur ou le cerveau. Nous nous intéressons au rôle de la protéine de fission mitochondriale DRP1 dans la physiopathologie vasculaire et notamment dans le développement de l'hypertension artérielle systolique qui apparaît lors du vieillissement, dû souvent à une augmentation de la pression pulsée lié à un accroissement de la rigidité artérielle.

Pour l'étude de fonction vasculaire

Il y a 12 groupe

DRP1 +/- 3 mois : 30 souris

DRP1 +/- 3 mois : 30 souris

DRP1 +/- 3 mois traités LNAME : 30 souris

DRP1 +/- 3 mois traités Angiotensine II : 30 souris

DRP1 +/- 3 mois traités Angiotensine II : 30 souris

DRP1 +/- 6 mois : 30 souris

DRP1 +/- 6 mois : 30 souris

DRP1 +/- 6 mois traités LNAME : 30 souris

DRP1 +/- 6 mois traités LNAME : 30 souris

DRP1 +/- 6 mois traités Angiotensine II : 30 souris

DRP1 +/- 6 mois traités Angiotensine II : 30 souris

DRP1 +/- 12 mois : 30 souris

DRP1 +/- 12 mois : 30 souris

DRP1 +/- 12 mois traités LNAME: 30 souris

DRP1 +/- 12 mois traités LNAME : 30 souris

DRP1 +/- 12 mois traités Angiotensine II : 30 souris

DRP1 +/- 12 mois traités Angiotensine II : 30 souris

Nombre de souris en total : 540 Souris

Seules les expériences indispensables seront réalisées. Il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience. Les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale complétée par une analgésie. Une analyse statistique des résultats sera réalisée (analyse de variance ANOVA suivie d'un test posthoc LSD).

Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle in vitro, car le remodelage vasculaire met en jeu le système immunitaire et hormonal

Nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Le nombre d'animaux par groupe est de 10 car les chirurgies peuvent induire des décès (taux de décès d'environ 25%). Il reste donc 7 animaux par groupe, nombre minimal pour pouvoir obtenir des résultats statistiquement significatifs. Nous utiliserons le test de student

Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 4) suivant l'âge et le poids des animaux de plus les cages sont enrichies par des jouets (rouleau sopalain, copeaux)

Les animaux sont surveillés au quotidien par le personnel de l'animalerie et le poids est suivi 2 fois par semaine.

4557. Le glioblastome multiforme (GBM) est une tumeur cérébrale très agressive (grade IV) dont le taux de survie à 2 ans des patients est seulement de 3 à 5%. Malgré les traitements actuels, la tumeur développe une résistance très rapidement et des rechutes fréquentes. Par conséquent, le développement et l'évaluation de nouveaux traitements sont nécessaires. Une nouvelle molécule de ferrocifène (Fc), le 4-ferrocényl-5,5-bis (4-hydroxyphényl) -pent-4-én-1-ol (FcTriOH) a montré une puissante activité cytotoxique in vitro (Concentration capable d'induire 50% de cytotoxicité $CI_{50} = 1$ micro-molaire) sur des cellules U87MG dans diverses expériences récentes. Cependant, les applications cliniques de ce médicament sont limitées par sa très faible solubilité dans l'eau. Le projet vise à concevoir des nanovecteurs encapsulant le FcTriOH, porteurs de peptide ciblant qui visent à augmenter la libération intratumorale du FcTriOH, nouvel agent cytotoxique.

Les nanocapsules lipidiques chargées de FcTriOH (LNC) ont été développées et caractérisées au sein de notre unité. Pour améliorer la délivrance des toxiques au niveau des cellules tumorales, la surface des LNC est modifiée par adsorption d'un peptide pénétrant, NFL.TBS-40.63. Après évaluation in vitro des formulations, ce projet vise à évaluer l'activité antitumorale in vivo des LNC fixant le peptide pénétrant dans un modèle de xénotransgreffe tumorale ectopique chez la souris.

Ce projet sera réalisé sur 104 rongeurs (souris) sur une période de 2 années.

Pour ce projet les principes de remplacement, de réduction et de raffinement seront respectés.

- Le traitement d'organismes intégrés par de faibles doses de toxiques a un caractère de stricte nécessité afin d'évaluer les effets au niveau des différents tissus et organes et ne peut pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information; - Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet.

- Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

Ce projet a fait l'objet d'une analyse interne à l'unité de recherche en vue de s'assurer du respect de la réglementation relative à l'expérimentation animale.

4558. Notre laboratoire s'intéresse à développer de nouvelles approches de thérapie génique via les cellules souches sanguines pour traiter des maladies génétiques rares du système sanguin et immunologique. L'approche repose sur la correction ex vivo des cellules souches hématopoïétiques (CSH) à l'aide d'un vecteur lentiviral de thérapie génique comme alternative à la greffe de moelle osseuse. Plusieurs modèles de déficits immunitaires héréditaires sont à l'étude dans le laboratoire pour des approches de thérapie génique.

Notre projet consiste à modéliser l'approche de thérapie génique hématopoïétique dans le modèle murin.

Cette étude vient compléter celles qui sont réalisées in vitro et est indispensable pour étudier les événements biologiques complexes dans un organisme entier. En effet de nombreux paramètres in vivo contrôlent d'une part, la capacité d'adressage et de greffe des cellules souches sanguines dans leur niche osseuse et d'autre part la capacité des cellules sanguines corrigées à reconstituer un système immunitaire et sanguin complet.

Cette étude sera réalisée dans deux modèles de déficits immunitaires, à savoir les souris gp91phox^{-/-} pour la granulomatose septique chronique liée au chromosome X (X-CGD), et les souris gamma C^{-/-} pour le déficit immunitaire combiné sévère de transmission liée à l'X (DICS-X1). Afin d'étudier plus finement le rôle de certaines molécules du système immunitaire les souris μ MTKO ou MyD88^{-/-} seront également utilisées. Par ailleurs, il sera nécessaire d'inclure dans cette étude des groupes de souris contrôles ayant le même fond génétique (C57Bl/6).

Afin de potentialiser la ré-implantation des CSH dans la moelle nous comparerons l'injection de ces cellules par la voie intra fémorale au plus près du site de production des cellules sanguines et la voie intraveineuse. Les CSH seront préalablement transduites ex vivo par un vecteur lentiviral permettant l'expression de la protéine déficiente dans le modèle étudié comparativement à un vecteur contrôle.

Afin de respecter le principe de raffinement, les souris seront préparées à la greffe par l'utilisation de Busulfan préférentiellement à l'irradiation car cette méthode permet de réduire la mortalité des animaux et représente un niveau modéré de douleur.

Dans le but de respecter le principe de Réduction, l'effet des greffes de CSH sur les souris sera suivi de manière longitudinale. De même les vecteurs de thérapie génique testés dans ces protocoles seront d'abord testés in vitro (Remplacement) afin de vérifier l'absence de toxicité cellulaire et afin de réduire le nombre de souris (économie de 100 animaux). Pour tester la fonctionnalité de la moelle reconstituée suite à la greffe primaire de CSH, des greffes secondaires seront réalisées. Elles consistent à transférer la moelle d'une souris receveuse de la greffe dite primaire dans une autre souris pour vérifier la présence de cellules souches sanguines primitives capables de reconstitution à long terme.

Pour l'ensemble de notre projet, compte tenu des paramètres qui seront analysés, nous estimons à 320 le nombre de souris nécessaires à notre étude. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études et surtout en fonction d'une analyse statistique dans le but d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible.

4559. L'objectif des recherches de notre laboratoire est de mettre en place des stratégies thérapeutiques pour traiter les dystrophies musculaires progressives, en particulier la dystrophie musculaire de Duchenne et les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD pour Limb Girdle Muscular Dystrophies). Ces myopathies touchent environ 1 garçon sur 3500 pour la dystrophie de Duchenne et 1 personne /50 000 pour les LGMD. Elles sont progressivement invalidantes et conduisent à la perte de la marche. Aucun traitement curatif n'est actuellement disponible pour ces myopathies d'origine génétique.

Dans ce projet, nous souhaiterions déterminer si des injections de vésicules extracellulaires, qui sont des vecteurs de communication et de transport de matériels entre cellules dans les organismes vivants, peuvent contribuer à corriger la pathologie dans des souris modèles reproduisant les défauts génétiques et les signes de la pathologie humaine de ces différentes dystrophies musculaires. Cette étude vient compléter celles qui sont réalisées in vitro et est indispensable pour étudier les événements biologiques complexes liés aux mécanismes physiopathologiques des maladies étudiées et à la biologie des vésicules extracellulaires dans un organisme entier. En effet, de nombreux paramètres in vivo contrôlent les réactions dues au déficit génétique à la fois dans le muscle et dans l'organisme entier et peuvent impacter également la capacité des vésicules à atteindre et fusionner avec la fibre musculaire. Nous utiliserons des vésicules dérivées de cellules en culture et contenant du matériel génétique (shRNA ou miRNA) ciblant les voies majeures du processus dystrophique. Ce matériel génétique sera apporté sous forme de plasmide non intégratif comportant un signal de ciblage vers les vésicules. Une étude sur différents modèles animaux de dystrophies des ceintures afin d'identifier les facteurs les plus pertinents est en cours de finalisation au laboratoire. Cette étude devrait permettre de réduire d'un facteur 3 à 5 le nombre de molécules susceptibles d'être ciblées in vivo. Les vésicules extracellulaires seront isolées soit par centrifugation différentielle soit par isolation sur colonne par un marqueur spécifique des exosomes. Ces vésicules seront injectées par voie intramusculaire afin de d'évaluer les effets au niveau moléculaire. Une fois ceux-ci validés, les vésicules seront injectées en intraveineuse pour évaluer leur biodistribution et l'efficacité thérapeutique associée.

Les modifications génétiques présentes dans le génome des modèles utilisés n'ont pas d'impact sur l'activité naturelle de la souris qui ne présente donc pas de phénotype dommageable. Pour réduire le nombre d'animaux nous réaliserons des tests préalables *in vitro* pour exclure les vésicules modifiées inefficaces, utiliserons une approche statistique; et effectuerons des analyses longitudinales sur chaque animal pour obtenir de multiples données. Les modèles animaux choisis seront les plus pertinents en l'état des connaissances. Dans un souci de remplacement, l'effet des vésicules sera évalué dans un premier temps dans des systèmes cellulaires. Dans un souci de réduction, une première évaluation de l'efficacité des vésicules sera effectuée sur un seul modèle murin avant d'être étendue à d'autres modèles de pathologies dans le cas de résultat positif. Par ailleurs, l'ensemble des études fonctionnelles seront effectuées de façon longitudinale sur les mêmes groupes d'animaux. Dans ce projet, nous estimons que 570 animaux seront utilisés. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études ainsi que sur un calcul de taille d'échantillon permettant une analyse statistique des résultats dans le but d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible.

4560. La Tomographie par Emission de Positons (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle, utilisée par les services de médecine nucléaire. Elle aide au diagnostic et à l'évaluation de stratégies thérapeutiques, en oncologie, neurologie et cardiologie. Cependant, le nombre de molécules marquées (radiopharmaceutique) disponible reste relativement faible et seul le [18F]-FDG est utilisé régulièrement en milieu hospitalier. Cette molécule apporte des informations très utiles au diagnostic mais elle présente des limites dues principalement à son manque de spécificité. Le développement de nouveaux radiopharmaceutiques présente un intérêt majeur.

Notre équipe de recherche, à l'interface de la chimie/radiochimie et de la biologie, s'intéresse au développement de nouveaux radiopharmaceutiques (radiotraceurs) pour l'imagerie TEP en neurosciences et oncologie. Ces nouveaux composés nécessitent une évaluation préclinique afin de déterminer leur pharmacocinétique chez le petit animal.

Un screening *in vitro* de potentiels biomarqueurs détermine le meilleur candidat pour la cible biologique étudiée en réalisant des expériences de binding cellulaire ou tissulaire. La biomolécule sélectionnée est ensuite radiomarkée avec un des isotopes émetteurs de positons qui peut être soit le fluor-18 (18F), le carbone-11 (11C) ou le gallium-68 (68Ga). Le caractère lipophile du nouveau radiotraceur, sa stabilité dans son milieu de formulation pour injection chez l'animal, sa stabilité sanguine sont contrôlées avant de commencer son évaluation *in vivo*.

Sur un modèle murin sain (rat ou souris, selon la cible biologique étudiée) le devenir du radiotraceur dans l'organisme est étudié par sa pharmacocinétique (administration, distribution, métabolisation et élimination). L'imagerie μ TEP/ μ TDM réalisée avec une caméra dédiée au petit animal permet de réduire grandement le nombre d'animaux nécessaires à l'évaluation d'un nouveau radiotraceur pour connaître de manière quantitative sa biodistribution et sa pharmacocinétique *in vivo*. Il est ainsi possible d'obtenir la cinétique de captation du radiotraceur circulant (compartiment sanguin) et pour la cible biologique d'intérêt. La spécificité de la fixation du radiotraceur à sa cible peut également être étudiée par imagerie en mettant en compétition le radiotraceur avec d'autres molécules dont les propriétés (affinité, sélectivité...) sont connues. Dans le cadre d'un projet étudiant une cible cérébrale, une attention particulière sera portée sur la capacité du composé à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE). Enfin, cette méthode d'imagerie permet d'évaluer la cinétique d'élimination du composé.

