



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

Résumés non techniques des projets autorisés (47)

4701. Le diabète de type 1 touche à l'échelle mondiale un nombre croissant de sujets et constitue une véritable épidémie. Si de nouvelles approches thérapeutiques tendent à rendre les traitements plus physiologiques (transplantation de pancréas, d'îlots pancréatiques), celui prescrit en premier intention reste l'injection pluriquotidienne d'insuline d'origine exogène. Celle-ci est administrée la plupart du temps à l'aide de stylos injecteur ou de pompes externes permettant de délivrer des doses adaptées à chaque patient. L'un des points communs à ces différents modes d'administration est l'utilisation de la voie sous-cutanée, la plus facile d'accès pour le patient.

Cependant, le lit vasculaire présent au niveau sous-cutané n'est pas directement connecté au système porte du foie. Il en résulte une absence de premier passage hépatique de l'insuline injectée, comme c'est le cas lors de la sécrétion de l'hormone par le pancréas. L'efficacité biologique en est affectée et de nombreux cas d'insulino-résistance sont relevés, compliquant la prise en charge du patient. Des modes d'administration à l'aide de cathéters en intra-péritonéal sont déjà sur le marché mais présentent des risques de complication non négligeables : infections, adhérences provoquant l'obstruction du cathéter. C'est pourquoi, un autre site est évoqué : l'extra-péritoine, correspondant à l'espace entre le péritoine et les muscles abdominaux. Il présenterait l'avantage de permettre un premier passage hépatique de l'insuline, sans être au contact direct des viscères, permettant ainsi de prévenir les problèmes d'adhésion tissulaire. Il s'agirait ainsi d'un site prometteur pour la mise en place de cathéter ou d'autres dispositifs de délivrance d'insuline.

Ce projet a pour but de démontrer l'intérêt d'une délivrance extra-péritonéale d'insuline chez modèle du rat diabétique. Cette étude nécessitera 308 animaux au total. Le respect du principe de raffinement intervient en premier lieu au niveau des conditions d'hébergement : les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur, ainsi que de cages enrichies à l'aide de cylindres en PVC rouges. Nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de pré-anesthésie, d'anesthésie et de prise en charge post-opératoire. Le principe de réduction est ici appliqué en utilisant un nombre minimum d'animaux qui reste suffisant pour l'obtention de résultats statistiques. Ce nombre tient compte des pertes éventuelles liées aux implantations de cathéters ou d'implant délivrant de l'insuline. Enfin, étant donné que nous souhaitons évaluer l'activité biologique de l'insuline au niveau extrapéritonéale, nous ne pouvons-nous soustraire de l'étude in vivo.

4702. Ce projet concerne l'évaluation de la faisabilité d'une nouvelle voie d'administration pour un produit immunologique destiné à protéger une espèce de carnivore domestique contre des maladies mortelles ou non pour cette espèce.

La réalisation de ce projet comprend une procédure expérimentale permettant d'évaluer l'innocuité et l'efficacité du produit immunologique administré par cette nouvelle voie. Différentes formulations de ce produit immunologique pourront être testées.

Ce projet requiert au maximum l'utilisation de 42 carnivores domestiques.

Ce projet est conçu en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

- un caractère de stricte nécessité : cette procédure ne peut pas, pour le moment, être remplacée par des méthodes expérimentales alternatives,
- un nombre d'animaux envisagé par groupe déterminé dans le but d'obtenir des données valides,
- un hébergement des animaux en groupe de manière à ne pas induire un stress d'isolement,
- un recours à l'anesthésie générale lors de certaines phases, si nécessaire, pour garantir le bien-être animal,
- des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long de la procédure,
- des points limites adaptés et précisément définis seront appliqués afin d'éviter toute souffrance des animaux.

4703. De plus en plus de compléments alimentaires contenant des bactéries bénéfiques vivantes dites « probiotiques » sont utilisés en alimentation animale. Les principaux objectifs d'un apport exogène de ces bactéries dans le tractus gastro-intestinal des animaux sont :

- (i) de limiter la croissance et/ou l'installation de bactéries pathogènes au niveau du tube digestif des animaux ;
- (ii) d'améliorer les performances des animaux (meilleur rendement de production de viande, amélioration de la qualité du lait produit, prise de poids, ...).

Dans l'objectif de proposer une nouvelle souche bactérienne utilisable comme complément alimentaire pour les animaux, des souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir de fèces d'origine animale. Des tests in vitro, initiés en 2014 ont permis de sélectionner 7 souches de bactéries lactiques sur la base de leurs capacités de résistance aux stress digestifs (acidité, bile, ...) et

leurs propriétés potentiellement probiotiques (inhibition de bactéries pathogènes). La résistance de ces souches aux antibiotiques a également été évaluée selon les recommandations de l'EFSA (European Food Safety Authority).

Les souches sélectionnées appartiennent au genre *Lactobacillus* dont la majorité des espèces disposent du statut GRAS (Generally Recognized as Safe – US FDA) et/ou QPS (Qualified Presumption of Safety – EFSA). Cependant, il est nécessaire de confirmer que ces souches bactériennes, apportées de manière exogène et volontaire dans l'alimentation des animaux, ne présentent aucun danger pour les animaux et aucun effet néfaste sur la vie de l'animal.

L'objectif de ce projet est donc de confirmer l'innocuité des souches sélectionnées et d'évaluer l'impact d'une administration journalière de ces souches sur la santé et l'activité de souris. Ces essais devront également permettre de démontrer que les bactéries additionnées à une alimentation animale ne sont pas capables de provoquer une translocation bactérienne du tube digestif vers les différents organes (rate, rein, ganglions lymphatiques, foie, sang), induisant un effet néfaste sur sa santé. De plus, la persistance des bactéries lactiques au niveau du tractus gastro-intestinal sera également évaluée sur un nombre limité d'animaux.

L'évaluation de l'innocuité des souches du genre *Lactobacillus* sera réalisée sur 80 souris mâles de type Balb/C comme précédemment décrit dans de nombreuses études ayant le même objectif. Compte tenu des études similaires réalisées précédemment par d'autres équipes de recherche, dix souris par souche bactérienne seront utilisées. Les bactéries lactiques seront incorporées dans l'alimentation des animaux *ad libitum* pendant 15 jours. Les principaux éléments permettant d'évaluer l'état de santé des animaux seront observés chaque jour (activité générale des animaux, comportement, pelage). D'autres éléments comme le poids, la prise alimentaire, la quantité de fèces des animaux seront évalués une fois par semaine. A la fin de l'étude, la moitié des animaux seront euthanasiés. Les organes (foie, rein, rate, ganglions lymphatiques mésentériques) et le sang des animaux seront prélevés pour dénombrement bactérien afin d'évaluer la dissémination. L'autre moitié des animaux sera nourrie 15 jours de plus avec de la nourriture stérile. Les fèces de ces animaux seront collectées pour évaluer la persistance de la souche administrée dans le tractus gastro-intestinal.

4704. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la troisième cause de mortalité par cancer dans le monde. Le traitement du CHC est indispensable sous peine d'une évolution fatale. Depuis 2007, de nouvelles molécules ont fait leur apparition dans l'arsenal thérapeutique contre le CHC, et seul le Sorafenib dispose actuellement d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement du CHC. Bien qu'efficace dans le traitement du CHC avancé, le bénéfice en termes de survie reste modeste. De plus, 100% des patients développent plus ou moins tardivement une résistance à ce médicament. L'évaluation de nouvelles molécules reste donc un enjeu important.

Plusieurs pistes sont actuellement explorées afin d'améliorer les options thérapeutiques proposées aux patients, et notamment les effets anti-tumoraux des antidiabétiques. La metformine est actuellement le traitement le plus utilisé en première intention du diabète de type II. Des études récentes ont montré une diminution de l'incidence du CHC chez les patients diabétiques traités à la metformine comparée à des patients traités avec d'autres antidiabétiques, ainsi des propriétés anti-tumorales innées de la metformine. Dans ce contexte, il apparaît très intéressant de tester une nouvelle molécule anti-diabète, l'Y2266, qui pourrait démontrer des effets anti-tumoraux comparables voir plus important que la metformine.

In vitro, la molécule d'intérêt à montrer des effets anti-prolifératifs prometteurs sur des lignées de cellules de CHC humaines. Ce projet propose d'utiliser deux lignées cellulaires issues de CHC humains. L'objectif est de créer deux modèles de tumeurs humaines (une peu proliférante, une agressive) et de comparer les effets de l'Y2266 avec le sorafenib (médicament de référence) et la metformine (molécule de même type à laquelle nous souhaitons nous comparer). Le prélèvement des tumeurs pourra par la suite nous permettre de mieux comprendre la manière dont agit la molécule sur les différents types de cellules au sein de la tumeur, par des analyses immunohistochimiques.

L'utilisation d'animaux est nécessaire pour mettre en évidence les effets anti-tumoraux d'une molécule destinée à être utilisée dans le traitement contre le cancer chez l'Homme. Pour ce projet, nous utiliserons 200 souris nues (immunodéprimées). Ce nombre a été déterminé de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux tout en conservant la validité statistique de l'étude, tant sur la croissance tumorale que les analyses immunohistochimiques qui suivront.

Les médicaments seront administrés par la même voie d'administration que chez l'homme, soit par voie orale. Le sorafenib sera administré une fois par jour par gavage. La metformine et l'Y2266 seront dissouts dans l'eau de boisson à la concentration voulue. Les biberons seront changés deux fois par semaine (le lundi et jeudi), et les biberons seront pesés pour évaluer le volume bu.

Les points limites sont les suivants : gêne pour se déplacer, comportement et apparence physique anormaux, perte de poids >20%, nécrose tumorale, volume de la tumeur >2000mm³. Si un des points limites est atteint, les animaux seront mis à mort dans les 24h. Ces points seront surveillés trois fois par semaine pour permettre de limiter la douleur de l'animal à son minimum. Aucune procédure douloureuse n'est à envisager.

4705. Chez l'Homme, trois types principaux de cristaux sont responsables de maladies rhumatologiques : les cristaux d'urate de sodium sont responsables de la goutte, les cristaux de pyrophosphate de calcium (PPC) de la chondrocalcinose et les cristaux de calcium de phosphate du rhumatisme à hydroxyapatite. Les cristaux de pyrophosphate de calcium sont composés de 4 types différents. La prévalence de la chondrocalcinose est élevée (plus de 17% chez des patients âgés de plus 70 ans). La présence de ces cristaux est le plus souvent sans symptômes mais peut aussi provoquer des crises inflammatoires aiguës récidivantes. Cette inflammation dépend principalement d'une protéine appelée interleukine 1b (IL-1b). La résolution spontanée est une caractéristique de ces crises inflammatoires, cependant les mécanismes de cette auto-résolution ne sont pas connus. De même, pourquoi les cristaux restent asymptomatiques n'est pas connu. Nous avons observé que des cristaux de PPC recouverts de

protéines contenues dans le sérum de veau fœtal étaient moins inflammatoires que des cristaux nus. Chez l'Homme, les protéines présentes à la surface cristaux d'urate de sodium varient entre les phases inflammatoires et les phases non inflammatoires.

Les objectifs de ce travail sont d'étudier i) l'inflammation déclenchée par les différents types de cristaux de pyrophosphate ; ii) les mécanismes par lesquels la présence des protéines à la surface des cristaux régule la réaction inflammatoire et sa résolution; iii) les variations de la couverture protéique à la surface des cristaux au cours de la réaction inflammatoire et iv) les mécanismes d'adsorption de protéines à la surface de cristaux de PPC.

Pour répondre à ces questions, nous utiliserons des modèles *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, nous utiliserons une lignée de cellules monocytaires humaines (THP-1), des macrophages primaires de souris et des techniques physico-chimiques pour étudier les interactions entre les protéines et les cristaux. Les mécanismes de l'inflammation déclenchée par les cristaux de PPC nus ou recouverts de différentes protéines seront analysés avec la lignée cellulaire THP-1 et les résultats les plus pertinents vérifiés avec les cellules primaires puis ensuite *in vivo*.