Pour chaque nouveau radiotraceur développé, il est important de pouvoir évaluer *in vivo* son degré de radiométabolisation. En effet il est nécessaire d'établir lors d'un examen d'imagerie et après quantification de la radioactivité, la part de radioactivité relevant du composé mère injecté de celle des produits de dégradation issus de ce composé après son injection *in vivo*. Cette étude est effectuée généralement à partir des fluides biologiques (sang, urine, ...) et des organes d'intérêts (en fonction de la cible biologique) prélevés et analysés. Pour réduire le nombre de rongeur, une pré-étude du radiométabolisme est réalisée sur des microsomes hépatiques de rat ou souris.

Afin d'affiner la quantification du radiotraceur *in vivo* dans l'organisme ou dans sa cible biologique, l'analyse de l'imagerie TEP peut être complétée, *ex vivo*, par de la dissection (organes hors champ de vue de la caméra, structures cérébrales, ...) ou par une technique d'autoradiographie en fin d'imagerie.

Pour chaque nouveau radiotraceur étudié, au maximum 70 rats ou souris sont nécessaires (minimum 30 animaux), 6 nouveaux radiotraceurs seront évalués, soit 420 rongeurs (rats ou souris) au maximum et au minimum 180.

Tous les examens μ TEP sont réalisés en « aigu » et sont optimisés pour réduire le nombre d'animaux. En effet, pour chaque examen, l'évaluation en imagerie *in vivo* pour chaque animal portera sur la cinétique de distribution du radiotraceur dans l'organisme, et en fin d'imagerie après sacrifice de l'animal sur le radiométabolisme, et la dissection des organes hors champ de vue de la caméra et si besoin une micro dissection cérébrale pour affiner la quantification des petites structures cérébrales.

Pour l'étude d'un système de neurotransmission cérébral à l'aide d'un radiotraceur injecté *in vivo*, le choix de l'espèce animal dépendra du niveau d'expression de la cible biologique à étudier. Pour l'étude de radiotraceur en oncologie, le choix se fera pour l'espèce la plus représentative du modèle pathologique murin.

Tous les animaux sont hébergés en animalerie conventionnelle respectant leurs besoins physiologiques et comportementaux. L'injection intraveineuse du radiotraceur et les examens d'imagerie μ TEP/ μ TDM sont réalisés sur des animaux anesthésiés par voie gazeuse avec un monitoring de la température corporelle et un suivi de la fréquence respiratoire. Les doses injectées du radiotraceur pour l'imagerie μ TEP sont des doses traceuses, sans effet biologique. Les mises à mort se feront sous anesthésie gazeuse profonde par décapitation.

4561. Les pathologies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité dans le monde. Ces pathologies sont très modulables par des facteurs génétiques, environnementaux et nutritionnels. Dans ce contexte, la prédiction du risque lié à ces

pathologies s'avère une démarche précieuse pour une meilleure prise en charge. Plusieurs études ont proposé des indices permettant de quantifier ce risque. Malgré l'utilité avérée de ces indices, il y a un besoin pressant de pouvoir disposer de biomarqueurs quantifiables et pertinents. Différentes études ont mis en exergue la relation liant l'apparition de certaines maladies comme le diabète ou les maladies cardiovasculaires au mode de vie et aux régimes alimentaires. Elles ont particulièrement souligné la responsabilité des lipides (cholestérol, acides gras saturés) comme facteurs de risques majeurs. Parallèlement, un intérêt important et encore croissant est porté aux acides gras polyinsaturés (AGPI) comme agents préventifs, voire dans certains cas, thérapeutiques, de nombreuses maladies chroniques.

L'importance nutritionnelle et la compréhension des mécanismes biochimiques mis en jeu par ces AGPI au niveau cellulaire ainsi que la recherche de nouvelles voies thérapeutiques ou de prévention, représentent actuellement un enjeu de santé publique et scientifique. La problématique de ce projet se situe dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles dans l'optique de la prévention du risque cardio-métabolique et de son traitement par l'utilisation de compléments alimentaires d'origine végétale. Dans ce cadre, et pour remédier à la diminution des ressources halieutiques, les micro-algues marines peuvent représenter un potentiel de par leur richesse en molécules biologiquement actives à haute valeur ajoutée telles que les oméga-3, les phytostérols et les pigments. La plupart de ces molécules ont un impact sur différents paramètres biochimiques associés à des troubles métaboliques tels que les dyslipidémies, l'obésité ou le diabète. Les micro-algues, utilisées en tant que complément alimentaire, présentent la capacité de pouvoir fournir, l'ensemble de ces molécules biologiquement actives, le rôle synergétique de celles-ci pourra ainsi être mis en exergue.

L'objectif majeur de ce projet sera de comparer les effets de trois micro-algues utilisées en tant que complément alimentaire dans la prévention des dyslipidémies et de l'obésité. Les trois micro-algues, d'origine marine, sont caractérisées pour être particulièrement riches en oméga-3, la première en EPA, la seconde en DHA et la troisième en EPA et DHA. Le modèle animal retenu, le rat Wistar présentant une dyslipidémie d'origine nutritionnelle, nous permettra d'atteindre les objectifs visés à savoir l'amélioration des paramètres physiologiques et biochimiques des animaux, grâce à des lyophilisats de microalgues utilisés en tant que complément alimentaire.

Sur la durée totale du projet, 3 années, 96 animaux seront utilisés pour cette étude, hébergés dans une animalerie en conditions contrôlées (éclairage, température, hygrométrie) et dans le respect de la méthode des 3R. Un suivi de soin journalier sera effectué (suivi de la prise alimentaire, évaluation de l'eau de boisson consommée) ainsi qu'un suivi bi-hebdomadaire du poids corporel des animaux. Au cours de ces visites, il sera aisé d'observer un comportement éventuel non approprié tel qu'un comportement agressif, un aspect physique pouvant être un signe de carence ou de domination. Le milieu sera enrichi en objets modifiables permettant aux animaux de créer un environnement propice à leur développement et à leur épanouissement.

4562. Le VIH se transmet principalement lors des relations sexuelles et une part importante des nouvelles infections dans le monde ont lieu lors de rapports sexuels anaux. Le tractus intestinal est donc un site impliqué dans les premières étapes de l'entrée du virus dans l'organisme. Le virus traverse la couche superficielle (épithélium) de la muqueuse intestinale par différentes voies (brèches tissulaires ou transcytose) pour atteindre la couche intermédiaire (lamina propria), où résident les cellules cibles du virus : lymphocytes CD4+, macrophages et cellules dendritiques. Notre groupe a récemment montré l'implication active des cellules dendritiques de la lamina propria dans la transmission du VIH par voie muqueuse.

Les objectifs de ce projet sont donc d'élucider les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la transmission intestinale du VIH et le rôle des cellules dendritiques. Les résultats de ce projet permettront d'évaluer de nouvelles stratégies pour prévenir la transmission du VIH. Ce projet sera réalisé en comparant des modèles de transmission *in vitro* et *in vivo*, chez l'homme et chez l'animal. Le modèle animal choisi pour ce projet est le primate non humain (PNH). Le modèle d'infection expérimentale du PNH par des souches pathogènes du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) est particulièrement adapté pour ces études. Le PNH constitue le seul modèle expérimental reproduisant l'infection par le VIH. L'évolution de l'infection est semblable à celle observée chez l'homme. Ce modèle est le plus pertinent pour obtenir des résultats prédictifs et transposables à l'homme.

Le projet prévoit au maximum 21 animaux nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour permettre l'interprétation des résultats. Hébergés en groupe avant infection puis en modules individuels contigus permettant des interactions sociales visuelles, auditives et olfactives, les animaux sont surveillés quotidiennement. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation mettra en œuvre les traitements appropriés dont les protocoles d'analgésie. Des critères arrêts sont prévus. Les méthodes expérimentales ont été choisies de façon à éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (inoculation virale atraumatique et prélèvements de sang et de fluides muqueux sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés). Les échantillons biologiques générés dans ce projet ainsi que les métadonnées associées, seront conservés et partagés avec d'autres laboratoires. Les animaux bénéficieront d'un programme d'enrichissement varié défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

4563. Le nerf vague joue un rôle essentiel dans la régulation végétative du système cardio-pneumo-entérique. L'enregistrement et la stimulation du nerf vague sont des voies thérapeutiques émergentes utilisables dans plusieurs maladies comme l'insuffisance cardiaque, l'épilepsie, l'obésité.

A l'heure actuelle, très peu de possibilités d'investigations fiables sont possibles chez le petit animal (souris et rat) du fait du manque d'électrodes performantes. Ce projet vise à tester l'efficacité de quelques modèles commerciaux actuellement sur le marché ainsi que certains modèles non commerciaux possédant des technologies et/ou des caractéristiques innovantes.

A l'heure actuelle, nous avons identifié six modèles d'électrodes. Nous n'excluons pas la possibilité de tester d'autres électrodes nouvellement mises au point ou commercialisées durant la durée du projet.

Afin de valider ces différents modèles d'électrodes, nous devons valider les critères suivants : 1) Avoir une impédance compatible avec les stimulateurs du laboratoire ; 2) Obtenir un enregistrement exploitable du nerf vague ; 3) Contrôler l'efficacité d'une stimulation ayant pour effet la modulation de l'action du nerf vague ; 4) Vérifier la stabilité de ces trois critères sur un à deux mois.

Nous estimons que cinq animaux par électrode et par espèce (soit au total 60 animaux) seront suffisants pour montrer l'efficacité d'une électrode. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, nous n'effectuerons les tests chroniques qu'une fois les essais en aigu validés. Le raffinement des procédures a été pris en compte et vise à minimiser une hypothétique souffrance des animaux avec une détermination précise des points limites. Enfin, il faut préciser qu'il n'est pas envisageable d'utiliser une approche in vitro en remplacement de l'approche in vivo de ce projet.

4564. La thérapie cellulaire est un moyen biotechnologique très important utilisé entre autres dans le traitement de nombreuses pathologies hématologiques telles que certains cancers du sang (leucémies). Elle consiste en une greffe de cellules souches du sang saines (le greffon) qui en se développant reconstituent la moelle osseuse puis le sang normal. Notre Laboratoire a pour mission le développement et la conservation de ces greffons humains à partir de cellules issues des différentes sources que sont la moelle osseuse, le sang placentaire et le sang périphérique. Cela requiert des études de fonctionnalité des cellules qui composent ces greffons et notamment des cellules souches responsables du succès de la greffe. L'étude de ces cellules souches du sang (évaluation de leur fonctionnalité) repose exclusivement à ce jour sur la capacité de ces cellules à greffer un hôte, c'est-à-dire à se « nichier » chez le receveur pour s'y développer et produire une descendante de cellules matures et fonctionnelles qui composent le sang. Aucune étude in vitro ne permet actuellement de tester la fonctionnalité des cellules souches du sang humaines ni de les quantifier. Le test de référence est donc représenté uniquement par le modèle des souris immunodéficientes capables d'accepter la greffe de cellules humaines. Dans le cadre de nos études, ces animaux reçoivent par injection des cellules humaines issues des différentes sources précitées et manipulées comme suit :

- Avant ou après amplification en culture.
- Après conservation à +4°C, après décongélation
- Après tris cellulaires de populations potentiellement enrichies en cellules souches
- Après modification génétique

L'absence d'alternative à l'expérimentation animale pour l'ensemble de ces études est justifiée par le fait que la greffe des cellules souches du sang (« nichage » et développement chez l'hôte) fait intervenir des micro-environnements cellulaires et moléculaires extrêmement complexes et impossibles à reproduire en culture in vitro.

Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences 2500 animaux par an. Dans le respect de la règle des 3R, et dans le but de restreindre le nombre d'animaux nous utiliserons le nombre minimal de souris nécessaire à une étude statistique. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leurs naissances à leurs morts. Ils recevront notamment de la nourriture enrichie dès le départ de l'expérimentation.

4565. Les nanoparticules (NP) entrent dans la composition de nombreux produits (dentifrices, colorants et emballages alimentaires, boissons, lubrifiants, pots catalytiques, climatiseurs et produits biomédicaux), exposant de plus en plus la population générale mais aussi les travailleurs du secteur des nanotechnologies. Dans les études de toxicologie en lien avec les NP, la grossesse est un état physiologique qui est peu pris en compte et très peu de données existent sur l'évaluation des effets des NP au cours de la gestation sur la mère et sa descendance.

Ce projet a donc pour objectif d'évaluer les conséquences de l'exposition maternelle chronique aux NP au cours de la gestation sur le développement fœtal et placentaire soit par inhalation soit par ingestion à des doses d'exposition qui correspondent à celles mesurées dans la population générale ou dans celle des travailleurs.

Ce programme permettra d'établir i/ la cartographie de la distribution des NP dans l'organisme maternel et fœtal et le tissu placentaire ii/ si l'exposition à ces NP affecte le développement placentaire et fœtal et le fonctionnement de différents organes fœtaux et l'ADN des tissus materno-fœtaux.

Pour ce projet, le recours à l'animal est irremplaçable car la collecte des placentas et des organes fœtaux est nécessaire. Ce projet prévoit le recours à un total de 80 lapines afin d'obtenir 4 groupes de 15 lapines gestantes. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour obtenir une puissance statistique suffisante. Tous les animaux utilisés sont spécialement élevés à des fins d'expérimentation. Il s'agit de lapines de race New-Zealand utilisées pour les études biomédicales en raison de la similarité entre le placenta humain et de lapin.

Les procédures expérimentales utilisées incluent :

- une phase d'habituation des animaux à la manipulation en vue de l'exposition aux NP, ceci afin d'éviter un stress éventuel au cours de l'expérimentation animale. Si des animaux présentaient des signes de stress au cours de la phase d'habituation, ils seraient exclus du protocole et retourneraient à l'élevage
- la synchronisation hormonale de la mise à la reproduction des lapines suivie d'une insémination artificielle afin de pouvoir dater la gestation
- l'exposition aux NP par ingestion ou par inhalation. Si l'état de santé d'un animal venait à se dégrader, alors il serait retiré du protocole expérimental
- un prétraitement, avant l'euthanasie, avec un analgésique de type morphinique qui traverse la barrière placentaire, assurant ainsi l'analgésie de la mère et des fœtus

- l'euthanasie des lapines gestantes par électronarcose suivie d'une exsanguination qui sera suivie par une laparotomie (incision de l'abdomen) et le prélèvement de l'utérus gravide
- une demande de dérogation pour euthanasier les fœtus par décapitation plutôt que par dislocation cervicale en raison de leur petit poids en fin de gestation.

Ce projet est en conformité avec les exigences des 3R car i/ il porte sur la gestation et qu'il est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique (Remplacement) ii/ lors de la conception du protocole expérimental, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables (Réduction) iii/ l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance animale. De plus, les animaux bénéficieront de conditions d'hébergement avec enrichissement comme des chainettes (Raffinement).

4566. Il a récemment été démontré que la qualité de l'environnement microbien est déterminante dans l'apparition de l'obésité, du diabète ainsi que dans l'établissement d'un état d'inflammation à bas bruit au niveau intestinal. Les fibres ne sont pas digérées dans l'intestin comme la plupart des nutriments, elles n'ont donc qu'une faible valeur nutritionnelle apparente. En revanche, elles sont le substrat de la flore intestinale dans le côlon, c'est-à-dire qu'elles sont capables de moduler la flore intestinale, c'est ce que l'on appelle l'effet prébiotique. La nature des fibres solubles semble correspondre spécifiquement au maintien et à la croissance de certaines populations de bactéries de la flore intestinale. La grande majorité des espèces bactériennes présentes dans le tractus intestinal sont les Bactéroidetes, les Firmicutes et des Actinobactéria. Il est décrit que les fibres solubles de type oligo fructose (FOS) présentent des effets bénéfiques sur le métabolisme et sur la satiété (retardent la sensation de faim). Les premières études sur la relation entre la composition du microbiote intestinal et l'obésité ont montré que le nombre de Firmicutes était augmenté et qu'à l'inverse le nombre de Bactéroidetes était diminué chez les humains et les souris obèses comparés aux individus contrôles. Chez le rongeur et chez l'homme, l'administration d'un régime alimentaire fibres fermentescibles (oligo-fructose) augmente la quantité de Bactéroidetes. De plus Il a été mis en évidence que l'introduction de 10% de FOS dans l'alimentation des rats améliore les performances cognitives et l'activité des animaux. Ces récentes découvertes ainsi que l'existence d'un dialogue intestin-cerveau, ont permis de mettre en évidence que la composition de la flore intestinale impacte le cerveau.

De plus, au-delà de leur effet sur l'écosystème intestinal, les fibres pourraient avoir un effet rapide sur la modulation des signaux hormonaux et nerveux émanant du tractus intestinal et communiquant avec le cerveau. En retour le changement de ce dialogue peut conduire, via notamment la modulation de la composante autonome, à une amélioration à la fois de la dépense énergétique, une amélioration de la sensibilité à l'insuline de ces tissus ainsi que du métabolisme du glucose. De plus les mêmes mécanismes pourraient conduire à une modification du comportement alimentaire.

En effet une supplémentation quotidienne en fibres solubles chez des hommes adultes en surpoids entraîne une diminution significative du poids corporel, de l'indice de masse corporelle (IMC), du pourcentage de masse grasse, de la sensation de faim et de l'apport calorique. De plus, la supplémentation de fibres diminue l'insulinorésistance et améliore les variables du syndrome métabolique chez les patients en surpoids.

L'étude que nous proposons permettra de comparer l'effet de trois types de fibres solubles sur la réponse glycémique, le poids et la composition corporelle chez la souris. Cette étude ne peut être remplacée par d'autre moyen car nous regardons les aspects comportementaux de l'élimination des nutriments, elle utilisera le minimum de souris nécessaire (30 souris C57BL6j) et respectera le plus possible le bien-être animal (raffinement des procédures et amélioration de leur environnement).

4567. Notre équipe étudie les mécanismes moléculaires et cellulaires du développement précoce de l'embryon de souris.

Grâce aux avancées technologiques de ces 30 dernières années, on commence à comprendre les bases moléculaires des événements qui initient la spécification des différents lignages de l'embryon de mammifère. Il a été montré chez la souris, le modèle de choix pour ces études, que toutes les voies de signalisation majeures sont impliquées. Ces voies sont les mêmes qui assurent la maintenance et le renouvellement des tissus chez l'organisme adulte, des fonctions qui les placent au centre de bien des situations pathologiques. L'étude de leur implication et de leurs interactions pendant les premières étapes du développement, lorsque l'organisme est encore relativement simple, est donc particulièrement pertinente pour la compréhension de leurs fonctions dans des contextes plus tardifs, et plus complexes.

L'objectif de notre équipe est de comprendre comment chez l'embryon de souris des cellules en apparence identiques adoptent des destins différents de façon coordonnée. Nos études sont focalisées sur une protéine sécrétée de la famille des TGF-beta. Le gène que nous étudions est requis pour la mise en place des axes antéro-postérieur (AP) et Droite-Gauche (DG) de l'animal. Il est aussi requis pour la spécification et la maintenance de diverses identités cellulaires, aussi bien dans les lignages embryonnaires que dans les lignages extra-embryonnaires.

Nous utilisons la génétique pour étudier la régulation et les fonctions du gène d'intérêt chez l'embryon de souris lors du développement embryonnaire de E3.5 jour à E 9,5 jour principalement.

Un premier type d'expérience consistera à analyser le développement d'embryons parfois porteurs de mutations dans ce gène ou dans d'autres gènes d'intérêt de la même voie, et nous y caractérisons l'expression de divers marqueurs moléculaires.

180 femelles/an, seront sacrifiées pour prélever des embryons au stade 8 cellules. Afin de limiter le nombre d'animaux nous ferons appel à la technique de superovulation pour obtenir un maximum d'embryons par femelle.

Un deuxième type d'expériences consistera à associer les morulas, embryons au stade 8 cellules, avec des cellules en culture, les embryons E3.5 ainsi obtenus seront réimplantés dans l'utérus de souris pseudo-gestantes afin d'y poursuivre leur développement. Ils seront analysés entre E4.5j et E9.5j.

Certains seront maintenus jusqu'à terme mais ces animaux ne présenteront pas de phénotype délétère. Nous utiliserons au maximum 200/an souris receveuses sur la durée du projet.

Nous estimons donc que 1900 souris seront utilisées pour produire les embryons nécessaires à ces analyses.

Lorsque cela est possible nous utilisons des cellules souches en culture plutôt que des embryons, mais tous les aspects du développement embryonnaire ne pouvant être modélisés in vitro, l'utilisation d'embryons reste nécessaire. Nous travaillerons sur le raffinement des procédures dans le respect de la règle des 3R. Les animaux seront surveillés régulièrement afin de s'assurer de leur bien-être. Leur environnement sera enrichi au moyen de nids et d'abris en fibre végétale.

4568. L'animalerie centrale de notre institut héberge des souris exemptes d'organismes pathogènes spécifiques et pour conserver ce statut n'autorise l'accès à ses locaux qu'aux animaux provenant de fournisseurs préalablement agréés.

Les animaux provenant d'autres fournisseurs ne peuvent pas rentrer ce qui peut être un frein à un projet et au bon déroulement de la recherche scientifique.

Pour pallier ce problème de statut sanitaire, nous proposons à la communauté scientifique de réaliser la décontamination de leur lignée. Ceci signifie de rendre des lignées dépourvues de pathogènes spécifiques.

La technique consiste à prélever des ovules fécondés chez des femelles au mauvais statut sanitaire et à les implante dans des femelles au bon statut sanitaire. Ainsi la descendance sera dépourvue des pathogènes non souhaités et pourra être transférées dans l'animalerie centrale.

Conformément à la réglementation nous respecterons la règle des 3R :

*Remplacement : cette technique offre les meilleurs résultats en nombre d'animaux obtenus ainsi que dans la prise de risque sanitaire.

*Réduction : La redérivation se fait principalement avec les mâles d'intérêts avec lesquels nous accouplons des femelles de lignées commerciales. Les mâles sont réutilisés jusqu'au succès de la manipulation, puis redirigés vers d'autres projets.

*Raffinement : Les animaux ont tous une période d'acclimatation d'au moins une semaine et leur milieu de vie est contrôlé. Toutes les cages sont enrichies avec des cotons dentaires. Lors de chirurgies, les femelles receveuses reçoivent une anesthésie et une analgésie adéquates pour éviter toute douleur. Les animaux sont manipulés par du personnel compétent pour diminuer le stress.

Nous prévoyons d'utiliser 1860 souris sur 5 ans.

4569. La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie chronique, inflammatoire touchant 0.3% de la population française (250.000 patients en France). Cette pathologie entraîne des douleurs autant lorsque l'articulation est au repos que lorsque le patient se sert de celle-ci : ouvrir une bouteille, une porte, tourner une salade... Les traitements actuels peuvent permettre une rémission chez une minorité des patients alors qu'ils sont transitoirement efficaces voir inefficaces chez d'autres patients.

Les causes sont inconnues ; facteurs génétiques, facteurs environnementaux (fumer augmente le risque de développer une polyarthrite rhumatoïde) ou l'existence d'autres pathologies comme le psoriasis au cours duquel les patients accumulent inflammation de la peau et des articulations, on parle d'arthrite psoriasique.

La PR est une maladie qui réduit non seulement la qualité de vie mais également l'espérance de vie.

L'objectif de notre projet est de mieux comprendre les mécanismes d'action d'une molécule pro-inflammatoire, le Tumor Necrosis Factor alpha (TNFalpha), cible majeure des traitements actuels afin de faire la lumière sur la résistance de certains patients à ces traitements. Cette étude nécessitera l'utilisation de 30 souris. Le protocole a été choisi en suivant la règle des 3R, afin de limiter le nombre d'animaux utilisés et leur souffrance.

4570. La maladie de Parkinson est une affection neurologique d'origine incertaine, provoquée par la perte irréversible d'une population particulière de neurones qui produisent un messager chimique, la dopamine, et sont appelées neurones dopaminergiques. Parallèlement à cette mort neuronale, une réaction inflammatoire ou neuroinflammation, probablement toxique pour ces neurones, se développe et se traduit en partie par une réactivité des cellules immunitaires. L'objectif de ce projet est de tester l'effet neuroprotecteur d'une molécule qui agirait de façon directe ou indirecte sur les cellules du système immunitaire. Pour ce faire, l'utilisation d'un modèle animal est essentielle, car il permet de reproduire plusieurs caractéristiques neuropathologiques de la maladie, telles que la mort neuronale et les processus neuroinflammatoires associés.

Un total de 240 souris sera nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Tout au long de l'expérimentation, nous veillerons à réduire la douleur, la souffrance et le stress des animaux en mettant en place plusieurs principes tels que :

- l'acclimatation des souris pendant une semaine dès leur arrivée à l'animalerie

- l'hébergement des animaux en groupe avec la présence de nids de coton

- l'habituation des souris à l'expérimentateur en manipulant l'animal 1 à 2 fois par jour pendant 5 jours

De plus, le modèle utilisé dans ce projet nécessite une attention particulière car il consiste en l'injection d'une neurotoxine provoquant des effets secondaires indésirables comme l'hypothermie. Pour cette raison, les souris seront hébergées dans des armoires ventilées/chauffées et du gel hydratant sera ajouté au fond de la cage, ainsi que de la nourriture humidifiée.

4571. Ce projet a pour but d'étudier l'effet de composés à visée thérapeutique dans la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA). Cette maladie neurodégénérative touche les neurones moteurs et entraîne une paralysie progressive et la mort des patients en

moyenne 2 à 5 ans après le diagnostic. Les traitements proposés actuellement prolongent de deux à trois mois la survie des patients. Nous utilisons des modèles de souris de cette maladie pour étudier l'effet des composés sur la survie des animaux, la perte des motoneurons, l'activation gliale et différentes voies métaboliques. Ce projet utilisera 156 souris sur une durée de 5 ans. Tout au long de ce projet, nous nous assurerons de mettre en œuvre les règles de réduction, remplacement et raffinement (3Rs). Concernant la réduction, nous utiliserons le nombre d'animaux minimal nous permettant d'obtenir un résultat statistiquement significatif afin de pouvoir obtenir une conclusion scientifique à l'ensemble de nos travaux. Concernant le remplacement, ces modèles sont actuellement les seuls qui permettent de reproduire la paralysie progressive chez l'adulte et donc de modéliser la physiopathologie humaine, raison pour laquelle notre projet nécessite l'utilisation de souris. Cependant, dans un souci de raffinement, toutes les précautions seront prises afin de n'imposer aucune souffrance ou une contrainte minimale aux souris utilisées et avons, pour chaque procédure, défini un point limite. Un programme d'enrichissement sera suivi en ajoutant dans la cage les éléments suivants : « Mouse house » ou carrés de coton pour nids.