In vivo, nous utiliserons le modèle murin de poche à air. La poche, créée en injectant de l'air stérile sous la peau des souris, mime une cavité articulaire. Ce modèle décrit depuis les années 1990 est reconnu au niveau international et permet de mimer la réaction inflammatoire microcristalline observée chez l'Homme. Dans ce modèle, l'inflammation débute 4h après les injections de cristaux, atteint son maximum entre 6 et 18h selon les cristaux utilisés, puis s'arrête entre 24-72h. La réaction inflammatoire se déroule sans signe local apparent (pas de rougeur ni de gonflement) et sans douleur apparente des souris (pas de modification du comportement). Elle est authentifiée en analysant les protéines et les cellules contenues dans la poche. La réaction inflammatoire induite par des cristaux nus ou recouverts de protéines spécifiques sera comparée en les injectant dans les poches à air créées chez des souris sauvages et des souris génétiquement modifiées (souris déficientes pour la protéine galectine 3). Cette protéine galectine 3 peut en effet modifier la production de l'IL-1b et le comportement des macrophages, cellules majeures de l'inflammation microcristallines. Nous étudierons la capacité des quatre différents cristaux de PPC, comparés aux cristaux d'urate de sodium, à adsorber les protéines *in vitro* et *in vivo*, et les modifications de la couverture protéique au cours de la réaction inflammatoire en utilisant les souris sauvages (cinétique sur 4 temps, 6 conditions). Cette cinétique permettra d'identifier le temps optimal pour tester les protéines cibles identifiées par des expériences *in vitro*. Les protéines cibles identifiées seront utilisées pour recouvrir les cristaux testés dans ce modèle au temps d'inflammation maximale (un seul temps, 6 conditions).

Pour chaque expérience, 10 animaux/condition sont nécessaires, les cristaux d'urate de sodium seront utilisés comme témoin positif et le sérum physiologique comme témoin négatif. Le témoin positif est la condition où l'inflammation se produit et le témoin négatif celle où l'inflammation ne se produit pas. Au total, ce projet utilisera 280 souris sauvages, 40 souris galectine 3 KO (souris qui ne produisent plus cette protéine galectine 3). Ce nombre de 10 animaux/condition correspond à la quantité minimale nécessaire pour obtenir une puissance statistique suffisante (tests non-paramétriques de Mann-Whitney et Kruskal Wallis). Le nombre de souris sera réduit au minimum grâce aux expériences *in vitro*. Seules les protéines identifiées en quantité importante sur les cristaux isolés des échantillons humains seront testés chez les souris. Les souris seront, à la réception dans l'animalerie, réparties de façon aléatoire par groupes de 10 dans un environnement enrichi. La poche à air ne sera créée qu'après une semaine d'adaptation dans l'animalerie. La poche est utilisée 6 jours après sa création. La création des poches et les injections des microcristaux se font sous anesthésie par inhalation d'isoflurane. Chaque injection dure au maximum 30 secondes, les souris sont endormies pendant au maximum deux minutes. Le comportement des souris sera observé après la création des poches. Dans la littérature, il n'est pas modifié par la présence d'une poche à air en sous-cutanée. Localement, l'état de la poche est surveillé de façon quotidienne. Le poids des animaux sera relevé avant et 6 jours après la création des poches, juste avant les injections des microcristaux.

Les résultats attendus permettront de mieux comprendre l'inflammation déclenchée par des cristaux de PPC et d'identifier des cibles thérapeutiques pour cette maladie qui n'a actuellement pas de traitement curateur.

4706. Les défauts osseux consécutifs aux pseudarthroses (non consolidation de fracture), fractures complexes, reprises de prothèses et tumeurs concernent de nombreuses interventions orthopédiques. Ces défauts de grande taille peuvent requérir la mise en place d'une greffe osseuse provenant du patient ou d'un donneur, qui présentent des problèmes de disponibilité et/ou de qualité de l'os prélevé. L'ingénierie tissulaire osseuse, qui consiste à combiner un biomatériau et des cellules capables de produire de la matrice osseuse, est une alternative prometteuse. Un procédé innovant de fabrication directe par fusion laser permet maintenant de fabriquer des implants à base d'hydroxyapatite, composé minéral équivalent à celui de la matrice osseuse, ayant une architecture «à façon». L'objectif de ce projet est d'utiliser ces implants de nouvelle génération pour :

(1) Mieux comprendre l'origine des cellules impliquées dans la réparation osseuse: grâce à différentes architectures d'implant la contribution des différents tissus environnants sera évaluée indépendamment;

(2) Optimiser la macroarchitecture de l'implant pour améliorer la régénération osseuse par ingénierie tissulaire: différentes architectures de pores seront testées pour leur capacité à supporter le potentiel réparateur de cellules souches adultes.

Pour cette étude un modèle de défaut osseux fémoral (ostectomie diaphysaire) chez le rat Lewis sera utilisé, une technique d'évaluation de la formation osseuse reconnue et validée dans la littérature. Cependant, les études publiées concernent un défaut de taille critique (ne réparant pas spontanément) alors que l'étape 1 requiert un défaut capable de réparer. Ce projet inclut donc une phase de pré-expérimentation pour déterminer la taille maximum non critique d'un défaut osseux dans le fémur de rat. 3 tailles seront testées (3 rats/taille), soit 9 rats.

Pour l'étude (1), des implants seront produits pour empêcher la diffusion cellulaire et moléculaire ou la diffusion cellulaire seule à partir des différents tissus impliqués dans la réparation osseuse et implantés dans un défaut non critique (déterminé par la pré-expérimentation) pour 8 semaines. 7 groupes seront testés pour la contribution cellulaire ou moléculaire de la moelle osseuse, du périoste, et du tissu osseux (8 rats/groupes), soit 56 rats.

Pour l'étude (2), nous allons évaluer l'impact de la macroarchitecture sur la formation osseuse. Pour cela les implants seront chargés en cellules souches mésenchymateuses de rat puis implantés dans un défaut de taille critique (5 mm) pendant 12 semaines. 4 types de macroarchitecture (porosité giroïde, ovale, carrée, fractale) seront testés (8 rats/groupes), soit 32 rats.

Total des animaux : 97

Il n'existe pas de modèle in vitro ou in silico permettant de reproduire la complexité des tissus impliqués dans la réparation osseuse.

Par ailleurs, des techniques d'imagerie non-invasives (microscanner et bioluminescence) seront utilisées pour suivre la formation osseuse et la survie cellulaire sur le même animal. Les animaux ne seront mis à mort qu'au temps terminal de l'étude.

La souffrance sera limitée par analgésie post-opératoire et contrôlée par une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude. Pour chaque analyse in vivo, les rats seront anesthésiés.

Au cas où des douleurs persistent malgré les traitements entrepris ou d'infection majeure, l'animal sera mis à mort.

4707. Les maladies du système nerveux (Parkinson, Alzheimer, Huntington...) sont une préoccupation croissante en santé publique. De nouveaux outils diagnostiques associés à de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires pour améliorer la prise en charge des patients. Les modèles animaux sont des outils précieux et pertinents dans le développement de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques.

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative héréditaire caractérisée par des troubles moteurs, psychiatriques et des déficits cognitifs. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement efficace permettant de ralentir la maladie. La maladie touche environ 1 personne sur 10000 en France ce qui représente environ 6000 malades.

Ce projet a pour objectif de réaliser un essai préclinique chez le rongeur et le primate non-humain afin de mettre en place un essai clinique de thérapie génique de phase I à l'hôpital. Il s'inscrit dans une démarche translationnelle.

Il aura pour but d'évaluer la sécurité et l'efficacité d'un lot de vecteur viral 'médicament' produit par le laboratoire et il inclura une recherche de dose chez le rongeur puis chez le primate non-humain et finalement une mesure d'efficacité dans un modèle primate de la MH.

Ces études précliniques sont requises pour élaborer un dossier réglementaire à fournir aux autorités compétentes avant le démarrage de l'essai clinique (chez l'Homme). Les études chez le rongeur permettent de déterminer l'efficacité biologique du vecteur viral et son éventuelle toxicité. L'administration du vecteur se faisant par voie intracérébrale, les études chez le primate sont requises afin de déterminer le protocole neurochirurgical le plus pertinent chez le patient. De plus, le modèle primate se justifie par la possibilité d'évaluer les fonctions motrices dans une espèce proche de l'homme.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages reconnus et sont nés et élevés en captivité. Leur nombre a été réduit au maximum (264 rongeurs et 13 primates non-humain) afin d'obtenir des données suffisantes pour évaluer l'effet du traitement à des doses différentes.

L'évaluation fonctionnelle sera menée en utilisant des techniques indolores et non-invasives telles que l'imagerie IRM ainsi que l'étude du comportement moteur. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Des échelles cliniques journalières et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des animaux.

4708.

Ce projet fait appel aux compétences complémentaires de deux équipes locales, dans le cadre d'une collaboration avec un laboratoire Australien et permettra d'apporter sur le plateau local l'imagerie TEP de l'apoptose. Une des 2 équipes possède une expertise en développement de modèles animaux, imagerie préclinique et développement de stratégies thérapeutiques dans les cancers ovariens chimiorésistants et l'autre équipe est spécialisée en développement de nouveaux radiotraceurs.

L'imagerie fonctionnelle par Tomographie par Emission de Positons (TEP) permet de visualiser les changements métaboliques tumoraux survenant précocement après le début d'un traitement antinéoplasique, avant toute modification morphologique détectable en imagerie conventionnelle, en particulier lors du traitement par thérapies ciblées.

Thématique

Le projet se décline en deux parties : i) caractérisation de plusieurs sondes caspases, traceurs innovants de l'apoptose grâce à un modèle animal éprouvé pour lequel le délai d'apparition et le niveau d'apoptose après administration de cisplatine sont connus, ii) utilisation du traceur le plus adapté à l'imagerie précoce de l'apoptose afin d'optimiser des protocoles combinatoires pro-apoptotiques dans un modèle animal de cancer ovarien chimiorésistant.

Les retombées attendues sont doubles

D'une part optimiser les protocoles précliniques (modes d'administration, effet synergique des associations) grâce à l'utilisation de l'imagerie fonctionnelle qui est non invasive et permet d'avoir accès de façon longitudinale répétitive, aux changements métaboliques liés aux traitements.

D'autre part déterminer les capacités de l'imagerie TEP à évaluer de façon précoce la réponse à des traitements antinéoplasiques, de façon à inclure ce type d'imagerie, lorsqu'elle est appropriée, dans les protocoles cliniques qui découleront à court et moyen terme.

Ethique animale

S'agissant de protocole d'imagerie physiologique, un remplacement par des techniques in vitro n'est pas envisageable. De plus, les protocoles incluant de l'imagerie TEP permettent justement d'optimiser les protocoles précliniques grâce à l'utilisation de l'imagerie fonctionnelle qui est non invasive et permet d'avoir accès de façon longitudinale répétitive, aux changements

métaboliques liés aux traitements. Le nombre d'animaux utilisés dans les études longitudinales sur plusieurs semaines est donc justement limité par rapport aux techniques ex-vivo, par exemple. L'implantation de cellules tumorales d'origine humaine n'est possible que chez des animaux immunodéprimés; les rats nude sont fréquemment utilisés dans ce type d'étude. Les protocoles de traitement seront menés avant que la taille totale des tumeurs ne puisse gêner le bien-être des animaux. Il s'agit de méthodes non invasives. Les 180 rats seront suivis tout au long des protocoles au niveau de leur poids, de leur comportement moteur ... Cependant, une souffrance visible liée au développement tumoral sera considérée comme point limite. De même, une détresse caractérisée par une perte de poids supérieure à 20% ou une prostration de l'animal sont également considérées comme tels. Ces points limites donneront lieu à l'euthanasie de ces animaux au système immunitaire déficient qui ne permet pas une survie en dehors d'une animalerie dédiée. Cette euthanasie sera réalisée sur des animaux préalablement anesthésiés.

4709. *Staphylococcus aureus* est une bactérie de la flore commensale pouvant être responsable d'infections nosocomiales et d'infections communautaires. Cette bactérie peut être responsable de septicémie (infection généralisée, propagée par voie sanguine). Une récente analyse au niveau mondial estime à 31.5 millions le nombre annuel de cas de sepsis et à 19.4 millions le nombre de cas de sepsis sévère avec potentiellement 5.3 millions de décès/an. L'émergence de la résistance à la méticilline chez les souches de *S. aureus* complique la prise en charge des patients et est un facteur de risque indépendant de mortalité dans les bactériémies.