4572. La maladie de Parkinson est caractérisée par une mort neuronale dont le le mécanisme n'est pas entièrement élucidé. Plusieurs mécanismes sont potentiellement impliqués dans cette dégénérescence incluant, l'accumulation de protéine, une réaction inflammatoire, un stress oxydant et une augmentation des taux de fer dans les sites de lésion. Nos travaux antérieurs nous ont permis de mettre en évidence une dérégulation des systèmes de transport du fer et en particulier du transporteur de métaux divalents (DMT1). Des expériences réalisées dans un modèle animal de maladie de Parkinson provoqué par le MPTP chez la souris nous ont permis de montrer que ce transporteur est à l'origine d'une augmentation des concentrations de fer dans les régions lésées, un stress oxydant et une mort neuronale. Toutefois, les mécanismes de transports et de toxicité intracellulaires du fer ne sont pas connus. En particulier les liens entre l'augmentation de fer et l'inflammation ne sont pas encore élucidés. Récemment il a été montré que l'hepcidine a une distribution identique à celle du fer aussi bien dans les neurones que les cellules non neuronales. Ces données suggèrent que cette protéine pourrait constituer le lien entre les augmentations de fer et la neuroinflammation dans la maladie de Parkinson. L'objectif de ce travail est d'étudier *in vivo* dans des modèles de la maladie de Parkinson, le rôle de l'Hepcidine (qui est codée par le gène HAMP) dans l'inflammation et l'accumulation de fer avec pour finalité de déterminer si cette protéine protège les neurones dopaminergiques vis-à-vis du processus dégénératif et par quel mécanisme. Afin de déterminer directement le rôle de l'hepcidine les résultats seront comparés entre des souris sauvages et des souris chez lesquelles le gène de l'hepcidine est invalidé. L'utilisation d'une système "in vivo" est nécessaire pour étudier les interactions entre le système immunitaire et le système nerveux. L'espèce qui représente le meilleur modèle animal pour étudier les mécanismes fondamentaux de la maladie de Parkinson est la souris. Donc, en utilisant des modèles souris de la maladie, nous chercherons à déterminer le rôle bénéfique ou délétère de l'hepcidine sur les concentrations du fer, le stress oxydatif et la mort neuronale au cours de la maladie de Parkinson. Au total 164 animaux seront utilisés dans cette étude.

4573. Les neurones ne représentent qu'une partie des cellules du cerveau. Une autre population, très abondante, les astrocytes pourraient bien se révéler aussi importante pour le fonctionnement cérébral. Pourtant la compréhension de la fonction de ces cellules *in vivo* débute tout juste. Les astrocytes sont capables, comme les neurones, de libérer des molécules pour influencer l'activité d'autres astrocytes ou des neurones, il s'agit de la gliotransmission. Cette libération passerait par des canaux fonctionnels formés par des protéines particulières dont une est la connexine 43. Dans cette étude nous utiliserons un agent pharmacologique permettant de bloquer les canaux formés par ces connexines afin d'évaluer l'impact de la gliotransmission sur (1) un apprentissage de discrimination olfactive et (2) un type d'activité neuronale (sous forme d'oscillations) spécifiquement lié à cet apprentissage, qui est fréquemment étudié.

Nous utiliserons comme modèle expérimental le rat. Les rythmes cérébraux (semblables à des électroencéphalogrammes) seront enregistrés au cours de l'apprentissage de la discrimination olfactive. Le composé pharmacologique sera délivré avant l'acquisition de l'apprentissage pour voir s'il bloque la consolidation des informations mémorisées comme cela a été décrit dans la littérature au niveau de l'amygdale. Notre étude implique des processus cognitifs et ne peut pas être réalisée sur des cultures de cellules. Il n'est actuellement pas possible de remplacer ce type de protocole par des modèles "in silico". Sur les 3 années du projet, nous utiliserons un total de 36 rats pour les enregistrements en chronique et en comportement. L'avantage des enregistrements en chronique pendant l'apprentissage est de réduire le nombre total d'animaux étudiés puisque chaque animal sera enregistré en condition contrôle et sous traitement, et ces deux conditions seront comparées sur les mêmes animaux. Dans un souci de raffinement, nous veillerons en continu au bien-être des animaux par l'utilisation d'analgésie et d'anesthésie lors des procédures opératoires, et par un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement.

4574. Les biomarqueurs d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) pour l'évaluation de l'intégrité de la myéline et des axones dans le système nerveux central souffrent d'un manque de spécificité au niveau microstructurel. Une meilleure connaissance du rôle de la microstructure de la matière blanche des fonctions normales et pathologiques repose sur des métriques d'IRM permettant (i) plus de spécificité pour évaluer les caractéristiques de la matière blanche telles que l'architecture locale des fibres, la morphologie axonale, le contenu myélinique, et (ii) de distinguer les pathologies axonales des myéliniques. Deux nouvelles techniques d'IRM peuvent répondre à ces besoins. L'imagerie de diffusion basée sur des modèles biophysiques des tissus cérébraux et des compartiments cellulaires permet d'extraire par exemple des mesures de diamètres axonaux moyens ou de géométries cellulaires. La spectroscopie de diffusion exploite les propriétés de diffusion des métabolites intracellulaires et permet d'évaluer les diamètres et longueurs des fibres. La compartimentalisation spécifique des métabolites permet de différencier des

paramètres microstructuels entre cellules gliales et neuronales. Ces techniques très prometteuses requièrent des validations histologiques importantes afin d'être utilisables et interprétables en clinique. Dans ce projet, nous utiliserons des modèles expérimentaux de maladies myéliniques et axonales afin de valider ces biomarqueurs d'imagerie par des méthodes histologiques et de microscopie électronique.

Nous utiliserons sur 5 ans un total de 72 souris. 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 pour ce type d'étude.

4575. La cornée est le tissu le plus densément innervé de l'organisme. Les nerfs cornéens assurent la sensibilité proprioceptive (sensation de toucher) et nociceptive (sensation de douleur et de variation de température) et jouent un rôle important dans le réflexe de clignement, de production de larmes et de cicatrisation cornéenne.

De nombreuses études ont mis en évidence le lien entre la dysfonction de l'innervation cornéenne et l'apparition d'atteintes cornéennes. Ces atteintes vont de la simple sécheresse oculaire jusqu'à des pathologies cécitantes comme la kératite neurotrophique.

Environ 285 millions de personnes dans le monde souffrent de déficience visuelle sévère, dont 10% liée à une atteinte cornéenne. De même, parmi les 40 millions personnes aveugle dans le monde, plus de 1.5 millions sont atteints de pathologies cornéennes.

L'atteinte de l'innervation cornéenne est fréquemment responsable des pathologies cornéennes entraînant une baisse importante d'acuité visuelle. Ces atteintes peuvent être secondaires à de nombreuses pathologies infectieuses ou inflammatoires de la cornée.

Aucun traitement n'est actuellement disponible en routine malgré le nombre important de patients concernés.

Depuis quelques années, plusieurs molécules (slits, robo, neuropilines) capables de guider les axones cornéens pendant le développement ont été identifiées. Leur expression dans la cornée adulte suggère qu'elles puissent aussi influencer la plasticité des axones cornéens et leur régénération après lésion cornéenne.

Dans ce projet, nous allons comparer le développement et la plasticité des axones cornéens entre des souris sauvages et des souris déficientes pour des molécules de guidage axonal pour déterminer si ces molécules sont des cibles thérapeutiques pour le traitement des pathologies cornéennes.

Au total, 216 souris seront utilisées dans ce projet. L'utilisation de l'animal est indispensable dans le projet car il n'existe pas de modèle in vitro permettant de suivre les mécanismes de l'innervation cornéenne.

Ce projet devrait donc permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et d'élaborer des traitements innovant pour les patients atteint de pathologies cornéennes.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux auront à leur disposition des carrés de cellulose, des bâtons à ronger, un tunnel et une maisonnette. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

4576. Au cours des dernières années, l'identification de cellules souches au sein de tissus adultes et la démonstration de leur contribution à la régénération tissulaire a conduit à de nouvelles propositions thérapeutiques. Ainsi, la transplantation de populations progénitrices est aujourd'hui envisagée pour le traitement de maladies qu'elles soient d'origine génétique ou acquise pour lesquelles une atteinte de la fonction de tissu est avérée. C'est notamment le cas des dystrophies musculaires pour lesquelles l'utilisation de cellules myogéniques a été proposée comme une des possibles stratégies thérapeutiques dans le cadre de plusieurs dystrophies musculaires.

Ce projet consiste à étudier le comportement in vivo de cellules souches humaines à potentiel myogénique isolées à partir du muscle squelettique humain en le comparant à des myoblastes humains qui nous sert de référence. On étudiera la capacité de ces cellules à participer à la régénération musculaire. Le choix d'un modèle immunodéficiente est indispensable puisque il s'agit de tester des cellules humaines. Egalement un modèle immunodéficiente et dystrophique est indispensable pour analyser le devenir des cellules humaines dans un contexte pathologique. Pour cela le muscle Tibialis Anterior (TA) a été choisi comme muscle cible de l'injection. En totale 32 souris immunodéficientes et immunodéficientes/dystrophiques seront utilisées. Afin de réduire le nombre de souris utilisées dans le respect de la règle des 3R, les deux TA de chaque souris seront injectés, réduisant ainsi le nombre des souris utilisé de la moitié. Les souris sont anesthésiées par injection du mélange Kétamine/Xylazine. Lors de la période post-opératoire les animaux recevront un analgésique (Buprenorphine). Suite au réveil, les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de déceler des signes de douleur. Les animaux qui montrent un signe quelconque de détérioration de leur santé seront euthanasiés.

4577. L'échographie est régulièrement utilisée à usage diagnostique pour mettre en évidence des lésions et ce, sans effets secondaires sur l'organisme. De plus en plus, elle prépare à des gestes chirurgicaux ou les complète. Elle peut par exemple servir à visualiser des trajets vasculaires ou nerveux préalablement à des cathétérismes de vaisseaux ou des injections péri nerveuses. L'injection d'anesthésique local au plus près des structures nerveuses permet d'optimiser l'anesthésie locale ou locorégionale. Ces approches sont très régulièrement utilisées en milieu hospitalier et nous souhaitons qu'elles soient enseignées dans les centres

d'expérimentation animale. Notre objectif est que les conditions d'exercice vétérinaires soient les plus proches possibles des conditions du milieu médical humain.

Ces formations seront à destination des expérimentateurs (concepteurs de projets, praticiens, vétérinaires) susceptibles soit de réaliser des protocoles invasifs nécessitant des anesthésies loco-régionales de qualité soit de cathétériser des vaisseaux de la façon la moins invasive possible.

Dans l'objectif de respecter le principe des 3R, nous envisagerons :

-Le Remplacement par utilisation de prélèvements d'abattoir (cuisse ou épaule par exemple) afin de minimiser le recours aux animaux vivants pour l'étape préliminaire d'apprentissage et de prise en main du matériel

-La Réduction par l'optimisation du nombre d'animaux présents : les stagiaires seront par groupe de trois et deux groupes pourront travailler sur le même animal en même temps

-Le Raffinement par réalisation de tous nos travaux pratiques sous anesthésie générale dans une procédure sans réveil. Les animaux seront hébergés par 2 ou 3 porcelets (20 à 30 kgs) dans des cases propres, avec paille à disposition.

La formation se fera sur le modèle porcin car il est de plus en plus répandu dans les établissements d'expérimentation du fait de sa proximité avec l'Homme (anatomie, physiologie, métabolisme...) et de sa facilité de manipulation et d'élevage (facilité d'approvisionnement).

La formation comprend environ 15 stagiaires, nous utiliserons 3 porcelets.

4578. Les maladies neurodégénératives sont un problème de santé public majeur. Parmi les traitements palliatifs possibles, la pratique d'une activité cognitive régulière visant à limiter la mort neuronale est très utilisée. Ces tâches cognitives permettent de maintenir un niveau d'activité cérébral important qui permet probablement la mise en place de mécanismes favorisant la survie des neurones. Cependant cette survie dépendante reste mal comprise puisque les neurones concernés sont difficilement identifiables. Est-ce que les neurones actifs sont les seuls à survivre? Comment cette survie spécifique se répercute sur l'activité cérébrale ? Quel type d'activation est le plus adapté pour optimiser cette survie ? Dans ce projet nous étudierons cette problématique dans le système olfactif. Nous disposons d'une souche de souris génétiquement modifiée de façon non dommageable, pour laquelle une population précise de neurones olfactifs, qui est activée par une odeur connue, possède une molécule fluorescente et est donc facilement identifiable. Nous réaliserons des études de biologie moléculaire et cellulaire, et de l'imagerie sur des animaux qui ont préalablement réalisés des tests d'apprentissage à base d'odeurs. Notre étude s'intéresse à des processus cognitifs et à des mécanismes de plasticité à long terme; elle ne peut pas être réalisée sur des modèles "in silico" ni sur des cultures de cellules. Sur les 3 années du projet, nous utiliserons un maximum de 240 souris. Dans un souci de raffinement, nous veillerons en continu au bien-être des animaux par l'utilisation d'analgésie et d'anesthésie lors des procédures chirurgicales, et par un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement.