Le traitement des infections dues à *Staphylococcus aureus* reste problématique et il n'existe pas de consensus à l'heure actuelle sur le choix de l'antibiothérapie la plus efficace. De plus, la production de toxines par certains *S. aureus* augmente la virulence de la bactérie. Il apparaît donc important de trouver de nouvelles approches thérapeutiques telles que l'utilisation des anticorps.

Les anticorps sont des protéines complexes utilisées par le système immunitaire pour détecter les agents pathogènes et se fixent de manière spécifique sur leurs antigènes. Ils sont sécrétés par des cellules dérivées des lymphocytes B. La reconnaissance entre antigène et anticorps est par exemple mise à profit dans la lutte contre les toxines bactériennes. Ces toxines agissent en se fixant sur des récepteurs présents à la surface des cellules de l'organisme, ce qui provoque des dérèglements importants de l'activité cellulaire. En se fixant sur ces toxines, les anticorps anti-toxiques les neutralisent et empêchent les liaisons avec les récepteurs cellulaires.

Le but de notre étude est d'évaluer l'activité in vivo de plusieurs associations d'anticorps ciblant différentes cibles toxiques dans le modèle de septicémie à *Staphylococcus aureus*.

Pour cela, 156 souris Swiss femelles vont être utilisées. Avant induction de la septicémie, 8 groupes recevront un mélange d'anticorps (un mélange différent par groupe), 1 groupe recevra un antibiotique de référence et un groupe recevra une injection d'anticorps non spécifique (animaux témoins). Soixante-douze heures après infection, la rate sera prélevée afin de déterminer la charge bactérienne.

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

- Remplacer : l'évaluation et la comparaison de l'activité d'un antibiotique sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées de façon in vitro (faible corrélation in vitro-in vivo).

- Réduire : le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable.

- Raffiner :

- Avant l'expérimentation :

- o Choix des souches et modèles : Les souches choisies correspondent aux souches retrouvées lors des infections de sepsis chez l'homme.

- o Conditions d'hébergement : Acclimatation des animaux durant une semaine avant l'expérimentation. Assurance d'une non surpopulation dans la salle d'hébergement. Les animaux sont conservés dans des cages répondant aux dernières normes. La litière est changée régulièrement avec accès libre à l'eau et à la nourriture (alimentation spécifique pour rongeur).

- o Détermination des points limites : Lors de l'évaluation des signes généraux, si apparition de 3 signes cliniques notables (poils hérissés, dos bossu, perte de poids, isolement de certains individus par rapport au groupe, réaction de défense intensifiée, hypomobilité, respiration ralentie, paupières closes, diminution ou absence de prise de nourriture), la souris sera euthanasiée. Si apparition d'un signe clinique sévère (tremblements généralisés, convulsion, suffocation, perte de poids > 10%, absence de prise de nourriture sur plus de 2 jours, souris froide au toucher), la souris sera également euthanasiée.

- Pendant l'expérimentation :

- o Soins pré et postopératoire : Les souris reçoivent en injection sous cutanée de 50µL de buprénorphine (0,05mg/kg) 30 minutes avant l'infection puis 2 fois par jour pendant toute la durée du protocole.

- o Evaluation des signes généraux : Application des points limites (cf raffinement avant expérimentation)

- o Euthanasie : dislocation cervicale après préanesthésiés par inhalation d'isoflurane (3% débit de gaz frais 0.8L/min).

4710. Pendant des millions d'années, la gravité a façonné tous les organismes aussi bien animaux que végétaux. Elle a été le facteur majeur dans l'évolution. Il n'y a qu'à considérer les différents tissus, leur structure et leurs fonctions pour s'en rendre compte : tissu osseux (dont nous n'aurions pas besoin si la gravité n'existait pas), musculaire, système nerveux ou cardiovasculaire. Le rôle de la gravité sur ce dernier système est évident surtout chez l'Homme. L'absence de gravité lors des vols spatiaux perturbe ces systèmes. Par exemple, lors des retours des vols spatiaux une hypotension orthostatique est notée avec diminution de l'épaisseur des parois cardiaques. Au niveau musculaire, une atrophie majeure est observée dès les premiers jours d'un vol spatial. L'exercice musculaire est la technique la plus utilisée pour contrecarrer ces effets. Cela posera des problèmes pour les voyages spatiaux longs (1 à 3 ans) envisagés actuellement sur Mars.

Après 50 ans d'expérimentations chez l'Homme, on ne connaît toujours pas complètement le mécanisme de production de ces troubles car des contremesures sont utilisées (exercice musculaire en particulier) systématiquement en vol. On a donc été obligé de se tourner vers l'expérimentation animale (rats ou souris). C'est ainsi qu'a été lancé en 2013 un satellite russe automatique (BION) avec différents animaux (dont des souris) pour étudier ces phénomènes. Les animaux qui ont ainsi vécu un mois en impesanteur étaient équipés pour une étude télémétrique de la pression artérielle. Mais les résultats obtenus sont insuffisants et le nombre d'animaux doit être augmenté. De plus, lors du lancement et du retour de vols spatiaux, les organismes sont soumis à de très fortes accélérations (3 à 4 g) pendant plusieurs minutes, induisant d'importantes modifications cardiovasculaires et musculaires. Depuis, de nouveaux capteurs ont été mis au point et doivent être testés au préalable d'un autre vol pour s'assurer que ces capteurs supportent ces accélérations et enregistrent des données exploitables. Aussi l'objectif de cette étude consiste à étudier le comportement de ces capteurs implantés chez des souris au cours de ces accélérations à la phase initiale des vols spatiaux grâce à l'utilisation d'une centrifugeuse spécifiquement dédiée aux expériences animales. La méthode télémétrique permet d'enregistrer en continu plusieurs paramètres (pression artérielle, température, électromyogramme) chez un animal vigilant, non contraint et dans son environnement habituel. Après l'implantation des capteurs et le suivi post-opératoire, les animaux ne sont plus soumis à aucune manœuvre susceptible d'induire de la souffrance ou de la douleur. Cette approche expérimentale contribue à limiter le nombre d'animaux utilisés. Depuis plusieurs années ces expériences en centrifugeuse, ont montré que les souris supportent parfaitement ces conditions et en particulier, n'ont pas de perte pondérale.

Nos questions scientifiques sont centrées sur les effets des différents niveaux de contraintes environnementales gravitaires sur la physiologie du système cardio-vasculaire et musculaire et sur la qualité d'enregistrement des capteurs télémétriques. La validation des expérimentations animales avec système intégré (capteurs télémétriques) est donc primordiale. Des modifications engendrées au niveau de l'organisme entier, telles que les modifications de pression artérielle, de température et de l'électromyogramme seront donc enregistrées et validées.

De fait, nous nous sommes orientés vers un modèle animal pertinent pour cette étude et avons choisi la souris de par l'intérêt de ce modèle démontré dans les études antérieures.

Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales et les mesures sur l'homme sont incomplètes ou invalidées par les exercices musculaires pendant les vols spatiaux. Les capteurs ont été testés ex-vivo dans le cadre de tests techniques.

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum sans compromettre la significativité des résultats en prenant compte de la perte de certaines souris pendant la phase de validation technique d'implantation (risque inhérent lié au geste chirurgical) ou par la perte du signal télémétrique pendant la phase de récupération. Les animaux disposant des meilleurs signaux télémétriques seront intégrés à l'étude. Une attention particulière sera portée au bien-être des animaux et des mesures de raffinement seront mises en place pour limiter le stress et la douleur. Ainsi les gestes chirurgicaux seront effectués sous anesthésie générale, avec des points de suture internalisés suivis d'une réhydratation par solution glucosée. Les ongles des souris seront raccourcis pour limiter les grattages et les griffures entre animaux. Un traitement analgésique adapté sur plusieurs jours permettra de réduire au maximum la douleur post-opératoire. Les souris seront remises en groupe dès que possible avec une alimentation à disposition dans la cage et du coton pour favoriser la nidification. Une observation quotidienne des animaux permettra d'identifier tout signe de souffrance et la mise en place de points limites précis anticiperont toute douleur inutile à l'animal. Le nombre total de souris sera de 30 pour cette étude.

Ce projet s'inscrit dans un contexte international de recherche et l'apport de ces connaissances permettra d'améliorer la qualité des contremesures appliquées à l'Homme.

4711. PiT1/Slc20a1 et PiT2/Slc20a2 sont des transporteurs de phosphate (Pi) présents à la surface de la plupart des cellules de mammifères. Depuis ces 6 dernières années, nos travaux montrent que PiT2 est une protéine qui joue un rôle important pour la croissance et la minéralisation du squelette. Il semble que PiT2 n'agit pas directement dans les cellules qui constituent le squelette. En effet, nos résultats suggèrent que PiT2 pourrait jouer un rôle dans la communication entre au moins deux organes que sont le squelette et le(s) tissu(s) adipeux et que des défauts de communication entre ces organes pourraient influencer sur la physiologie du squelette. L'évaluation de cette hypothèse ne peut se faire qu'en utilisant l'organisme entier. Ce projet consiste à analyser en détail le phénotype métabolique de souris dépourvues du gène PiT2 (PiT2KO). Pour mieux comprendre les mécanismes d'action des protéines PiT dans ce système et en fonction des résultats que nous obtiendrons chez les souris PiT2KO, nous analyserons ensuite le phénotype métabolique d'autres modèles murins génétiquement modifiés sur les gènes PiT1 et PiT2. Ces modèles reposent sur l'inactivation des gènes PiT spécifiquement dans les tissus squelettiques ou dans les tissus adipeux. Ils seront établis par croisement de souris génétiquement modifiées selon une stratégie Cre-lox. Les souris PiT1 ou PiT2 "floxées" seront ainsi croisées avec des souris dont le gène Cre est sous contrôle d'un promoteur spécifique des ostéoblastes (promoteur Osterix) ou des adipocytes (promoteur Adiponectine). Des souris invalidées à la fois pour PiT1 et pour PiT2 dans ces tissus pourront également être établies. Afin de respecter au mieux la règle des 3R, les analyses phénotypiques seront tout d'abord réalisées chez les souris PiT2KO et les souris contrôles sur un nombre d'animaux par groupe correspondant au nombre minimal requis pour chaque type de test afin d'atteindre une significativité statistique (soit 10 animaux par groupe). De plus, plusieurs types d'analyses seront réalisés chez la même souris ce qui permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaire à cette étude. L'étude du phénotype des souris PiT2KO nécessitera 80 souris sur 3 ans. Les animaux seront hébergés dans des cages adaptées en fonction du nombre d'animaux (un carré de cellulose sera ajouté dans la cage des animaux isolés leur permettant d'avoir une plus grande occupation). L'ensemble de cette étude vise à comprendre l'implication des protéines PiT dans la physiopathologie du squelette et sa communication avec le tissu adipeux. Il n'existe pas aujourd'hui de méthode alternative à l'utilisation de l'animal pour ce projet.

4712. Des études ont montré que le système nerveux périphérique pouvait réguler le système immunitaire (SI). De quelle façon ? La libération des neurotransmetteurs (tels que l'acétylcholine, l'adrénaline ou la noradrénaline) lors de la stimulation de nerfs périphériques peut agir directement sur les cellules du système immunitaire. Il a ainsi été montré que les organes lymphoïdes secondaires reçoivent une innervation importante de nerfs périphériques. Par ailleurs, on peut détecter l'expression de récepteurs à des neurotransmetteurs par les cellules du système immunitaire. Dès lors, l'intervention sur l'activité des nerfs périphériques dans le but de modifier l'activité du système immunitaire est envisageable. Ainsi, chez l'homme la stimulation de nerfs périphériques est déjà utilisée pour le traitement de maladies comme l'épilepsie ou la dépression. De nos jours, plus de 50 000 patients dans le monde sont implantés avec des micro-stimulateurs. Les effets de ces électrostimulations du nerf vague sont actuellement recherchés dans des maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde. En effet, il a été montré que, dans des modèles d'inflammation chez la souris, l'électrostimulation du nerf vague induit une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires. Ces résultats suggèrent donc que la stimulation du système nerveux sympathique pourrait prévenir le choc septique chez l'animal.

Nous avons pu montrer que, dans certaines conditions, la stimulation de ces deux nerfs inhibe l'inflammation consécutive à l'injection d'une endotoxine bactérienne et que cette inhibition est dépendante de la noradrénaline et de l'acétylcholine. Nous cherchons dans ce projet à mieux comprendre les mécanismes liés cette résistance au choc septique médiée par l'électrostimulation.

Le projet consiste à implanter une électrode de stimulation au niveau des nerfs splénique et sinuso-carotidien et à réaliser une électrostimulation chez des animaux transgéniques. La comparaison de la réponse inflammatoire entre les animaux transgénique et les animaux sauvages permettra de mieux comprendre le mécanisme de cette inhibition. Pour cela nous utiliserons des souris modifiées génétiquement au phénotype non dommageable pour les gènes suivants :

1-RAG-1 (recombination-activating gene) responsable de la recombinaison des gènes codant les récepteurs des lymphocytes B et T (procédure n°1)

2-ABDR2 codant le récepteur adrénergique beta 2 (procédure n°2)

3-CD4creADRB2LoxP invalidant le récepteur adrénergique beta 2 dans les lymphocytes CD4 (procédure n°3)

4-LysMcreADRB2LoxP invalidant le récepteur adrénergique beta 2 dans les cellules myéloïdes (procédure n°4)

5-LysMcre α 7nAChRLoxP invalidant la sous unité alpha 7 du récepteur nicotinique dans les cellules myéloïdes (procédure n°5)

Le nombre total de souris utilisées pour ce projet est de 360. Des tests statistiques seront réalisés à la fin de chaque expérimentation pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs des raffinements sont proposés notamment pour limiter la souffrance animale en mettant en place des protocoles adaptés d'anesthésie et d'analgésie complétés par un suivi postopératoire comprenant la mise en place des points limites précoces et adaptés. L'utilisation de l'animal est indispensable à la conduite de cette étude car elle nécessite la préservation de l'intégrité des systèmes nerveux et immunitaire.

4713. La technique de stéréotaxie est actuellement en pleine expansion du fait du développement de nouvelles méthodes d'analyse des fonctions du cerveau telles que l'optogénétique ou la pharmacogénétique. Ces méthodes permettent de moduler à court ou moyen terme l'activité d'une population spécifique de neurones afin d'en comprendre le rôle dans le fonctionnement de circuits spécifiques du cerveau. Ces nouvelles approches requièrent le plus souvent une technique de haute précision et une excellente fiabilité pour traiter une population spécifique de neurones dans des zones très restreintes au sein du cerveau. La technique de stéréotaxie pratiquée depuis des décennies en neurosciences répond à cette demande de haute précision pour injecter de très faible volume de solution (de l'ordre du microlitre) dans une cible cérébrale à condition d'utiliser un matériel de haute qualité qui soit manipulé par un expérimentateur parfaitement formé aux méthodes et règles de stéréotaxie. Ces conditions sont garantes d'une bonne pratique dans le respect de l'animal et des meilleurs taux de réussite possibles pour ce type d'opération.

Cette demande d'autorisation d'expérimenter concerne un stage de formation à la neurochirurgie stéréotaxique chez les espèces les plus utilisées dans la recherche en neurosciences, à savoir le Rat et la Souris. Il s'adresse aux techniciens, ingénieurs et chercheurs avec une formation spécifique destinée aux personnes concevant ou appliquant des procédures expérimentales chirurgicales qui souhaitent apprendre ou se perfectionner dans cette technique de pointe de la neurochirurgie. Ses objectifs sont de permettre sur une période d'une semaine l'acquisition des connaissances théoriques et pratiques nécessaires à la réalisation d'une neurochirurgie par stéréotaxie selon l'état de l'art et les bonnes pratiques de laboratoire. Le stage allie de façon équilibrée des cours magistraux et des travaux dirigés d'une part, et des démonstrations et travaux pratiques d'autre part. Les cours magistraux et travaux dirigés (qui n'implique pas d'animaux) apportent les connaissances nécessaires à la mise en œuvre des soins opératoires et péri-opératoires dans un projet impliquant la stéréotaxie (monitoring du bien-être de l'animal, anesthésie, prophylaxie et organisation du protocole dans le respect des besoins de l'animal), mais aussi les bases de neuroanatomie fonctionnelle, les principes de la stéréotaxie, la méthode de calcul des coordonnées pour une optimisation du geste et une ouverture sur les applications les plus récentes de la stéréotaxie. La partie importante consacrée à la pratique permet au stagiaire 1) d'apprendre à identifier les moindres signes d'un possible mal être de l'animal pour y remédier dans les plus brefs délais et 2) d'appréhender en condition réelle chacun des gestes qui permettront d'assurer la réussite de son opération dans les meilleures conditions pour l'animal. Pour atteindre cet objectif, le stage se dote d'un fort taux d'encadrement de ces travaux pratiques (maximum de 2 stagiaires par formateur) qui permet un guidage personnalisé du stagiaire pour chacune des étapes de l'opération et pour surmonter efficacement toute difficulté éventuellement rencontrée. Tous les formateurs ont au minimum une dizaine d'année d'expérience intensive de la pratique de la stéréotaxie. Le but du stage est de donner aux stagiaires toutes les bases des compétences permettant une mise en œuvre satisfaisante de la technique dans leur propre laboratoire.

Chaque stage requiert 7 à 17 rats et une souris selon le nombre de stagiaires, donc au total un maximum de 85 rats et 5 souris pour les 5 ans du projet pédagogique.

Remplacer: L'utilisation de vidéos d'enseignement permet de bien visualiser les étapes d'une opération stéréotaxique dans tous ses détails chez l'animal vivant, tandis que l'utilisation d'animaux artificiels permet d'acquérir et d'affiner l'aspect moteur des gestes d'une opération, mais aucune de ces méthodes ne permet 1) de combiner et améliorer les apprentissages visuels et moteurs inhérents à l'intervention, 2) de mettre l'expérimentateur en condition réelle pour faire face à la pression implicite de réussir à placer un animal vivant (anesthésié) dans un cadre stéréotaxique et à effectuer l'opération sans lui occasionner une quelconque souffrance, et 3) aucune ne retranscrita toute la finesse des signes physiologiques et comportementaux à repérer par la vision et le toucher pour identifier les signes de confort opératoire satisfaisant (tête bien fixée, corps en position détendue) ou les prémisses d'éveil, voire de mal être, chez l'animal.

Réduire: Le nombre d'animaux est réduit au maximum grâce à l'étape de démonstration (un animal) et à l'attribution d'un seul animal par stagiaire pour une opération donnée. Pour chaque stage, les 2 démonstrations requièrent donc 2 animaux et comme chaque stagiaire réalise 2 opérations, nous réservons 2 animaux/stagiaire. Les animaux utilisés dans ce stage sont préférentiellement des individus surnuméraires de nos élevages ou ceux n'ayant subi qu'une procédure légère dans un projet antérieur.

Raffiner: Les rats et les souris destinés au stage sont maintenus en groupe sociaux avec des éléments d'enrichissement dans leur cage et ils bénéficient d'un suivi de leur état comportemental et physiologique au quotidien. Seuls les formateurs procèdent à la manipulation des animaux éveillés et à leur anesthésie dans un environnement calme. Au cours des opérations, si malgré la couverture antalgique et le monitoring de l'état d'anesthésie, un animal donne le moindre signe de mal être il sera mis à mort avec une surdose d'anesthésique.

4714. Le choc septique est une défaillance circulatoire aiguë, entraînant des désordres hémodynamiques, métaboliques et viscéraux, déclenché par un agent infectieux. Il représente la forme la plus grave de l'infection. Dès la première semaine d'hospitalisation en réanimation, les patients présentent fréquemment une atrophie musculaire. Cette atrophie est à l'origine d'une mortalité supérieure à 40% et d'une prolongation de la durée de séjour hospitalier.

La myostatine, est une protéine spécifique du muscle qui joue un rôle important en tant que régulateur négatif de la masse musculaire. Notre équipe a démontré que la quantité de cette protéine était augmentée au cours du sepsis, pouvant ainsi participer à l'atrophie musculaire observée.

Notre première étude vise à démontrer que chez des souris sans myostatine, donc avec une hypertrophie musculaire importante, l'atrophie liée au sepsis est limitée voire empêchée. Pour cela des souris sauvages et des souris KO-Mstn, seront conditionnées de façon à développer un sepsis consécutif à une péritonite. Cette étude sera réalisée sur un total de 48 animaux répartis comme suit : 16 souris sauvages avec sepsis, 8 sauvages sans sepsis, 8 KO-Mstn sans sepsis et 16 souris KO-Mstn avec sepsis. Les prélèvements tissulaires seront réalisés 4 jours après l'induction du sepsis pour des analyses de biologie moléculaire et histologiques.

Récemment, il a été rapporté que dans le cadre du sepsis, le processus de réparation ou régénération musculaire était altéré. Dans des conditions physiologiques, la régénération musculaire repose partiellement sur l'activité biologique des cellules souches du muscle appelées cellules satellites. Dans le cadre du sepsis, les cellules satellites subissent des modifications qui altèrent leur capacité régénérative. De façon intéressante, la myostatine inhibe la prolifération des cellules satellites et donc leur capacité à participer à la régénération. La 2ème étude vise à déterminer si, en absence de myostatine la capacité de régénération du muscle au cours du sepsis est améliorée voire restaurée. Pour évaluer notre hypothèse, un processus de dégénérescence sera induit dans un muscle de souris septique sauvage ou KO-Mstn par injection intramusculaire d'une toxine de venin de serpent, la notexine. Pour cette 2ème étude, 12 souris sauvages sans sepsis et 12 souris KO-Mstn sans sepsis seront utilisées pour effectuer des prélèvements tissulaires 11, 14 et 17 jours après induction de la dégénérescence afin d'évaluer la qualité de la régénération chez ces souris. Une fois le jour de prélèvement optimal déterminé, 4 souris sauvages et 4 souris KO-Mstn sans sepsis seront ajoutées pour atteindre un total de 8 souris par groupe et permettre une analyse statistique satisfaisante. Enfin, l'expérience sera réalisée sur des souris septiques avec injection de notexine 3 jours après la péritonite. Compte tenu du risque de mortalité l'effectif de départ a été augmenté à 16 souris sauvages septiques et 16 souris KO-Mstn septiques. Dès qu'un groupe de 8 souris par groupe sera atteint, l'effectif sera considéré comme complet. Au total, un maximum de 64 souris seront utilisées pour cette seconde étude.

Pour les 2 études, un total de 112 souris sera utilisé. Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérés grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant / anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux. Les animaux recevront pendant 4 jours une hydratation sous cutanée ainsi que l'administration d'antidouleur et d'antibiotiques, dès le début du protocole dans tous les groupes. Les animaux seront surveillés 2 fois par jour avec un score spécifique de comportement et de bien-être. En cas de signes de mauvaise tolérance, les animaux seront mis à mort de façon éthique.

Compte tenu que le sepsis implique un dysfonctionnement de plusieurs organes, il nous est impossible de remplacer cette expérimentation par des expériences in vitro. Notre laboratoire possédant l'expertise nécessaire à la réalisation de l'ensemble des procédures (induction du sepsis et dégénérescence), l'expérimentation sera la plus raffinée possible. L'effectif a été réduit au maximum sans mettre en péril l'interprétation statistique et la valorisation des résultats. Les différentes interventions (induction du sepsis et de la dégénérescence, prélèvements sanguins et tissulaires) s'effectueront sous anesthésie générale.

Ce projet aura des retombées directes dans le domaine de la prévention de la fonte musculaire associée au sepsis. L'avancée des connaissances dans ce domaine devrait mettre en évidence de nouvelles cibles pharmacologiques permettant d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

4715. Le système immunitaire joue un rôle important dans la surveillance des cancers en développement. Parmi les acteurs du système immunitaire, les cellules dendritiques (DC) accomplissent une fonction de sentinelle dans la surveillance. Elles sont présentes dans les tissus et capturent des fragments (des antigènes) des corps étrangers (ici, des cellules cancéreuses) qu'elles présentent aux lymphocytes T dans les ganglions pour initier la réponse immunitaire. Une bonne activation des DC est nécessaire pour leur migration vers les ganglions et pour qu'elles induisent une réponse lymphocytaire T anti-tumorale.