4579. Le flux sanguin rétinien joue un rôle central dans la pathophysiologie de nombreuses maladies oculaires, soit par occlusion capillaire, hypoperfusion, ou variations de distribution d'écoulement. L'analyse non invasive de l'hémodynamique rétinienne a été réalisée grâce à diverses méthodes d'imagerie en lumière cohérente, parmi lesquelles le laser Doppler, l'analyse spatiale et temporelle du contraste de speckle, les caméras rétiniennes stroboscopiques. Chacune de ces approches a ses propres limites en termes de sensibilité, de résolution spatiale et temporelle, ou de champ latéral d'imagerie.

La méthode d'imagerie que nous souhaitons expérimenter surmonte cette limitation: nous avons réalisé un interféromètre holographique à haut débit pour la cartographie bidimensionnelle des vitesses d'écoulement sanguin de la rétine, et de leurs composantes pulsatiles. Notre nouvelle technique d'imagerie nous permettra d'étudier le flux sang de la rétine, tissu le plus vascularisée de l'organisme (rat, homme)

Nous avons choisi de prendre des rats car leur yeux sont plus grand et nous préférons passer par une étape animale n'utilisant pas beaucoup d'individus avant de faire les premiers essais sur l'homme.

Nous envisageons d'utiliser au maximum 40 rats sur 5 ans.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum et pour raffiner ils seront dans la mesure du possible certains rats (10) proviendront d'un autre projet de recherche déjà validé ou seront intégrés à un autre projet après imagerie. Tous les animaux seront stabulés en portoirs ventilés et auront un enrichissement dans leur cage.

4580. Conservation et restauration constituent deux approches souvent isolées, alors même que leur objet est fondamentalement le même : préserver la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes.

Dans ce projet de thèse, nous proposons de fusionner les approches conservacionniste et fonctionnaliste en associant les compétences présentes au sein de deux laboratoires dans la réalisation d'une expérience novatrice d'introduction de communautés piscicoles dans les 16 lacs de l'Equipex PLANAQUA. Afin de recréer des conditions d'habitat naturel, les lacs ont un volume de 750m³ et sont structurés spatialement avec deux zones littorales végétalisées et une zone centrale profonde. Ces petits lacs peu profonds (PLPP) constituent un modèle expérimental unique pour l'étude des dynamiques d'écosystème spatialisées. De plus les PLPP, très fréquents en milieux périurbains, sont particulièrement adaptés pour étudier les dimensions humaine et sociétale de la vulnérabilité des écosystèmes. L'objectif est de mesurer les effets des nutriments (forçage par le bas, bottom-up, simulant l'eutrophisation) et des super prédateurs (forçage par le haut, top-down, simulant la perte des grands prédateurs) sur le succès d'introduction des espèces dominantes et des espèces rares de la communauté piscicole (abondances, croissances, survies, reproductions), ainsi que les effets en cascade induits par ces espèces sur le fonctionnement et les services écosystémiques. Le

projet bénéficiera d'un suivi longitudinal des communautés non vertébrées en place sur les lacs PLANAQUA faisant intervenir un consortium de laboratoires franciliens, ainsi que de l'instrumentation automatisée enregistrant en continu le profil physico-chimique de chaque lac.

Dans ce projet, nous proposons d'introduire dans chaque lac une communauté piscicole dans laquelle un super prédateur (2 brochets) sera présent ou absent dans la moitié des lacs. Les autres espèces de poissons de la communauté seront choisies comme représentatives des espèces dominantes en occurrence et en abondance (30 perches et 100 gardons par lac) ainsi que des espèces plus rares (30 goujons, 30 épinochettes et 30 ables de Haeckel par lac) soit en tout 3536 individus toutes espèces confondues. Les densités initiales de chaque espèce à l'introduction reflètent les densités communes dans les étangs périurbains. Puis, en 2017 et 2018, nous mesurerons par marquage - recapture l'effet des quatre traitements expérimentaux (nutriments et super prédateurs) sur le succès d'établissement de chaque espèce dans chacun des 16 lacs (abondances, survie et reproduction). Nous mesurerons également les effets en cascade induits par les poissons sur l'abondance des différents compartiments clé de l'écosystème (phyto et zooplancton, macroinvertébrés benthiques, pélagiques et littoraux, sédiments littoraux et benthiques, macrophytes).

4581. Le sepsis est une réaction aigüe complexe due à la libération d'endotoxine lipopolysaccharide (LPS) dans la circulation qui va provoquer des perturbations inflammatoires et métaboliques conduisant le plus souvent, si l'agent infectieux n'est pas éradiqué, à la mort de l'individu. L'objectif du projet sera d'étudier le rôle de PPARalpha dans la réponse métabolique et inflammatoire des souris au cours d'un sepsis. Le sepsis induit une réaction complexe multi-organe qui nécessite des études sur organisme entier et qui ne peut être réalisée que par le biais de modèles animaux adaptés. Le projet a été conçu avec un nombre minimal d'animaux nécessaire pour assurer sa validité scientifique et statistique qui est évalué de 8 à 15 animaux/ groupe suivant les expériences soit un total de 1214 souris (610 PPARalphaWT et 604 PPARalphaKO) sur une durée de 5 ans. Ce nombre est basé sur notre expérience antérieure. Les femelles seront exclusivement utilisées car elles sont plus sensibles à l'inflammation. Les analyses biochimiques nécessitent un minimum de 8 animaux par groupe et les analyses de survie de 15 animaux par groupe. Nous utiliserons des analyses non paramétriques. Les différentes lignées utilisées dans nos procédures (PPARalphaWT et PPARalphaKO) ne présentent aucun problème physique ou physiologique. Le modèle de sepsis par injection intrapéritonéale de bactéries non pathogènes DH5a mimant une septicémie aigüe entraîne une douleur et un stress qui peut durer de 3 à 5 jours et qui conduit à la mort des souris, un critère d'efficacité de l'infection. Les méthodes de prévention et de traitement de la douleur et du stress disponibles interfèrent avec l'étude. Toute médication visant à réduire l'inflammation interférerait avec l'étude. Quant à l'utilisation du nefopam, un analgésique non morphinique, les effets indésirables sur la réponse immune (réaction d'hypersensibilité) pourrait également interférer avec notre étude. Seul un suivi quotidien (plusieurs fois par jours) des animaux (variation du poids de l'animal, apparence physique externe, signes cliniques mesurables (prostration) changement de comportement, réponses comportementales aux stimuli externes) et un enrichissement du milieu peuvent être effectués. La prostration et la chute de la glycémie <15mg/dl est le point limite menant à l'euthanasie par dislocation cervicale après anesthésie gazeuse à l'isoflurane (débit d'air : 0.9 l/min, pourcentage d'isoflurane : 3%) ou par injection de kétamine/xylazine (catégorie 5 d'après la grille CNRS).

4582. Les succès récents obtenus en immunothérapie démontrent que la restauration d'une bonne immunité chez les sujets porteurs de tumeurs malignes est un élément essentiel et même pratiquement obligatoire pour obtenir la guérison de ces patients. Notre équipe a mis en évidence les effets délétères d'une protéine immunosuppressive (PI) dont les effets se font sentir dans plusieurs types de cancers humains ; par exemple dans les cancers du cavum (en arrière des fosses nasales) ainsi que dans les cancers du rein et du foie. Poursuivant à la fois des objectifs de recherche fondamentale et d'application thérapeutique, notre équipe a produit des anticorps monoclonaux qui sont capables in vitro de neutraliser les effets de la PI.

Pour pouvoir envisager sérieusement l'utilisation d'agents thérapeutiques dérivés de ces anticorps monoclonaux, il est nécessaire d'avoir la preuve de leur capacité d'action et de l'absence d'effets secondaires inacceptables en les soumettant à des tests d'efficacité et de sécurité dans des organismes entiers. Comme la grande majorité des immuno-modulateurs, notre PI exerce ses effets sur un grand nombre de types cellulaires. Il est donc impossible d'anticiper la résultante de tous ces effets combinés dans un organisme humain sans passage par un mammifère entier. C'est la raison pour laquelle il n'existe pas actuellement d'alternative possible à des évaluations de nos anticorps sur des modèles murins de lignées tumorales riches en PI. Ceci doit nous permettre d'avoir des arguments solides pour ou contre la préparation d'un éventuel essai clinique. Un élément favorable dans ce contexte est le fait que nos anticorps monoclonaux anti-PI réagissent aussi bien avec la protéine humaine qu'avec la protéine de souris. Ceci valide a priori le modèle murin.

C'est pourquoi nous nous proposons d'utiliser une lignée de cancer de souris produisant de fortes quantités de PI qui seront inoculées à des souris syngéniques, c'est-à-dire de même groupe tissulaire (souris Balb-C). Ces souris seront de deux types : souris Balb-C non modifiées génétiquement ou souris modifiées génétiquement pour la PI. Après inoculation tumorale, les souris seront traitées soit avec des anticorps témoins soit avec des anticorps anti-PI et nous verrons si les anticorps anti-PI permettent de ralentir la croissance tumorale ou même de faire régresser ces tumeurs.

En termes de remplacement, notre équipe développe des outils biologiques qui devraient permettre à l'avenir de tirer le maximum d'informations lors des essais cliniques anti-PI chez l'homme et peut-être même chez des animaux domestiques victimes de tumeurs spontanées. Dans le futur, ceci devrait permettre de limiter le recours à l'expérimentation animale pour l'étude des anticorps anti-PI. Le caractère indispensable du recours à la souris pour ce projet est démontré ci-dessus.

En termes de réduction, nous prévoyons de limiter l'effectif des souris à traiter sans pour autant compromettre l'évaluation statistique des résultats. Cet objectif sera atteint en combinant l'étude des effets anti-tumoraux avec une étude des cellules du

système immunitaire et de biomarqueurs biologiques. Nous prévoyons d'arriver à une preuve de concept avec un effectif de 210 souris.

En termes de raffinement, il faut noter que les tumeurs seront positionnées sur le flanc des animaux de façon à générer le moins possible d'inconfort. La surveillance clinique quotidienne des animaux permettra de dépister les tous les problèmes pour action immédiate. Des dispositifs d'enrichissement du milieu seront installés dans les cages. Tous les prélèvements sanguins ou tissulaires auront lieu dans des conditions d'absence totale de sensibilité, soit sous anesthésie profonde et irréversible soit après la mise à mort. Enfin, les souris modifiées génétiquement utilisées dans ce projet ne sont pas sujettes à des souffrances ou à des dysfonctionnements générateurs d'inconfort du fait de la manipulation génétique (phénotype non dommageable).

4583. Les maladies hépatiques chroniques telles que la cirrhose du foie et le carcinome hépatocellulaire (CHC) sont des défis majeurs pour la santé mondiale. Le CHC est en effet la 2ème cause de mort par cancer dans le monde et le seul cancer à ne pas avoir régressé ces dernières années en terme d'incidence et de mortalité. Les thérapies permettant le traitement de cette pathologie sont très limitées et les stratégies thérapeutiques visant à prévenir le CHC chez les patients à risque, infectés par le virus de l'hépatite B ou C (VHB, VHC), et présentant une cirrhose hépatique ou une fibrose avancée sont inexistantes. De plus, il a été montré que même suite à l'éradication du VHC, le risque de développement de CHC persiste quand une fibrose avancée est déjà présente. Cette absence d'option thérapeutique reflète notre méconnaissance des mécanismes moléculaires précoces impliqués dans la progression de la maladie hépatique. Récemment, nous avons développé un anticorps monoclonal de rat dirigé contre une protéine de jonction serrées. Cet anticorps s'est montré très efficace in vitro pour induire une réponse de bon pronostic dans un modèle de carcinome hépatocellulaire. Afin de valider ces résultats, nous avons produits les versions humaine et murine de cet anticorps que nous souhaitons tester in vivo dans différents modèles de souris. Un modèle de souris hépato et immunodéficientes greffées avec des hépatocytes humains, et un modèle classique immunocompétent. Pour chaque modèle nous induirons le développement de la maladie hépatique (fibrose, stéatohépatite, CHC) par injection d'un agent chimique et/ou un régime alimentaire riche en graisse. L'injection de l'anticorps nous permettra de vérifier l'innocuité du produit ainsi que son action sur le développement de la maladie. Pour cette étude nous estimons le nombre d'animaux nécessaire à 120. Afin de remplacer et de réduire au maximum le nombre d'animaux requis la majorité des expériences ont été menées en amont, in vitro sur des lignées cellulaires et ex vivo sur des biopsies de patients atteints de maladie hépatique (VHC, VHB, cirrhose, stéatose hépatique non alcoolique...), afin de nous assurer de la réelle nécessité de poursuivre sur des modèles animaux. Afin de raffiner aux mieux notre méthodologie le protocole expérimental est planifié en amont, l'environnement des animaux est enrichi, si besoin un analgésique dont la durée d'action s'étend au-delà de 24h est utilisé, des points limites que sont l'apparition de signes de mal être et de douleur, persistant au-delà de 48h suite à l'injection d'un analgésique sont appliqués et une méthode de mise à mort appropriée est utilisée.