L'électrochimiothérapie (ECT) est une stratégie thérapeutique qui consiste à faire entrer des drogues toxiques dans les cellules cancéreuses suite à l'application d'un champ électrique intense et de courte durée. D'excellents résultats ont ainsi été obtenus : les nodules tumoraux traités disparaissent dans 70% des cas. Cependant, il s'agit d'un traitement localisé et il n'a pas été observé à ce jour de protection induite contre des nodules tumoraux à d'autres endroits. Pour cela, il faut que le système immunitaire soit bien activé.

A ce jour les mécanismes qui contrôlent le recrutement des DC dans les tumeurs sont peu connus. Nous proposons d'étudier le recrutement et les fonctions des DC dans les tumeurs avant et après traitement par ECT dans un modèle murin.

L'utilisation de modèles expérimentaux *in vivo* est essentielle à ce projet car la réponse immunitaire dépend notamment de l'organisation de la tumeur (comme sa vascularisation ou le tissu périphérique qui l'entoure).

La souris est un modèle de choix car elle reproduit assez fidèlement la physiopathologie humaine et de plus, il existe de nombreux modèles de souris transgéniques ou déficientes pour certaines molécules, ce qui permet de réaliser des études mécanistiques.

La caractérisation de l'impact de l'ECT sur l'activation des DC infiltrant les tumeurs et les réponses lymphocytaires T résultantes constituera une avancée majeure pour la conception de thérapies plus complètes permettant de protéger le patient contre l'apparition de métastases ou de récurrence.

Globalement, l'ensemble des expériences est planifié pour pouvoir réaliser des tests statistiques sur nos résultats et pour réduire un maximum le nombre d'animaux utilisés. Nous avons également intégré des expériences d'imagerie permettant de suivre le volume tumoral sur le même animal au cours du temps. Dans les expériences nécessitant de prélever la tumeur à différents temps après traitement, nous réaliserons des expériences pilotes sur plusieurs temps, puis nous ne conserverons que les temps les plus pertinents pour répéter les expériences.

Les conditions d'hébergement et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire toute angoisse ou dommages durables. Pour pallier au stress et à la douleur, les procédures expérimentales seront appliquées sous anesthésie générale et les animaux seront surveillés quotidiennement, et ces derniers seront sacrifiés si une souffrance ou une dégradation physique est constatée. Pour pallier au stress et à la douleur, les procédures expérimentales seront appliquées sous anesthésie générale et les animaux seront surveillés quotidiennement, et ces derniers seront sacrifiés si une souffrance ou une dégradation physique est constatée.

Le nombre de souris nécessaire à la conduite de ce projet est estimé à 1554 pour les 3 années.

4716. Les cancers sont la première cause de décès chez l'homme et la deuxième chez la femme. La forte mortalité peut s'expliquer par un défaut dans un diagnostic précoce et à la faible réponse des patients aux traitements actuels (chirurgie et chimiothérapie). La recherche médicale s'oriente ainsi vers de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi celles-ci l'immunothérapie, utilisée seule ou en combinaison avec d'autres thérapies plus conventionnelles (chimiothérapie, radiothérapie) présente un intérêt indéniable. Cette stratégie, basée sur la restimulation *in situ* du système immunitaire, permet d'envisager une réponse immunitaire capable d'induire le rejet de la tumeur, tout en préservant le tissu sain, et de doter le patient d'une mémoire immunitaire antitumorale, prévenant ainsi des récurrences.

Nous avons développé un vecteur vaccinal qui peut être couplé à n'importe quel antigène tumoral pour induire une réponse immunitaire spécifique de chaque tumeur. Ce vecteur pourra ainsi trouver une application clinique dans de nombreux cancers et s'inscrit dans une évolution vers des traitements personnalisés selon chaque patient. Avant de proposer ce vaccin thérapeutique en phase clinique, nous devons réaliser une preuve de concept de notre vecteur *in vivo*. En effet, seul le test de ce vecteur dans un modèle *in vivo* nous assure de l'effet antitumoral recherché dans des conditions physiopathologiques proches de la réalité clinique.

Aussi, l'utilisation des animaux est indispensable, les modèles tumoraux seront réalisés sur un nombre nécessaire et suffisant d'animaux (400 souris de fond génétique C57BL/6J). Ce nombre a été défini afin d'exploiter des résultats statistiquement fiables. Le protocole expérimental comprend un suivi quotidien des animaux. Pour éviter toute souffrance de l'animal au cours du protocole expérimental, des indicateurs comportementaux et physiques prédéfinis (état général, prostration, poil hérissé, masse de l'animal) seront évalués quotidiennement, et constitueront les points limites de l'expérience (mise à mort de l'animal). Notre démarche expérimentale tient ainsi en compte la règle des 3R (réduction du nombre d'animaux par l'utilisation du nombre minimum permettant des statistiques fiables, raffinement du protocole expérimental, pour éviter le stress de l'animal, de la musique est également mise dans la pièce et remplacement des animaux au maximum par des expériences *in vitro* préalablement réalisées : tous les tests de cytotoxicité et d'activation cellulaire ont été fait *in vitro*). Ce projet s'inscrit ainsi dans une gestion éthique de l'expérimentation animale et est donc en accord avec les réglementations européennes et françaises de bonnes pratiques de laboratoire.

4717. Lors d'un diabète, l'hyperglycémie chronique provoque des remaniements majeurs de la paroi vasculaire et conduit à un vieillissement prématuré des vaisseaux dont une caractéristique majeure est la fragmentation des fibres élastiques et la génération de peptides d'élastine (EDP) dans le sang circulant.

De nombreuses études ont d'ailleurs montré une corrélation entre la quantité sanguine de EDP et la progression de pathologies vasculaires chez les patients atteints de complications diabétiques.

Les objectifs de ce projet de recherche sont de déterminer les conséquences du blocage des effets des EDP sur 2 complications vasculaires associées au diabète de type 2 : l'athérosclérose et la thrombose.

L'athérosclérose et la thrombose artérielle sont deux situations physiopathologiques complexes, multifactorielles, multicellulaires, qui nécessitent l'utilisation de modèles intégrés et pour lesquelles il n'existe pas de modèle de substitution ; justifiant ainsi la réalisation de cette étude in vivo.

Ce projet nécessitera un nombre maximal de 100 souris et comportera 3 procédures.

Pour chaque procédure, des souris mâles LDLR^{-/-} de 8 semaines seront soumises à un régime de type Western Diet pour le déclenchement d'un diabète de type 2.

Une étude pilote (procédure pilote) sera tout d'abord réalisée afin de déterminer la durée optimale de régime (5 ou 10 semaines) permettant l'apparition d'un remodelage vasculaire et une fragmentation des fibres élastiques ; tout ceci afin de limiter le nombre d'animaux nécessaire pour les 2 procédures proposées ci-après (procédure athérosclérose, procédure thrombose).

Pour chacune des deux procédures, les souris recevront soit un anticorps bloquant, soit un inhibiteur de sialidase tout au long du régime.

Un nombre maximal de 10 souris par groupe (pour un total de 4 groupes, incluant les 2 groupes contrôles respectifs) sera considéré.

Les animaux seront anesthésiés à l'issue du régime et ce durant toute la durée de l'expérience (sans réveil) de sorte à ce qu'aucune souffrance ne soit induite.

Les conditions d'hébergement incluront les mesures de raffinement adéquates afin de limiter le stress des animaux.

Les effets sur l'athérosclérose (procédure athérosclérose) seront étudiés essentiellement par analyse immunohistochimique sur l'aorte, après sacrifice des souris.

Les effets sur la thrombose (procédure thrombose) seront, quant à eux, étudiés à l'aide d'un modèle de thrombose induite par voie chimique au niveau de l'artère carotide, avec suivi de la formation de thrombus en temps réel par microscopie intravitale.

La réalisation de ce projet permettra de mieux comprendre les effets du diabète de type 2 combiné à une dyslipidémie sur le remodelage de la MEC vasculaire et apportera une réponse claire quant au rôle des peptides d'élastine produits de manière endogène et de leur récepteur dans les complications vasculaires athérothrombotiques associées.

4718. La neuroinflammation est une composante importante de la physiopathologie de nombreuses maladies telles que Alzheimer, Parkinson ou encore la sclérose en plaque. Des études assez récentes montrent également le rôle important de la neuroinflammation dans des pathologies psychiatriques telles que la dépression sévère ou la schizophrénie. Il existe un important besoin d'outils translationnels d'investigation non invasive de l'inflammation au niveau du système nerveux central pour en comprendre son rôle. La microglie joue un rôle central dans la réponse inflammatoire du cerveau. Dans ces conditions, une modification phénotypique des cellules immunitaires au niveau cérébral appelées microglie peut avoir lieu et conduire à l'expression de protéines pouvant constituer des biomarqueurs qui témoignent de son activation "inflammatoire". Ainsi, des radiotraceurs qui se fixent spécifiquement sur des biomarqueurs de la neuroinflammation sont étudiés pour préciser les conditions pouvant conduire à leur modulation, et renseigner de la présence d'un processus inflammatoire cérébral. Pour nos études, un radiotraceur spécifique d'une protéine de l'inflammation sera utilisé en raison de sa très bonne affinité pour sa cible et une grande facilité d'utilisation des traceurs marqués au fluor 18 pour des futures perspectives d'études chez l'Homme. Pour notre projet, nous utiliserons des modèles murins d'inflammation cérébrale. Ces modèles permettent d'observer un phénotype inflammatoire sans neuro-dégénérescence et la présence d'une réaction immunitaire dirigée contre des cellules du cerveau. L'un de ces modèles s'apparente assez à ce qui a été observé en clinique dans des pathologies psychiatriques (troubles bipolaires et schizophrénie) mettant en jeu des réactions auto-immunes contre des cibles extracellulaires neuronales. Les objectifs de ce travail sont donc : 1/ de caractériser au préalable des cibles spécifiques envisagées par imagerie TEP permettant l'étude de l'inflammation cérébrale ; 2/ d'étudier par imagerie fonctionnelle TEP à la fois les modifications du métabolisme glucidique et lipidique au décours d'une inflammation ; 3/ Etude par imagerie TEP de l'évolution de l'expression d'un biomarqueur de l'inflammation ; 4/ de développer des outils d'imagerie TEP permettant l'étude de l'inflammation cérébrale, et l'éventuelle réponse aux traitements anti-inflammatoires ; 5/ d'étudier les modifications au niveau cérébral durant cette inflammation. Au final 236 souris seront nécessaires pour la conduite globale de ce projet sur 5 ans. D'après la littérature, 6 à 8 animaux par groupe expérimental sont nécessaires à chaque expérimentation de manière à pouvoir comparer statistiquement les résultats. L'utilisation d'un radiotraceur spécifique au niveau cérébral nécessite d'étudier son devenir in vivo dans un organisme entier aussi bien en terme de distribution que de métabolisme. La modalité d'imagerie dynamique TEP (tomographie d'émission par positons) du petit animale est un élément incontournable pour le développement de nouveaux radiotraceurs chez l'homme. Le choix de l'espèce murine est en conformité avec les limites techniques / physiques de cette méthode d'imagerie à savoir une résolution spatiale de 1 mm. L'étude sur des animaux plus petits est inenvisageable car non pertinente et non extrapolable à l'espèce humaine. Par ailleurs l'imagerie scintigraphique TEP est une technique non invasive nécessitant que les animaux soient anesthésiés pendant toute la durée de la procédure (anesthésie gazeuse avec 1-2% d'isoflurane) ce qui permet de limiter au maximum la douleur des animaux. Le nombre d'animaux nécessaire estimé est le plus faible possible tout en permettant l'aboutissement de ce projet.

Les animaux feront l'objet d'un suivi journalier. Tout constat de dépassement d'un point limite entraînera le retrait de l'animal de l'étude et son sacrifice puisque l'usage d'un analgésique compromettrait les résultats de l'étude. Les points limites seront : une perte de poids supérieure à 20% ; prostration de l'animal ; comportements stéréotypés de stress.