4584. Les essais thérapeutiques récents utilisant des composés immuno-modulateurs ont donné des résultats extrêmement prometteurs sur certains types de cancers comme les Mélanomes métastatiques (Cancer de la peau ou des muqueuses développé au dépens des mélanocytes,). Les immunothérapies par anticorps anti-CTLA4 (Ipilimumab) ou anti-PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) ont des effets spectaculaires sur l'inhibition de la croissance tumorale. A ce jour, les résultats sont très encourageants mais le pourcentage de malade répondant au traitement reste encore faible et les effets secondaires sont importants. La recherche s'intéresse donc de très près à la caractérisation de nouveaux composés immuno-modulateurs et aux thérapies combinatoires pour atteindre un taux de succès plus élevé. Ce projet s'inscrit dans cette dernière perspective.

Dans le protocole présenté ici, la souris est utilisée comme modèle préclinique. Différentes lignées tumorales utilisées sont implantées en sous-cutanées chez la souris, elles produisent en quelques semaines une tumeur. Les cellules qui seront injectées dans nos protocoles sont issues de lignées largement utilisées dans les essais précliniques de composés immunomodulateurs par les laboratoires académiques et industriels du monde entier. Il sera donc possible de comparer les résultats obtenus en utilisant les composés que nous testerons avec ceux obtenus par d'autres équipes de recherche. Nous nous intéressons ici plus particulièrement à la description exhaustive de toutes les cellules immunes infiltrant la tumeur et à leur rôle dans le contrôle de la pousse tumorale. Ces études seront réalisées de manière séquentielle pour déterminer l'action de ces composés sur la pousse tumorale, la dose optimale à injecter et au final la réponse du système immunitaire sera étudiée. Dans chaque cas nous nous limiterons au nombre d'animaux permettant de répondre clairement à la question posée. Ces études ont pour but à la fois le suivi de la pousse tumorale mais aussi la réponse du système immunitaire. Ce type d'expérimentation doit être effectué in vivo, la demande est déposée pour un nombre maximum d'animaux de 3000 sur 5 années.

Dans notre structure, pour diminuer le stress et l'anxiété des animaux, ils sont regroupés par 5 dans des cages avec enrichissement, ajout de deux produits "Enrichment Diamond Twists" Harlan) et "Dome Home" (Special Diet Service). L'injection de la tumeur est effectuée sur animaux anesthésiés. Le suivi des animaux est journalier tout au long de l'expérimentation avec une évaluation suivant une grille établie prenant en compte la pousse tumorale, la perte de poids de l'animal, le comportement et l'apparence. Toute souffrance est accompagnée de mesure corrective.

4585. L'obésité étant associée à de nombreuses pathologies graves (diabète de type II, atteintes vasculaires, hypertension, maladies neurodégénératives, certains cancers), cet état constitue sans conteste un des principaux challenges de santé publique du XXIème siècle. Une consommation excessive d'aliments riches en graisses (notamment en acides gras saturés) explique, en partie, ce phénomène.

Notre équipe a récemment montré chez la souris qu'il existait un système de détection oro-sensoriel des lipides alimentaires dans lequel le lipido-récepteur CD36 serait impliqué en modulant la sélection et la digestion des aliments riches en graisses. Ces données inédites suggèrent l'existence d'une 6ème modalité gustative : le « goût du gras ».

Nos travaux récents indiquent qu'il existe une diminution de la sensibilité de la détection oro-sensorielle des lipides alimentaires chez la souris rendue obèse par un régime hyper gras. Nous avons montré que cette altération est liée à une dérégulation du système de détection des lipides au niveau des papilles gustatives. Ce changement s'accompagne d'une modification du comportement alimentaire se traduisant par une consommation préférentielle d'aliments riches en graisses. A ce jour les mécanismes moléculaires responsables de cette dérégulation ne sont pas connus. La modification du statut inflammatoire des papilles gustatives est une des pistes plausibles. En effet, l'obésité se traduit par un relargage dans le sang de toxines pro-inflammatoires d'origine bactérienne : les lipopolysaccharides (LPS). Comme les papilles gustatives sont sensibles aux LPS, l'objectif de ce projet sera d'explorer l'impact d'un processus inflammatoire LPS-dépendant, mimant ce qui se passe au cours de l'obésité, sur la détection oro-sensorielle des lipides et le comportement alimentaires. 60 souris mâles adultes seront réparties en 2 groupes et subiront une chirurgie afin de leur implanter une mini-pompe osmotique permettant une diffusion continue d'une faible quantité de LPS mimant ainsi la situation observée au cours de l'obésité. A la suite de cette implantation, les animaux participeront à des tests de comportement alimentaire (double choix) de sorte de déterminer si leur capacité à détecter les lipides ont été altérées. La durée totale d'expérimentation par animal sera de 5 semaines et la durée totale du projet scientifique sera de 12 mois.

Ce projet est en adéquation avec la règle des 3R:

Remplacement: Ce projet fait appel à des tests de comportement alimentaire, qu'il est impossible de reproduire *in vitro*. Il est donc nécessaire d'avoir recours à l'expérimentation animale faute de modèles alternatifs.

Réduction: Pour garantir la fiabilité des analyses statistiques, 30 animaux par groupe sont requis. Le nombre d'animaux inclus dans ce protocole est réduit au minimum (calcul de puissance statistique réalisé à l'aide des outils fournis par DSS research). Il se justifie par la nécessité de procéder à des tests comportementaux, ainsi que des analyses biochimiques (transcriptomique et protéomique) au niveau de l'unique papille gustative caliciforme trouvée chez la souris. Pour toutes les techniques fonctionnelles et biochimiques, les mises au point réalisées au laboratoire permettent de minimiser le nombre d'animaux nécessaire à l'obtention d'une donnée. Cependant, si au cours de l'expérimentation il s'avère possible d'utiliser moins d'animaux, nous réduirons le nombre total d'animaux utilisés.

Raffinement: La souris représente une espèce de choix dans l'étude du comportement alimentaire (préférence spontanée pour les lipides, nombreuses études déjà réalisées). Les animaux seront hébergés dans des cages standards avec de l'enrichissement (frisottis de carton). Les tests en double choix sont effectués dans les cages de vie et ne nécessitent pas le sacrifice de l'animal. Des points limites ont été identifiés et un suivi de l'état général des animaux sera réalisé grâce à une grille de score (suivi de masse corporelle, modifications comportementales, état du pelage, signes de souffrance). Des traitements antalgiques seront utilisés pour limiter la douleur post-chirurgicale, les animaux présentant des signes de souffrances persévérant malgré les traitements seront euthanasiés

4586. Les vitamines donneurs de méthyles (vitamines B9 et B12) sont des acteurs clés d'une voie métabolique qui permet d'assurer des mécanismes biologiques essentiels (synthèse d'ADN, multiplication cellulaire...) et contribue à l'élimination de l'homocystéine, une molécule dont l'accumulation est toxique pour l'organisme. Une carence en l'un de ces composés est connue comme facteur de risque pour différentes maladies, et les deux vitamines sont indispensables pour un développement cérébral harmonieux. A ce titre, des apports nutritionnels pauvres en vitamines B9 et B12 sont fréquents chez la femme enceinte dont les besoins sont accrus. Cela justifie la recommandation d'une supplémentation en B9 (folates) au cours du 1er trimestre de grossesse pour prévenir des anomalies graves comme le spina bifida. Ces anomalies s'accompagnent de conséquences fonctionnelles délétères : retard d'acquisition des fonctions motrices et altérations cognitives comme des difficultés d'apprentissage et de mémorisation.

Ainsi, les questions auxquelles nous souhaitons répondre sont :

- Quelles sont les conséquences d'une carence précoce en donneurs de méthyles (vitamines B9 et B12) sur le développement cérébral au cours de la période embryofœtale et sur la maturation périnatale ?

- Une supplémentation plus tardive que les recommandations habituelles en folates peut-elle exercer des effets bénéfiques ?

Pour répondre à ces questions, qui nécessitent l'intégration de données anatomiques et fonctionnelles à l'échelle de l'individu et ne présentent donc aucune alternative *in vitro* (remplacement), nous utiliserons un modèle validé de carence gestationnelle chez le rat Wistar. Il s'agit d'étudier le développement des embryons de mères carencées puis d'observer les possibles modifications selon la fenêtre temporelle au cours de laquelle nous effectuerons la supplémentation (3ème tiers de la gestation ou 3ème tiers de gestation + période d'allaitement).

Ce projet de recherche fondamentale s'appuie sur 3 protocoles successifs qui permettront, avec le minimum d'animaux possible (réduction), d'obtenir des résultats statistiquement exploitables sur les différents paramètres étudiés ; il nécessitera 45 géniteurs et environ 405 descendants (du stade embryonnaire au stade adulte). Les animaux seront maintenus dans une animalerie agréée et dans les conditions de stabulation respectant la réglementation en vigueur. Toutes les procédures expérimentales auront lieu dans un environnement sécurisant pour l'animal, et les animaux seront surveillés quotidiennement. Les animaux ne subiront aucun traitement invasif, en dehors du régime nutritionnel maternel transitoirement dépourvu de vitamines B et/ou une supplémentation en folate par voie orale. En dehors des périodes de gestation et d'allaitement, les animaux seront répartis à raison de 2 par cage standard pour favoriser les interactions sociales. En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des prélèvements seront effectués (sang, cerveau) pour permettre des analyses biochimiques, histologiques et moléculaires. Les animaux (mères et portées) seront anesthésiés et mis à mort selon la directive européenne tandis que les mâles reproducteurs (non traités) seront réutilisés sur

plusieurs protocoles (raffinement). A tout moment, en cas de signes avérés de souffrance ou de dépérissement, les animaux seront isolés et euthanasiés de façon réglementaire.

4587. La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après l'étude multicentrique STAR*D, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements. Certains de ces mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant l'utilisation de techniques d'immunohistochimie par exemple. Ces méthodologies ne peuvent être réalisées qu'au travers d'une approche préclinique. En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude:

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu

Remplacement : aucune méthode alternative ni substitutive n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée.

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

Des travaux récents ont indiqué un effet antidépresseur du protoxyde d'azote et de la kétamine dans le modèle du stress chronique. Nous souhaitons confirmer ces résultats en utilisant un test comportemental plus classique et observer comment l'effet du protoxyde d'azote varie après son administration.

Pour cette expérience, 180 souris sont requises réparties en 4 expériences contenant chacune 3 lots de 15 souris.

4588. La toxoplasmose, parasitose cosmopolite due au parasite protozoaire *Toxoplasma gondii*, touche 5000 femmes enceintes par an en France, soit 1% des grossesses, et peut se manifester par des malformations fœtales et des avortements. Il n'existe pas de vaccin contre la toxoplasmose. Les traitements actuels (spiramycine au premier trimestre de grossesse puis pyriméthamine/sulfadiazine) ne sont pas spécifiques du parasite et leur efficacité est critiquable. De plus, ils doivent être pris quotidiennement jusqu'à la naissance entraînant une toxicité à plus ou moins long terme (atteintes hématologiques, allergies graves).

Il est donc nécessaire de développer de nouvelles alternatives thérapeutiques dans le traitement de la toxoplasmose par l'identification de molécules plus spécifiques et moins toxiques.

Des molécules ciblant une enzyme de *Toxoplasma gondii* sans homologue chez les mammifères, inhibent la prolifération du parasite in vitro et in vivo dans un modèle de toxoplasmose murine aiguë sans causer de toxicité rénale ou hépatique à court terme. Les molécules doivent maintenant être testées dans un modèle de toxoplasmose congénitale afin de déterminer si elles sont capables de réduire l'infection fœtale.

Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de 468 souris (36 femelles et leur descendance estimée à 432) dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Les molécules ont été testées in vitro mais des tests sur animaux sont nécessaires avant de les prescrire à la femme enceinte.

- Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques en tenant compte du rendement de gestation et de l'efficacité attendue.

- Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec la législation dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger).

4589. Durée du projet: 5 ans

Mot clés: développement, migration, prolifération, cortex, maladie du neurodéveloppement

Type du Projet : Recherche Fondamentale

Le cerveau est un organe éminemment complexe, constitué de milliards de neurones. Lors du développement embryonnaire, des défauts dans la multiplication cellulaire, dans la différenciation, dans la migration des neurones ou dans l'établissement des connexions sont à l'origine de nombreuses maladies neurodéveloppementales (épilepsie, schizophrénie, retard mental, autisme) qui affectent les fonctions cérébrales. Les fondements biologiques de ces pathologies sont encore très imparfaitement connus. Etant donné la prédominance de ces pathologies, les coûts financiers qu'ils engendrent et leur retentissement social, un enjeu majeur de la recherche en Neurosciences est de comprendre le développement du cerveau humain et d'identifier les défauts associés à ces maladies. Nos travaux s'inscrivent dans cette démarche et ont pour objectif de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans le développement du cortex cérébral.

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est d'étudier l'effet de protéines régulatrices du cycle cellulaire sur le développement du cortex cérébral avec deux axes principaux :

(1) Le comportement prolifératif et différenciatif des précurseurs corticaux.