4719. La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une pathologie pulmonaire inflammatoire complexe entraînant une diminution progressive et irréversible des capacités respiratoires. Les thérapeutiques actuellement disponibles sont incapables de contrôler de façon significative l'évolution de la maladie. L'absence de connaissances précises des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la BPCO rend difficile le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les données physiopathologiques de la maladie indiquent que la BPCO est apparentée à une maladie du vieillissement et que les infections répétées des patients BPCO entretiennent un état inflammatoire chronique. Le vieillissement du système immunitaire et les processus d'exacerbation infectieuse doivent donc être pris en compte dans la compréhension de cette maladie et dans la prise en charge thérapeutique des patients. Par ailleurs, les cellules immunitaires et inflammatoires interviennent au cours de la maladie pour générer des quantités importantes de peptides d'élastine (PE) qui sont issus de la dégradation protéolytique de l'élastine pulmonaire. Ces peptides participent activement à la physiopathologie de la maladie. Nous avons montré dans un travail précédent que l'injection intra-trachéale de PE induit chez la souris un emphysème en 21 jours et polarise la nature de la réponse immunitaire. Par ailleurs, nous avons identifié par des approches de modélisation moléculaire des peptides antagonistes du récepteur à l'élastine capables de réguler les effets biologiques des PE.

L'objectif de notre projet est d'étudier chez la souris, après instillation intra-trachéale de PE, les conséquences du vieillissement ou d'une infection chronique sur les paramètres inflammatoires et immunitaires de la maladie pulmonaire. Les deux aspects du projet de recherche que sont le vieillissement et les phases d'exacerbation infectieuse ne peuvent pas être abordés au travers de modèles in vitro. Seuls les modèles animaux peuvent permettre d'étudier ces deux aspects essentiels de la pathologie.

Pour ce projet, le modèle animal utilisé est la souris (*Mus musculus*, C57BL/6) et le nombre d'animaux total à utiliser est de 430. Toutes les techniques et les méthodologies utilisées dans le projet ont été optimisées afin d'utiliser un nombre minimal d'animaux tout en conservant la contrainte d'une approche statistique efficiente des résultats. Les animaux seront hébergés à raison de 5 souris d'un même groupe par cage. L'eau et la nourriture sont mises à disposition ad libitum et la litière changée régulièrement. Afin de réduire le niveau de souffrance des animaux, avant toute instillation les souris sont anesthésiées et avant tout prélèvement elles sont euthanasiées par injection d'une surdose d'anesthésique. Par ailleurs, un suivi des animaux sera effectué tous les deux jours afin d'évaluer leur état de santé (examen clinique, prise de poids, prise de température, étude de la fonction respiratoire, étude du comportement,...). Ce suivi permettra d'identifier l'atteinte d'un des points limites décrits dans l'approche expérimentale (perte de poids rapide, hypothermie, respiration difficile, diminution de la mobilité interférant avec l'activité de base de l'animal, mauvais état du pelage, signes neurologiques,...). L'approche expérimentale d'induction d'une BPCO par injection de PE a déjà été validée chez l'animal jeune sans qu'aucun des points limites précédents n'aient été atteints. Nous pensons que ces points limites ne devraient pas non plus être atteints chez les souris âgées. Par ailleurs, la dose de 20 µg (jamais utilisée pour les souris jeunes) ne sera injectée que si les doses cibles de 5 et 10 µg ne déclenchent pas de BPCO chez les souris âgées.

4720. Le but du projet est de réaliser des modèles murins transgéniques de méningiomes afin de mieux comprendre l'oncogenèse de ces tumeurs et de mettre en place des essais thérapeutiques précliniques chez la souris avant de lancer des essais cliniques chez les patients. Dans l'esprit des nouvelles réglementations, le nombre d'animaux a été réduit au minimum après avoir évalué les alternatives in vitro (règle des 3R).

- Description et justification du modèle animal utilisé : en l'absence de lignées murines de méningiomes et devant le faible nombre et la pertinence médiocre des lignées humaines connues, la conception de modèles murins transgéniques est le meilleur moyen d'obtenir des tumeurs reproduisant fidèlement la pathologie humaine. Parallèlement, on va développer un modèle de xélogreffes syngéniques orthotopiques, c'est à dire l'injection de cultures de méningiomes transgéniques dans des souris immunocompétentes, en sous-dural. La reproductibilité de ce modèle le rend utilisable en préclinique pour tester des drogues. Des essais thérapeutiques seront menés dans ces modèles syngéniques.

- Justification du nombre d'animaux demandés (n=350): le nombre d'animaux demandé prend en compte les cohortes étudiées, les cohortes contrôle, les animaux destinés à des prélèvements de tumeurs pour l'établissement de lignées cellulaires et la réalisation d'extraction tissulaires (ADN, ARN, protéines). Le nombre total d'animaux se porte à 200 pour la réalisation de nouveaux modèles de méningiomes. Le nombre d'animaux demandé prend en compte les différents protocoles précliniques à l'étude avec une cohorte contrôle pour chacun d'entre eux. Le nombre total d'animaux se porte à 150. En particulier, les études précliniques ne seront réalisées qu'après un pré-screening sur des lignées obtenues à partir des tumeurs murines (IC50, tests de prolifération). Des groupes de 7 souris traitées seront faits (un groupe référence traité seulement par véhicule a déjà été fait et sert de référence pour toutes les expériences précliniques).

- Contributions potentielles de cette étude à la biologie et à la médecine humaine et animale : cette étude permet de déterminer les rôles respectifs de gènes suppresseurs de tumeur (*Nf2*, *Cdkn2ab*) et oncogènes (*Akt*, *PDGF-B*) dans la tumorigenèse méningée et de développer les modèles correspondants. Pour la partie préclinique, cette étude pourra conduire à la découverte de traitements médicamenteux des méningiomes, jusqu'ici inexistantes. : la première molécule à tester est un inhibiteur d'HSP90.

- Dans le projet ont été définis des points limites d'expérimentation, sachant que la plupart des méningiomes générés chez la souris sont des tumeurs intracrâniennes extra-cérébrales, à développement lent. Une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée soit par l'expérimentateur soit par le personnel de l'animalerie. Une euthanasie est alors décidée soit à 15 mois soit dès

l'apparition de signes cliniques (comportement altéré, perte de poids >10%) avec systématiquement une analyse histologique des tissus intracrâniens (méninges, cerveau).

4721. L'accident vasculaire cérébral (AVC) constitue la première cause de handicap acquis chez l'adulte, la deuxième cause de démence et la troisième cause de mortalité : c'est donc un enjeu majeur de santé publique. Dans 85% des cas, l'AVC est d'origine ischémique, c'est-à-dire qu'il provient d'une occlusion artérielle aiguë. L'ischémie cérébrale s'associe à une réaction inflammatoire qui contribue aux dommages cérébraux de manière significative. Le suivi par imagerie in-vivo de cette réaction inflammatoire permettrait de mieux comprendre sa dynamique spatio-temporelle et d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à moduler cette réaction. Pour cela, nous proposons de développer une approche en imagerie in-vivo multimodale basée sur l'administration d'un agent de contraste qui cible spécifiquement la réaction inflammatoire chez le petit rongeur présentant un AVC ischémique. Les modalités d'imagerie seront les mêmes que celles qui peuvent être utilisées chez l'homme : imagerie par résonance magnétique (IRM), scanner X (tomodensitométrie TDM d'absorption, de contraste de phase ou de k-edge) et tomographie par émission de positons (TEP). L'objectif est de générer un signal spécifique dans les régions du cerveau présentant une forte réaction inflammatoire, ce qui ouvrirait la voie à un suivi non-invasif de l'inflammation dans l'ensemble du cerveau, à des fins de diagnostic et de suivi de traitement. Le but à plus long terme est de transférer ces méthodes chez l'Homme, pour une meilleure prise en charge des patients présentant un AVC.

L'avantage de l'imagerie in-vivo est qu'elle permet des études sur l'animal vivant plutôt que d'avoir à sacrifier les animaux à intervalles donnés pour faire la même observation. Chaque animal est son propre contrôle, ce qui permet d'augmenter la puissance statistique des résultats tout en limitant le nombre d'animaux (Réduction) une fois la technique d'imagerie validée. L'imagerie est réalisée sous anesthésie. L'introduction d'agents de contraste est un outil important car ils permettent de faire ressortir le phénomène cellulaire ou moléculaire d'intérêt (inflammatoire). Quand cela est possible, les agents de contraste sont d'abord testés dans un modèle d'ischémie cérébrale in-vitro (culture cellulaire de macrophages ou de cellules endothéliales cérébrales soumises à une privation temporaire en glucose et en oxygène) (Remplacement). En bref, les mesures suivantes visent à réduire le nombre d'animaux et à raffiner les protocoles :

- La taille des effectifs est calculée a priori, en fonction de l'effet attendu ;
- Les expérimentations sont réalisées en aveugle et en randomisant les produits administrés (agents de contraste et/ou agents thérapeutiques) comme dans les essais cliniques ;

- Les paramètres physiologiques appropriés (poids, température, capnie, respiration...) sont mesurés tout au long du protocole ;
- Pour les essais thérapeutiques, deux critères d'évaluations seront appréciés : la réponse neurofonctionnelle et la taille de la lésion. Les biomarqueurs d'imagerie sont inclus pour évaluer 1) si la cible thérapeutique est bien exprimée (diagnostic) et 2) si la cible thérapeutique est bien modifiée par le traitement (suivi de traitement). Le développement de ces biomarqueurs d'imagerie constitue le cœur de ce projet de recherche.

L'objectif de ces développements de méthodologie d'imagerie in-vivo est triple :

- 1) Mieux comprendre la physiopathologie de l'AVC ;
- 2) Mieux évaluer de nouveaux traitements anti-inflammatoires au stade préclinique, afin de sélectionner les meilleurs candidats pour les essais cliniques ;
- 3) Pouvoir proposer, dans quelques années, des agents de contraste utilisables chez l'homme et dont l'imagerie sera un apport pour le diagnostic, la compréhension physiopathologique et l'évaluation thérapeutique de l'AVC.

Environ 48 rongeurs (rats et souris) pendant 3 ans seront utilisés dans ce projet.

4722. Près de 15 % des couples sont confrontés à des problèmes d'infertilité et celle-ci est un problème important de santé publique. Dans près de la moitié des cas une composante masculine est retrouvée, avec souvent une anomalie des paramètres du spermogramme montrant une diminution quantitative et/ou qualitative du sperme. Une origine génétique est probablement responsable d'un grand nombre de ces problèmes mais on connaît encore très peu de gènes dont les mutations entraînent un trouble de la spermatogenèse chez l'humain. De manière similaire, de nombreuses causes génétiques sont attendues dans le cadre de l'infertilité féminine.

Notre laboratoire explore les causes de l'infertilité génétique humaine à partir d'une cohorte de patients infertile (homme et femme). Des analyses génétiques nous ont déjà permis de lier 3 gènes à des tératozoospermie sévères chez l'homme. Notre programme de recherche a permis de trouver une vingtaine de nouveaux gènes candidats tant chez la femme que chez l'homme.

L'objectif de ce travail est de confirmer le lien entre ces gènes et l'infertilité humaine par la création de modèles souris déficientes pour les gènes concernés et de vérifier si cette l'absence du gène entraîne une infertilité similaire à celle observée chez nos patients Réduire Les expériences sont répétées uniquement dans le but d'avoir une analyse statistique (chaque expérience est répétée entre 3 et 10 fois)

Raffiner : Les douleurs associées aux chirurgies sont systématiquement traitées avec des antidouleurs et des anesthésiques

Remplacer : A l'heure actuelle, aucune méthode alternative n'existe pour récupérer des spermatozoïdes et des ovocytes, permettant d'étudier la fécondation

Le nombre d'animaux inclus dans les procédures expérimentales est de 660 souris.

4723. Notre laboratoire étudie depuis de nombreuses années les régulateurs de l'angiogenèse et de l'invasion sur des modèles cellulaires in vitro. L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins, intervenant dans des étapes du

développement tumoral pour assurer la croissance et l'irrigation des tumeurs in vivo. Les cellules tumorales acquièrent aussi des propriétés invasives et quittent la tumeur primaire, notamment après des traitements anti-angiogéniques. Ce processus est problématique d'un point de vue clinique dans le cas du glioblastome, un cancer du système nerveux central, car il est impossible d'avoir accès aux cellules invasives afin de circonscrire la tumeur.

Aussi, après de nombreuses expériences préliminaires in vitro, nous devons valider nos modèles sur un minimum d'animaux in vivo pour tenir compte du contexte physiologique.

Nous avons caractérisé in vitro l'implication de facteurs spécifiquement impliqués dans l'invasion (thrombospondin-1 ou Tsp1 et le TGFbeta). Ces molécules semblent également moduler l'invasion des cellules in vivo chez des patients atteints de glioblastomes. Aussi nous devons maintenant passer à un modèle in vivo chez l'animal pour tester cette hypothèse et évaluer le rôle de nos molécules d'intérêt dans l'évolution de cette maladie afin de définir de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour cela, nous utiliserons un modèle murin immunodéficient afin d'implanter des cellules tumorales humaines et ainsi reproduire au plus près les conditions de formation de ces tumeurs chez l'homme. Nous utiliserons le minimum nécessaire d'animaux pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochables. L'ensemble des expériences impliquera différents lots d'animaux, dont le total sera de 1300. Les animaux sont produits à cet effet dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure l'élevage et le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation et la règle des 3R. En effet, afin de réduire le nombre d'animaux, nous utiliserons tous les mâles et toutes les femelles issus des croisements. Ensuite, nous ferons des analyses bioinformatiques afin d'éviter d'utiliser un nombre trop important d'animaux.

4724. La greffe de cellules souches hématopoïétiques est le traitement curatif de nombreux types de cancers hématologiques. Son objectif est de reconstituer un système immunitaire sain et d'éliminer les cellules malignes. Le concept que les cellules immunes du donneur peuvent éradiquer les cellules leucémiques a été initialement démontré dans les années 1950-1960. Malheureusement, une limite importante de l'utilisation de ce traitement dans les cancers est la survenue fréquente de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) qui est causée par les lymphocytes du donneur. La GvHD se présente sous une forme aiguë et une forme chronique (GvHDc) dont les aspects cliniques et physiopathologiques sont très différents. La GvHDc peut toucher la peau, les muqueuses digestives, le foie ou les poumons. Elle survient chez 30 à 65% des patients et est responsable d'une morbidité à long terme et d'une mortalité qui peut atteindre 30% chez des patients généralement en rémission de leur maladie hématologique.

Nous souhaitons approfondir nos résultats humains par l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires dans un modèle préclinique de la forme chronique de la maladie. Des expériences in vitro, préalables à une étude in vivo, ont été réalisées et ont appuyé la nécessité du modèle préclinique de GvHD pour identifier la (ou les) population(s) cellulaire(s) immune(s) responsable(s) de la maladie. Le modèle préclinique nous permet l'accès aux organes lymphoïdes secondaires (ganglion et rate) sièges des réponses immunes et la disposition d'assez de tissus cible de la GvHDc pour des études phénotypiques et fonctionnelles des cellules effectrices. Par ailleurs, l'utilisation de modèles de souris déficientes ou transgéniques permettrait de consolider les résultats obtenus in vitro et ex vivo. Le protocole expérimental utilisé engendre des procédures classées légères à modérées.

Nous estimons qu'un nombre de 3822 souris pour la réalisation de nos objectifs sur la durée du projet. Ce nombre a été déterminé sur la base des expériences et analyse statistique des membres de l'équipe et des collègues. Les expériences seront réalisées par des personnes compétentes. Nous veillerons au bien-être des animaux par un suivi quotidien effectué par une personne compétente de l'équipe, mais également par le personnel de l'animalerie, et par un raffinement des conditions d'hébergement des souris.

Lignées de souris génétiquement modifiées qui seront utilisées: FasL KO, FasL floxé, IL-10-GFP, FoxP3-RFP, IL-10GFP/FoxP3-RFP.

4725. Les mécanismes qui régulent la différenciation des cellules lymphoïdes restent mal connus, mais leur fréquente altération dans les hémopathies humaines suggère qu'ils jouent des rôles physiologiques et physiopathologiques majeurs. Le proto oncogène Ets-1 est un facteur de transcription essentiel pour le développement normal des cellules lymphoïdes T, B et NK. De même, les protéines à activité histone méthyltransférase (HMT) telles que Suv39h1 ou NSD2/MMSET participent à la lymphopoïèse et maintiennent l'intégrité génomique des cellules au cours de leur maturation.

Notre projet vise à caractériser le rôle de ces protéines nucléaires dans les lymphocytes normaux et tumoraux. Pour cela, nous importerons et analyserons des souris génétiquement modifiées n'exprimant plus ces molécules d'intérêt et étudierons leur système lymphoïde en respectant la règle des 3 R. Nous réaliserons donc en première instance des tests in vitro. Cependant le recours à un modèle animal est nécessaire afin d'analyser des processus aussi complexes que la différenciation et la progression tumorales des cellules lymphoïdes. L'expérience de notre équipe dans l'utilisation de ces modèles, la multiplicité des paramètres mesurés, l'utilisation des méthodes statistiques nous permettront une exploitation maximale des données obtenues par expérience et de réduire le nombre d'animaux à utiliser (12 animaux par condition d'analyse). Au niveau du raffinement, une surveillance journalière des souris en expérimentation sera effectuée par l'expérimentateur, en complément de celle faite par le personnel de l'animalerie, afin de détecter tous signes de souffrance (altérations physiques et/ou comportementales) qui conduiront à leur euthanasie par la méthode réglementaire en vigueur. En effet, une perte de plus de 20% du poids initial sera considérée comme point limite justifiant l'euthanasie de l'animal. Les personnes participant au projet (animaliers ou chercheurs) seront qualifiées et auront suivi une formation adaptée à leur niveau de participation aux expérimentations et à leur fonction. Un total de 1500 souris seront utilisés pour l'ensemble de ce projet, qui permettra de caractériser les processus qui contrôlent la mise en place du système immunitaire et de définir de nouvelles cibles thérapeutiques dans les hémopathies lymphoïdes.

4726. Nous voulons étudier l'effet de microvésicules sécrétées (exosomes) par des fibroblastes dermiques et de la papille dermique (jeunes et âgés) sur la cicatrisation cutanée. Nos données en effet suggèrent que ces exosomes, qui ont la particularité de contenir des ARNm et miRNA, modulent la migration de cellules cutanées in vitro. Notre approche de traiter les blessures cutanées par des exosomes est totalement innovante et porteuse d'un potentiel thérapeutique important. Nous avons tenu compte de la règle des 3R pour respecter les bonnes pratiques en expérimentation animale. Remplacer: toutes les expériences in vitro ont été faites et validées (publications) et seules restent à faire les expériences in vivo pour passer aux essais thérapeutiques chez l'homme. Réduire: un total de 150 souris C57BL6 sera utilisé sur 3 expériences indépendantes. Le calcul du nombre de souris a été estimé par une quantification et une analyse statistique avec le logiciel Stateview 2002 et un seuil de signification de $P < 0,05\%$. Raffiner: le choix de la souris est incontournable pour des études précliniques. Mais ce projet sera réalisé avec une attention particulière portée sur le bien-être de l'animal : en cas de modification physique et/ou comportementale, nous procéderons à l'euthanasie de l'animal. De plus, la blessure cutanée est peu invasive et, sous anesthésie, ressemble aux biopsies effectuées sur les patients. Un suivi quotidien des animaux par des personnes compétentes sera réalisé durant toute la durée du projet.

4727. Le fonctionnement du cerveau repose sur la transmission d'informations chimiques entre les différents types de cellules qui le constituent : neurones, cellules gliales. La compréhension de cette communication chimique est un objectif essentiel en neurosciences. Pour détecter les molécules libérées par les cellules du cerveau dans le milieu interstitiel, nous développons des biocapteurs de taille micrométrique qui sont très peu invasifs. Depuis trois ans, nous avons établi la preuve d'un nouveau concept de biocapteurs à base de fibres de carbone métallisées grâce à des résultats obtenus in vitro sans avoir recours aux animaux vivants. Le but de ce projet sera de valider pour la première fois le fonctionnement de ces nouveaux biocapteurs in vivo chez le rat anesthésié, pour la détection de métabolites énergétiques comme le glucose et le lactate, ainsi que de neuromédiateurs comme le monoxyde d'azote. Pour ce faire, les capteurs seront implantés en intracérébral chez des rats anesthésiés pour monitorer en temps réel une stimulation calibrée du parenchyme cérébral. Ce projet utilisera un total de 60 animaux sur deux ans, nous permettant ainsi de valider un important dispositif d'investigation du cerveau qui pourra avoir des applications en Neurosciences. De plus, ces outils de détection pourront à l'avenir fournir de puissants outils de diagnostic pour monitorer le cerveau des patients cérébrolésés placés en soins intensifs neurologiques. Le nombre d'animaux est réduit au minimum pour permettre une interprétation statistique des résultats. Ce projet vient en complément d'une première approche in vitro utilisant des solutions standard et destinée à mettre au point les biocapteurs sans avoir recours à l'animal vivant. L'ensemble des expérimentations décrites dans ce projet sera effectué sous anesthésie générale sans réveil avec analgésie locale au niveau du scalp pour réduire la souffrance des animaux.

4728. L'objectif principal de ce projet est de comprendre le rôle du LXR β (connu pour être impliqué dans le métabolisme du cholestérol) et du AhR (impliqué dans la détoxification) dans le processus de développement et du maintien de la myéline (gaine isolante entourant les axones). Une meilleure compréhension de l'importance de ces deux gènes permettrait le développement de nouvelles pistes thérapeutiques pour le traitement des maladies démyélinisantes, comme la maladie de Charcot-Marie Tooth par exemple.

Le projet consiste à analyser les conséquences de l'absence des gènes AhR et LXR β chez la souris. Pour cela, nous utiliserons des souris transgéniques invalidées pour ces gènes spécifiquement dans les cellules de Schwann (responsables de la mise en place et du maintien de la myéline). Les capacités locomotrices de ces souris seront testées durant le processus de myélinisation (qui se déroule principalement pendant les 3 premières semaines de vie de la souris) et à l'âge adulte (8 semaines et 6 mois). Nous analyserons pour cela la capacité des souris à explorer leur environnement, à se déplacer sur une barre horizontale... Nous mesurerons également la vitesse de conduction nerveuse au moyen d'électrodes placées sur le nerf sciatique. Cette procédure sera effectuée sous anesthésie générale pour éviter toute douleur. Nous mènerons ensuite des études biochimiques, métaboliques et histologiques des nerfs isolés.

Afin d'être en conformité avec les exigences des 3R, nous allons utiliser le minimum d'animaux en expérimentation en prélevant le maximum de tissus biologiques sur chaque animal et en utilisant les tests statistiques appropriés afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Nous allons également raffiner l'étude en évitant des tests comportementaux douloureux, en réduisant la durée de l'étude au maximum et en appliquant des points limites notamment la mise à mort des souris en cas de souffrance majeure. Enfin, en complément de ces études in vivo, nous utiliserons des méthodes in vitro de culture de cellules afin d'identifier les cibles de ces gènes, nous permettant de mieux comprendre le rôle de ces gènes sur la myéline sans avoir besoin d'utiliser de nouveaux animaux. Au total nous avons donc besoin de 800 animaux pour une étude qui s'étend sur 5 ans.

4729. Les tiques du genre *Ixodes* sont susceptibles de transmettre différents agents infectieux, le plus connu étant l'agent responsable de la borreliose de Lyme, *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Utilisant le modèle murin de cette maladie, nous avons mis en évidence que les bactéries, même après dissémination vers les organes cibles (système nerveux, articulation et peau à distance du point de piqûre) se multiplient dans la peau entre 7 et 10 jours et y persistent plusieurs mois en absence de traitement antibiotique. Utilisant, une nouvelle technique de protéomique (SRM-MS/MS : Selected reaction monitoring-mass spectrometry), nous avons identifié dans la peau de souris des protéines bactériennes parmi les centaines de protéines de peau de souris. Nous avons ensuite sélectionné 5 protéines de la bactérie et nous avons été recherchés ces protéines de bactéries dans des peaux de patients infectées avec l'agent de la maladie de Lyme par cette nouvelle technique. *Borrelia* a été mise en évidence chez ces patients. Nous sommes en train de valider cette nouvelle méthode chez un plus grand nombre de patients.