(2) la migration des neurones et précurseurs corticaux

Cette étude est réalisée chez la souris. Ce modèle, utilisé classiquement par plus de 90% des laboratoires travaillant sur le développement du cortex cérébral, permet d'observer des mécanismes fondamentaux de prolifération, différenciation et migration-

ainsi que leur fondement moléculaire- qui sont également présents chez les mammifères supérieurs. De nombreux mutants murins ont été produits, permettant d'étudier les effets de l'inactivation de certains gènes.

Nous réalisons déjà des approches *in vitro* et *ex vivo*, cependant l'analyse *in vivo* reste incontournable, pour analyser les mécanismes cellulaires et moléculaires dans un environnement physiologique. Nous réalisons plusieurs conditions expérimentales par souris. L'étude d'un gène nous permet de réaliser plusieurs observations *in vivo* et *ex vivo* sur un même animal. Nous avons optimisés nos équipements pour augmenter le nombre d'échantillons analysés simultanément et diminuer ainsi le nombre d'animaux nécessaire.

Les souris ont à leur disposition différentes formes d'enrichissement afin de réduire l'ennui et le stress. Aucun effet néfaste sur l'animal n'est attendu suite à la modification de l'expression des gènes. La souffrance est contrôlée par une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude. Les animaux présentant des signes de douleur reçoivent une injection d'analgésique. En cas de douleur persistante malgré les traitements entrepris, l'animal est euthanasié. Le degré de sévérité des différentes procédures est de niveau modéré et le sort final des animaux est l'euthanasie.

Nous prévoyons d'utiliser 1500 souris pour réaliser cette étude.

4590. Lors de la fabrication des aliments destinés aux porcs, les différentes matières premières impliquées dans la formule sont broyées et mélangées pour la constitution d'une farine homogène. Cette farine peut par la suite subir une granulation, traitement technologique qui se caractérise par le passage forcé de la farine dans une presse, en présence de vapeur d'eau et induisant une élévation de température de l'aliment. Ce traitement technologique induit une cuisson de l'aliment et une action mécanique sur ses constituants, qui peut permettre d'améliorer l'utilisation digestive des nutriments (protéines, glucides, lipides) et de l'énergie de l'aliment, se traduisant par une amélioration des performances de l'élevage de 5 à 10%. Cette meilleure utilisation de l'aliment par l'animal n'est aujourd'hui pas prise en compte car il n'existe pas de références permettant de chiffrer l'efficacité du traitement technologique, notamment en fonction des caractéristiques de l'aliment (composition en matières premières) et de l'intensité du traitement technologique (température de cuisson).

L'objectif du projet est ainsi de caractériser l'utilisation digestive des nutriments et de l'énergie de matières premières parmi les plus utilisées en formulation d'aliments pour porcs, en fonction de l'intensité du traitement technologique appliqué lors de la granulation, afin de proposer des valeurs nutritionnelles en adéquation avec la valorisation par l'animal. Le projet sera conduit en 3 étapes ; les 2 premières étapes consisteront en la mesure de coefficients d'utilisation digestive au niveau fécal des nutriments de 48 régimes, différant par leur composition et/ou l'intensité du traitement technologique appliqué. Ces deux étapes impliqueront 252 porcs. La troisième étape consistera en la mesure de coefficients d'utilisation digestive au niveau idéal des nutriments de 24 régimes, différant par leur composition et/ou l'intensité du traitement technologique appliqué. Elle impliquera 28 porcs.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est mesurer l'utilisation digestive des nutriments chez le porc et il n'existe pas de modèle mathématique ou *in vitro* permettant d'atteindre cet objectif. Réduction : le nombre d'animaux et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin de mesurer l'utilisation digestive des nutriments et de l'énergie avec une précision de +/- 1% tout en limitant le nombre d'animaux. Raffinement : afin de limiter l'hébergement en cage à digestibilité limitant les mouvements de l'animal, les animaux seront d'abord hébergés dans des cages leur permettant de se retourner. Les cages seront placées de façon à permettre un contact visuel, sonore, olfactif et tactile entre les animaux.

4591. Il a été récemment prouvé que l'implantation d'une prothèse biliaire lors de la transplantation hépatique permettait de diminuer les complications biliaires dans les suites de la greffe. A l'heure actuelle sont utilisées en pratique courante des prothèses en silicone, qui nécessitent un geste d'ablation endoscopique potentiellement à risque de complications.

Afin d'éviter cette dernière intervention, nous cherchons à développer une prothèse bioresorbable, visible radiologiquement.

Pour cela, nous utilisons un matériau polymère biodégradable dans les tissus vivants et radio-opaque.

L'objectif de ce projet est d'implanter chez le rat un échantillon de polymère pour évaluer son comportement radiologique et mécanique au cours de la dégradation *in vivo*. Pour le comportement radiologique, les rats seront soumis à un scanner X à différentes étapes de la dégradation. Pour le comportement mécanique, les échantillons seront explantés à différents temps de dégradation et testés *ex-vivo*.

Cette expérimentation est une étape indispensable dans le développement de ce dispositif en vue de l'application chez l'homme.

Aucun modèle non *in-vivo* ne peut être utilisé pour ce type d'expérimentation.

Cependant, l'ensemble des expérimentations seront réalisées dans le respect de la règle des 3 R : remplacer, réduire et raffiner. Le nombre d'animaux (17 rats Wistar) a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les animaux seront hébergés dans des cages avec enrichissement du milieu de vie. L'ensemble des procédures mises en œuvre seront réalisées sous anesthésie générale, et seront suivies de soins post-opératoires avec médication. Une surveillance quotidienne des animaux sera mise en œuvre afin de veiller à leur bien-être.

4592. Dans le cadre de la production de spécialités antivenimeuses, l'obtention d'anticorps spécifiques est indispensable. Afin de produire ces anticorps, des chevaux sont immunisés de manière répétée afin d'obtenir une quantité élevée d'anticorps dans leur sang. L'immunisation est réalisée par des injections d'antigènes constitués de venins et d'adjuvants.

A l'issue de la phase d'immunisation, des prélèvements sanguins sont réalisés sur les chevaux.

Les animaux peuvent présenter des inflammations locales liées aux injections répétées. Dans de rares cas, des effets secondaires plus importants peuvent être observés. Des mesures vétérinaires sont alors immédiatement mises en place (traitements, arrêt temporaire ou définitif du protocole).

32 chevaux sont concernés pour la durée du projet (2 ans). A la fin du projet les chevaux intègrent, pour leur grande majorité, le circuit d'adoption mis en place par la société et sont replacés en tant que chevaux de loisir.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

L'état de la science ne permet pas de fabriquer d'anticorps polyclonaux autrement qu'en ayant recours à l'animal.

Dans le cas de certaines maladies, des anticorps monoclonaux peuvent être synthétisés (production industrielle sans animaux) mais les résultats de protection obtenus à ce jour avec de tels anticorps ne sont pas satisfaisants. Il n'existe pas d'anticorps monoclonaux antivenimeux

Réduction :

Le nombre d'animaux est proportionnel à la demande de spécialités antivenimeuses mises à la disposition des patients.

Le nombre d'animaux utilisé est limité au maximum. Pour ce faire, les globules rouges leur sont restitués en partie, ce qui permet de répéter les prélèvements et d'obtenir des quantités importantes d'anticorps avec le moins d'animaux possible, sans nuire à leur état général.

Raffinement :

Les chevaux sont hébergés en groupes stables de 15 à 30 individus dans des parcs disposant d'un abri paillé, d'un paddock et d'une pâture. Ils sont observés quotidiennement. Les prélèvements sont réalisés sur des animaux en parfaite santé.

Des examens sanguins sont très régulièrement effectués afin de détecter précocement toute éventuelle anémie. En cas de problème de santé, un vétérinaire effectue le suivi clinique et prescrit un traitement. Il peut décider à tout moment de la réforme d'un cheval s'il la juge nécessaire. Dans ce cas, le cheval reçoit les soins prescrits, avant d'intégrer le circuit d'adoption mis en place par la société.

4593. La compréhension de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (MA) est cruciale dans le développement des nouveaux traitements. Il existe une relation étroite entre la mise en place du déclin cognitif et l'apparition des troubles d'un syndrome métabolique tels que l'hypercholestérolémie, l'insulinorésistance ou encore le surpoids. Cependant aucune donnée n'est disponible sur la cinétique du déclin cognitif et de la formation de des dépôts amyloïdes en fonction des perturbations métaboliques.

Objectif

Cette étude se propose d'identifier la cinétique du déclin cognitif et des dépôts amyloïdes en fonction de la mise en place d'un syndrome métabolique chez la souris sauvage et génétiquement modifiée (souris APP J20).

Méthodes

110 animaux seront utilisés au total:

- nous utiliserons 2 groupes de 15 souris (soumises soit à une diète normale soit à un régime enrichi) pour caractériser et valider le modèle de syndrome métabolique (SM). Les souris seront âgées de 8 semaines au début de l'étude.

- nous constituerons 4 groupes de 20 souris dans chaque groupe, sauvages régime normal, sauvages avec régime enrichi, APP J20 régime normal, APP J20 avec régime enrichi.

Les animaux seront surveillés quotidiennement. Des points limites ont été définis. Toute manifestation de souffrance, de modification de comportement amènera à une prise en charge appropriée. Si un point limite est atteint, l'animal sera sacrifié à distance de ses congénères. Les souris seront âgées de 8 semaines au début de l'étude, et seront analysées tous les mois pendant 12 mois. Nous étudierons la mise en place du syndrome métabolique en notant la prise de poids et à l'aide de dosages plasmatiques. L'apparition du déclin cognitif sera évaluée par des études comportementales. Des séquences IRM seront réalisées pour évaluer l'anatomie cérébrale. Après sacrifice, des colorations histo-pathologiques post-mortem et l'analyse du taux d'a bêta dans le LCR des souris seront réalisés.

Résultats attendus et perspectives

La cinétique des dépôts amyloïdes et du déclin cognitif devrait être modulée par la nature et l'ampleur des perturbations métaboliques, ce qui viendra conforter l'hypothèse de l'implication des perturbations métaboliques dans la mise en place de la MA. Ce modèle expérimental permettra à terme la modulation pharmacologique de ces lésions avec des conséquences cliniques thérapeutiques pratiques à long terme.

4594. La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après l'étude multicentrique STAR*D, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements. Certains de ces mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant l'utilisation de techniques d'immunohistochimie par exemple. Ces méthodologies ne peuvent être réalisées qu'au travers d'une approche préclinique.

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

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu.

Remplacement : aucune méthode alternative ni substitutive n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée.

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

Des travaux récents ont indiqué un effet antidépresseur du protoxyde d'azote et de la kétamine dans le modèle du stress chronique. Nous souhaitons confirmer ces résultats en utilisant un test comportemental plus classique et observer comment l'effet du protoxyde d'azote varie après son administration.

Pour cette expérience, 180 souris sont requises réparties en 4 expériences contenant chacune 3 lots de 15 souris.

4595. La tuberculose est une maladie causée par une bactérie *Mycobacterium tuberculosis*. Il s'agit d'une des plus meurtrières au monde car elle se situe en seconde position juste après le VIH/sida. La tuberculose se propage d'une personne à l'autre par voie aérienne (une personne touchée peut infecter jusqu'à 10-15 personnes en l'espace d'une année). La tuberculose avait pratiquement disparu grâce aux cures d'antibiotiques et au vaccin préventif, mais avec la progression du VIH/sida, la tuberculose a pu de nouveau se propager auprès de ceux dont le système immunitaire avait considérablement baissé. Le traitement anti-tuberculeux actuel dure au minimum 6 mois et consiste en une polychimiothérapie à base de quatre antibiotiques : isoniazide, rifampicine, pyrazinamide et éthambutol pendant 2 mois ; suivi par une bithérapie à base d'isoniazide et de rifampicine pendant 2 mois. Malheureusement, un patient peut être touché par une souche résistante à l'un ou plusieurs de ces antibiotiques et le traitement peut alors être allongé à 2-3 ans.

Il est donc nécessaire de trouver de nouveaux anti-tuberculeux afin de faire face à cette progression de résistance. Ce projet s'inscrit dans une démarche de demande de brevet européen pour de nouveaux antituberculeux. Notre équipe, a en effet synthétisé de nouvelles molécules dont les résultats *in vitro* sont prometteurs et qui ont passé l'évaluation toxicologique. La prochaine étape est donc d'évaluer leur activité *in vivo* pour confirmer leur efficacité.

L'évaluation se fera dans un modèle murin (souris femelles balb/c) qui est bien maîtrisé au laboratoire. Au vu des paramètres à comparer, nous prévoyons d'inclure 40 souris pour chaque posologie de chaque molécule, 20 souris pour les témoins non traités (sacrifice le lendemain de l'inoculation et étude de l'augmentation de la charge bacillaire dans les poumons) et 10 souris pour le groupe isoniazide (antibiotique témoin), ce qui porte le total à 150 animaux pour le premier test. En fonction des résultats de cette première expérience, des expériences complémentaires devront être réalisées pour tester des posologies différentes et effectuer des tests sur des souches présentant différents niveaux de résistance. En prenant en compte l'ensemble des expériences possibles nous estimons le nombre maximum d'animaux à infecter à 750.

Au maximum, 750 souris balb/c/j seront utilisées pour le projet. Avant l'établissement de nos procédures, nous avons pris en compte la règle de 3R :

- Remplacement : le modèle murin est le seul permettant une évaluation de l'activité des antibiotiques avant un essai chez l'homme dans le cas de la tuberculose, il est donc impossible de remplacer l'expérience sur l'animal par une expérience *in vitro* ;
- Réduction : le nombre d'animaux proposé a été réduit au minimum indispensable nous permettant de répondre à la question posée après évaluation statistique ;
- Raffinement : l'enrichissement utilisé et la surveillance journalière des animaux, permettent de limiter le stress des animaux.

4596. L'apparition et la progression de tumeurs dépend de nombreux paramètres complexes. Parmi ceux-ci, la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ou ROS pour Reactive Oxygen Species) joue un rôle important dans de nombreux cancers, ce qui justifie l'intérêt de leur détection pour le diagnostic. Leur rôle est cependant imparfaitement compris : ils sont à la fois un facteur carcinogène et des molécules régulatrices de l'activité de certains suppresseurs de tumeurs comme p53. De nombreuses études ont montré une corrélation entre l'inflammation chronique, et plus particulièrement les ROS, et le développement de tumeurs malignes.

La concentration locale de ROS est par conséquent un paramètre essentiel dans le contrôle de la relation entre cancer et inflammation.

L'inflammation est une réponse protectrice de l'organisme en réaction à différents phénomènes endogènes ou exogènes.

Les leucocytes et les macrophages impliqués dans la réponse inflammatoire produisent des niveaux élevés de dérivés réactifs d'oxygène et d'espèces azotées qui jouent de multiples rôles importants : activité antimicrobienne, contrôle de la présentation d'antigènes, modulation de la réponse immunitaire, participation à la signalisation cellulaire et à la chimiotaxie et induction des mutations d'ADN. Ainsi, l'homéostasie des concentrations de ROS est essentielle pour le bon fonctionnement d'un tissu car une inhibition de la production de ROS conduit à l'infection alors qu'une trop forte concentration peut causer la mort cellulaire.

Le rôle des ROS étant multiple et complexe, il est indispensable de développer des outils de détection et de quantification de ROS *in vivo* afin de comprendre leur importance (i) lors des différentes étapes de l'inflammation (initiation, entretien et résolution) et (ii) dans des tumeurs. Dans ce contexte, quelques capteurs de ROS ou de H₂O₂ ont été démontrés *in vivo* mais ne présentent pas les caractéristiques requises pour faire une détection quantitative.

L'objectif est donc d'évaluer la sensibilité et la spécificité de nouvelles nanoparticules pour la détection et le suivi de processus inflammatoires pour lesquels peu de marqueurs spécifiques sont actuellement disponibles. De par leurs caractéristiques optiques, ces nanoparticules sont des candidats prometteurs pour la caractérisation de maladies telles que le cancer. Or, le développement tumoral résulte d'une cascade d'événements moléculaires et d'interactions cellulaires qu'il n'est pas possible de reproduire simultanément sur cultures cellulaires ou organoïdes. Il n'est pas possible également d'élaborer des fantômes de réseaux

vasculaires identiques (en termes de taille et de tortuosité) à celui d'une tumeur in vivo, réseaux principaux vecteurs du recrutement immunitaire notamment. Il est donc primordial que le protocole soit conduit sur un modèle présentant les mêmes caractéristiques biologiques que les tumeurs in vivo. Ainsi, le recours à l'animal est indispensable.

Dans ce projet, nous proposons dans un premier temps de détecter les ROS dans un modèle d'inflammation (application topique d'un agent irritant sur l'oreille de l'animal sous anesthésie profonde) et ensuite dans des tumeurs implantées en chambre dorsale. Les animaux seront anesthésiés pour chaque intervention (localement, puis généralement) et recevront des anti-inflammatoires après chaque chirurgie. Ils bénéficieront d'un environnement enrichi en tout temps et d'une alimentation adaptée (DietGel haute énergie). Les points limites seront strictement appliqués. Ce projet nécessitera un nombre estimé maximal de 183 souris.

4597. Les glioblastomes sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'adulte. Il n'existe pas de traitement permettant de guérir ces tumeurs, et malgré l'efficacité partielle de la chirurgie, de la chimiothérapie et de la radiothérapie, l'affection est souvent fatale en quelques mois. L'objectif est de trouver une molécule efficace et augmenter la survie des patients.

La première approche réalisée par notre partenaire pharmaceutique est d'identifier les bonnes molécules par des méthodes ne nécessitant pas l'utilisation d'animaux (in vitro). Une fois que les molécules (candidat médicament) donnent des résultats intéressants in vitro, nous allons tester leurs efficacités sur l'animal. Des études statistiques nous permettent de réduire et raffiner les études sur l'animal. Ces mesures nous permettent de choisir le bon nombre d'animaux par groupe et d'obtenir des résultats significatifs.

Dans ce projet nous demandons 2450 souris sur une durée de 5 ans. Ce chiffre est important mais nous avons de nombreux candidats médicaments qui ont montré une efficacité satisfaisante in vitro. Les études seront réparties dans le temps à raison de 40 à 42 souris par mois pendant 5 ans.

4598. La radiothérapie est un outil puissant qui fait partie de l'arsenal de traitements anticancéreux. 50% des patients traités pour un cancer reçoivent une radiothérapie au cours de leur traitement. La radiobiologie cherche à potentialiser les effets des rayonnements ionisants (RI), utilisés en radiothérapie sur les tissus tumoraux, et de minimiser au maximum l'impact de ces derniers sur les tissus sains. La capacité de la radiothérapie à tuer les cellules cancéreuses réside dans sa capacité à induire des dommages sur la molécule d'ADN. Cependant, les cellules possèdent plusieurs mécanismes qui leur permettent de faire face à ses dommages et de les réparer. Le but de notre projet est de combiner une nouvelle molécule qui impacte indirectement plusieurs voies majeures de réparation avec la radiothérapie afin d'augmenter l'efficacité de cette dernière.

Nous souhaitons évaluer ce nouveau type de traitement à l'aide de modèles de cancer du poumon, étant donné qu'il y a eu très peu d'avancées ces dernières années concernant le traitement de ce type de cancer alors que son incidence ne diminue pas.

Le recours à des modèles animaux est indispensable pour étudier les effets de cette nouvelle combinaison thérapeutique dans un contexte qui inclut le micro environnement tumoral et qui permet donc l'interaction des cellules tumorales avec leur environnement naturel proche et lointain (immunité). Ces interactions jouant un grand rôle dans les effets de la radiothérapie, il apparaît donc indispensable d'avoir une évaluation sur un modèle animal pour déterminer exactement les effets de cette molécule avant d'envisager un passage en thérapie humaine. Aucun modèle in vitro ne permet actuellement d'obtenir la complexité présente dans un animal vivant (immunité, vascularisation, organo-dépendance, ...).

Pour mener à bien ce projet et avoir une idée précise du potentiel en thérapie humaine de cette nouvelle combinaison, 640 souris seront nécessaires. Cette estimation se base sur des analyses statistiques qui permettent de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans cette étude. Les animaux seront observés quotidiennement pour détecter tout signe éventuel de souffrance ou de toxicité des traitements. Les souris seront hébergées en cages avec 5 souris par cage dans le respect d'un cycle jour-nuit. Un enrichissement (« cocoons ») sera introduit dans les cages du début à la fin de l'expérimentation, les animaux recevront de l'aliment adapté haute énergie en cas de mauvaise nutrition.

4599. L'infection par *Toxoplasma gondii* au cours de la grossesse entraîne une toxoplasmose congénitale dans 30% des cas. En France, depuis 2007 cette infection congénitale est surveillée sur le plan épidémiologique par l'InVS (Institut National de veille Sanitaire), activité réalisée en coordination avec Centre National de Référence sur la Toxoplasmose (CNR). En 2014, 179 toxoplasmoses congénitales ont été diagnostiquées : 8 grossesses ont été interrompues en raison d'atteintes graves, 16 enfants présentent une atteinte clinique sévère ou modérée et 143 présentent une toxoplasmose congénitale infra-cliniques (90%).

Le diagnostic de la toxoplasmose congénitale est réalisé au cours de la grossesse par la détection du parasite dans le liquide amniotique (diagnostic anténatal) ou à la naissance du bébé dans le placenta (diagnostic postnatal) et à partir de prélèvements sanguins. Sur le liquide amniotique et le placenta, les techniques biologiques utilisées sont la PCR (détection de l'ADN du parasite) et l'inoculation à la souris. La PCR est une technique sensible et rapide mais ne permet pas l'isolement du parasite en cause, la technique diagnostique par inoculation à la souris est moins sensible, plus longue mais plus spécifique (pas de faux positif) et seule l'inoculation de ces prélèvements humains aux souris permet actuellement l'isolement de la souche de toxoplasme responsable de l'atteinte congénitale. Les souches de toxoplasme isolées des prélèvements sont adressées au Centre de Ressources Biologiques du CNR de la Toxoplasmose pour typage moléculaire.

Dans le cadre de cette activité diagnostique, les biologistes médicaux ont un agrément délivré par l'Agence de la Biomédecine pour la pratique des analyses permettant le diagnostic anténatal de la toxoplasmose (obligation légale). L'inoculation aux souris est un test diagnostique qui figure à la nomenclature des actes de Biologie Médicale pour le diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale humaine.

Nombre de souris : min 105-max 150 souris/an soit 750 au total.

L'inoculation aux souris à but diagnostique et épidémiologique est réalisée en respectant la règle des « 3R » :

"Remplacer":

- Pour le diagnostic médical, la culture cellulaire n'était pas suffisamment performante et a été abandonnée
- L'inoculation à la souris est une technique complémentaire à la PCR

"Réduire":

- Comme recommandé par le Centre National de Référence de la Toxoplasmose, 3 souris sont inoculées avec chaque prélèvement humain
- Lorsque le diagnostic anténatal est positif (positivité du liquide amniotique), le placenta de cette patiente n'est pas inoculé aux souris
- seuls les prélèvements réalisés dans le cadre de la toxoplasmose congénitale sont inoculés aux souris (exclusion de la toxoplasmose des patients immunodéprimés)

"Raffiner":

- En Europe, les souches de toxoplasme sont très majoritaires des souches dites non virulentes et kystogènes (type II), elles conduisent à une infection chronique asymptomatique chez l'homme et l'animal. Toutefois, si une souche plus virulente (souches d'Amérique du sud) devait être présente dans un prélèvement de patient inoculé à la souris, le point limite (symptômes précoces d'infection) a été clairement défini.

- Procédures sur l'animal limitées au minimum : inoculation intra-péritoneale du prélèvement humain et amputation unique de 2/3 mm de la queue de la souris après anesthésie à l'isoflurane pour réalisation d'une sérologie toxoplasmose.

- Hébergement des animaux dans une plate-forme de Haute Technologie Animale avec enrichissement du milieu, nombre optimal de souris par cage et prise en considération de la souffrance animale.

4600. Le cancer du sein est la première cause de décès liés à une pathologie tumorale chez la femme. Les métastases, qui se situent majoritairement dans les os, les poumons et le foie, sont la cause majeure des décès. Les mécanismes de la progression tumorale et de la dissémination métastatique dans le cancer du sein sont encore mal connus. Ils nécessitent plus de recherches afin de mieux appréhender les possibilités de traitement des malades.

Les métastases proviennent de cellules de la tumeur primaire, disséminées soit par le sang soit par la lymphe. Cette dissémination nécessite la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) et lymphatiques (lymphangiogenèse) à partir de vaisseaux existants. Il s'agit de deux processus primordiaux dans le développement physiologique normal, mais également dans des pathologies vasculaires ou au cours du développement tumoral et dans la dissémination des métastases.

Nous venons de mettre en évidence un rôle crucial de deux facteurs de croissance circulants, BMP9 et BMP10, dans la maturation du réseau vasculaire sanguin et lymphatique. Qu'en est-il de leur implication dans la progression tumorale ?

Notre étude vise à approfondir la compréhension du rôle de BMP9 et BMP10 dans la régulation de la croissance tumorale et la dissémination de métastases. Elle utilisera des modèles rongeurs de tumeur mammaire, soit normaux soit privés de BMP10, soit privés de BMP9 et BMP10. A l'aide de ce modèle, nous analyserons la croissance tumorale, la dissémination métastatique pulmonaire, le développement du réseau vasculaire sanguin et lymphatique de la tumeur et des ganglions lymphatiques « sentinelles » (les plus proches de la tumeur).

Aucun modèle cellulaire ou informatique ne peut fournir ces informations, importantes pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques anti-tumorales. Le recours à des investigations in vivo est donc nécessaire.

Les modèles rongeurs de cette étude sont nés et ont été élevés dans un établissement agréé. Leur nombre (129) a été déterminé sur la base des données de la littérature et pour répondre aux exigences d'un test statistique (test de Mann Whitney) qui sera appliqué pour chaque expérience. Ainsi, nous veillons à n'utiliser que le minimum nécessaire d'animaux pour assurer la validité des résultats. Les animaux sont hébergés en groupe et en milieu enrichi de modules permettant d'améliorer leurs conditions de vie. Le suivi des tumeurs sera réalisé par mesure à l'aide d'un pied à coulisse. La charge tumorale ne devra pas excéder 5% du poids normal de l'animal soit 1g ou environ 1cm³ pour une souris de 20g. 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 (injection d'un antalgique ou euthanasie de l'animal si nécessaire) dès le moindre signe de souffrance.