Les tiques pouvant inoculer d'autres bactéries et parasites (*Borrelia*, *Anaplasma*, *Rickettsia*, *Babesia*...). Nous voudrions développer un diagnostic universel sur biopsies de peaux humaines pour rechercher les autres agents infectieux susceptibles d'avoir été transmis par des tiques infectées collectées dans la nature : 10-20% de tiques sont infectées par *Borrelia burgdorferisensu lato* et 2% de tiques sont infectées avec *Borrelia miyamotoi* et 0.8 % de tiques sont infectées avec *Anaplasma*.

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

Remplacement : les tiques Ixodes sont vectrices de différents agents infectieux dont des bactéries et des parasites. Ces agents infectieux sont inoculés dans la peau au cours d'une piqûre avant de disséminer chez les animaux et l'homme. Nous devons donc nous placer in vivo (peau de souris) afin de mimer au mieux le processus de transmission et identifier les protéines d'agents pathogènes essentielles dans la transmission.

On utilise :

(1) les nymphes car elles correspondent à la stase la plus abondante dans l'environnement et c'est celle la plus incriminée dans la piqûre chez l'homme

(2) les femelles sont aussi utilisées car on étudie/collecte en même temps les glandes salivaires dont le contenu est analysé après dissection.

La dissection des glandes salivaires des nymphes est trop difficile car leur taille est trop petite.

Raffinement : Le dépôt de tiques sauvages sur les souris se fait sur animaux anesthésiés afin de limiter leur stress mais aussi leur inconfort. La durée de gorgement pour les nymphes est de 5 jours et les adultes ne seront gorgées que pendant 3 jours ceci pour éviter la spoliation sanguine. Pendant toute la durée de l'expérience les animaux sont observés quotidiennement par du personnel compétant. Si on observe que les souris commencent à avoir du mal à se déplacer alors du paracétamol est ajouté dans l'eau de boisson et on les observe plusieurs fois dans la journée. Si malgré le traitement, au bout de 48H il n'y a pas d'amélioration alors les animaux seront euthanasiés. Pendant toute la durée de cette expérience les animaux sont hébergés seuls par cage mais à proximité olfactive et visuelle de leur congénères. Les animaux sont nourris ad libitum.

Réduction : Dans notre étude vu le petit nombre de tiques infectées, il nous faudra un nombre suffisant de souris pour y déposer des nymphes ou des adultes infectées.

Dans notre projet nous envisageons d'utiliser 100 souris C3H/HeN.

4730. La dépression majeure concerne entre 15 et 17% de la population française. Il a été démontré que les événements de vie stressant augmentent le risque de dépression, tandis que la répétition d'épisodes dépressifs altère la mémoire. Tout cela se passe dans le cerveau qui comprend deux types de population cellulaire. Les neurones qui assurent la communication de l'information et les cellules gliales, dont les astrocytes. La densité de ces cellules astrocytaires dans le système nerveux central est telle qu'elles leur permettent de constituer un réseau tridimensionnel qui assure le maintien des structures cérébrales et leur organisation. Outre ce rôle de support, les astrocytes participent aussi à la neurotransmission en agissant sur la plasticité des communications neuronales. Enfin, ces cellules gliales jouent un rôle important dans la dépression et la réponse antidépressive. Par exemple, une diminution de la densité des astrocytes a été décrite dans le système limbique de patients déprimés, mais aussi dans des modèles animaux de dépression. Par ailleurs, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine sont la classe d'antidépresseur la plus prescrite, mais 50% des patients déprimés ne répondent pas correctement à ce type de traitement. De plus, même chez les répondeurs, l'action thérapeutique n'apparaît qu'après 2 à 4 semaines de traitement. Ces données montrent la nécessité d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Ce projet a pour objectif d'explorer la possibilité d'utiliser le réseau astrocytaire cérébral comme cible de nouveaux médicaments antidépresseurs, en particuliers chez les patients souffrant de troubles cognitifs associés à une dépression majeure. Nous nous intéresserons en particulier aux communications intercellulaires directes de ces réseaux étendus formés par de nombreux canaux jonctionnels, dont les protéines constitutives sont les connexines. Seule une recherche intégrée sur animaux vivant permet d'approcher les processus physiopathologiques conduisant à la dépression et d'étudier les possibilités thérapeutiques. La souris est choisie pour cette étude car s'est actuellement l'espèce chez laquelle les gènes d'intérêt peuvent être invalidés de façon routinière. Cette recherche expérimentale sera donc réalisée en utilisant des modèles de souris invalidées pour le gène de la connexine 43 qui nous permettront d'évaluer l'impact de ces délétions sur les effets comportementaux et électrophysiologique d'un traitement à la corticostérone (modèle de dépression) administré seul ou en association avec un antidépresseur. Ces traitements pharmacologiques seront administrés chez 2 lignées de souris, les Cx43fl/fl (lignée mutante) et les Cx43wt/wt (lignée contrôle sauvage) pour comparaison. Pour minimiser le temps nécessaire, et donc le nombre de souris, à la mise au point des tests, nous utiliserons dans un premier temps une lignée commerciale, les C57BL/6, en raison de leur facilité d'obtention. En effet, les Cx43wt/wt sont mises en reproduction en même temps que les Cx43fl/fl et doivent donc être utilisées simultanément. En fonction des premiers résultats, le nombre pourra être revu à la baisse. Un nombre total de 360 souris sera utilisé, soit 144 de chacune des lignées Cx43fl/fl et les Cx43wt/wt et 72 C57BL/6. Quatre types de traitements seront testés : la corticostérone seule, l'antidépresseur seul, l'association des deux et des contrôles sans traitement. L'état dépressif et la mémoire seront évalués aux niveaux comportemental et électrophysiologique et les expériences d'électrophysiologie pourront se faire sur les souris ayant servi à l'évaluation comportementale. Ceci limite au final le nombre nécessaire d'animaux. Les plans expérimentaux tenant compte de la variabilité interindividuelle prévoient l'utilisation minimum de 12 souris par groupes selon le test statistique PS de Dupont et Plummer.

4731. La résistance bactérienne aux antibiotiques est une menace majeure pour la santé publique. En particulier, les taux d'incidence des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (EBLSE) ont beaucoup augmenté en France depuis le début des années 2000. La densité d'incidence d'EBLSE est d'environ 0,62 cas pour 1 000 jours d'hospitalisation (JH)

dans les hôpitaux et celle de *Klebsiella pneumoniae* BLSE de 0,15/1 000 JH en France (x 8 depuis 2007 ; Données InVS – Réseau BMR Raisin). La proportion de souches résistantes aux céphalosporines de 3ème génération (C3G) parmi les souches responsables de bactériémies à *K. pneumoniae* est d'ores et déjà plus élevée dans certains pays de la zone Europe.

La situation dans le reste du monde est tout aussi alarmante avec une prévalence parmi les souches de *K. pneumoniae* BLSE très élevée en Asie du Sud-Est (Thaïlande 40%), sous-continent Indien (Inde 70%) et Amérique Latine (Guatemala 66%, Chili 58%). L'émergence des EBLSE compromet l'efficacité de l'antibiothérapie probabiliste d'infections communautaires et nosocomiales à point de départ urinaire ou digestif. Ainsi, l'émergence de la multi-résistance au sein de ces espèces nous confronte au risque d'impasse thérapeutique. Les infections à *K. pneumoniae* BLSE échappent aux schémas thérapeutiques classiques des infections graves à entérobactéries qui reposent sur les C3G, les fluoroquinolones et les aminosides. De ce fait, le traitement des infections documentées à *K. pneumoniae* BLSE tend à intensifier l'utilisation des carbapénèmes. Pourtant, l'augmentation de l'utilisation des carbapénèmes expose en retour au risque d'émergence de résistance à ces antibiotiques et en particulier d'émergence d'entérobactéries productrices de carbapénémases, béta-lactamases qui inactivent presque toutes les béta-lactamines. Les infections causées par ces bactéries sont alors grevées d'une mortalité élevée.

De par le nombre et la diversité des bactéries qu'il héberge, le microbiote intestinal est un important réservoir de gènes de résistance. On peut ainsi définir le résistome intestinal comme l'ensemble des gènes de résistance aux antibiotiques présents au sein du microbiote intestinal d'un individu donné à un temps donné. Chaque administration d'antibiotique va modifier la composition du microbiote digestif et favoriser l'émergence des souches d'EBLSE en sélectionnant différents types de résistances qui sont présentes au sein du microbiote intestinal. En effet, ces bactéries résistantes sont présentes avant que l'antibiotique ne soit administré, en quantité plus ou moins variable, pas forcément détectable d'ailleurs. À la faveur de la prise d'antibiotiques, ces bactéries seront retrouvées en grandes quantités, pourront devenir dominantes, entraînant un risque de transmission plus important. Ainsi, le microbiote intestinal est le siège privilégié de sélection et du portage d'EBLSE. Cependant, la capacité relative des diverses bétalactamines – et en particulier de la ceftriaxone et du cefotaxime qui diffèrent par leurs propriétés pharmacocinétiques et en particulier leur élimination digestive à favoriser le portage digestif d'EBLSE et sa persistance ne sont à ce jour pas clairement établies. Ce point est d'autant plus crucial que ces deux antibiotiques présentent un spectre très large d'indication. De même, l'influence de la posologie et de la durée d'exposition à ces antibiotiques sur l'acquisition d'un portage d'EBLSE restent à explorer.

Objectif principal de l'étude :

Comparer la capacité de la ceftriaxone, du cefotaxime et du ceftobiprole à modifier la composition du microbiote intestinal et à favoriser le portage digestif et la persistance d'EBLSE dans un modèle murin.

Objectifs secondaires :

- a. Evaluer la relation entre la dose de ceftriaxone et la capacité d'implantation d'EBLSE.
- b. Evaluer la relation entre la durée d'exposition à la ceftriaxone et la capacité d'implantation d'EBLSE.
- c. Etudier la pharmacocinétique de la ceftriaxone, du cefotaxime (et métabolite) et du ceftobiprole.

Le nombre de souris nécessaires à la réalisation de l'étude est de 195. Ce sont des souris SWISS femelles de 6 semaines de vie (25-28 g).

Cette étude sera menée en appliquant la règle des 3R : Réduire au maximum le nombre de souris, Raffiner en mettant en place des points limites et Remplacer au maximum l'utilisation des animaux. En effet, le nombre de souris a été réduit au minimum (n=5 par temps de prélèvements pour la détermination de la pharmacocinétique de la ceftriaxone, cefotaxime et du ceftobiprole ; n=15 par groupe pour la détermination du portage d'EBLSE) afin de garder une analyse statistique fiable. Le bien-être animal est monitoré pluri quotidiennement durant toute la durée de l'étude. Si un animal présente des signes de souffrance, il sera euthanasié après anesthésie. Enfin l'utilisation animale est indispensable pour cette étude puisque aucun modèle in vitro ne serait satisfaire la complexité d'un système digestif.

4732. De nos jours, la compréhension des mécanismes permettant au cerveau de maintenir ses fonctions est la cible de toutes les attentions. Comprendre les liens entre l'activité neuronale et l'homéostasie énergétique est importante pour élucider les mécanismes permettant de pourvoir à la forte demande énergétique des neurones lors de l'activation cérébrale. Si le lactate fût longtemps considéré comme un simple déchet métabolique, désormais de récents travaux in-vitro et ex-vivo ont montrés son implication dans le métabolisme neuronal. Notamment, l'hypothèse d'une utilisation du lactate astrocytaire en tant que substrat oxydatif pour les neurones lors de l'activation cérébrale a été avancée. Afin vérifier cette hypothèse in-vivo, le métabolisme cérébral de rongeurs (sain ou génétiquement modifiés) sera étudié par spectroscopie RMN du 13C et du 1H afin d'obtenir une réponse claire sur l'utilisation préférentielle du glucose ou du lactate par les neurones lors de l'activation cérébrale, in vivo et ex-vivo. Au cours de ce projet, la stimulation neuronale sera obtenue par des pulses d'air émis au niveau des vibrisses droites de l'animal, mimant l'activité exploratoire naturelle des vibrisses de l'animal et entraînera l'activation d'une zone corticale bien précise dans l'hémisphère gauche, la zone du cortex somatosensorielle dites des "tonneaux" ou SIBF. Notre projet nécessitant le fonctionnement du cerveau dans son intégrité, ce travail ne peut être réalisé que chez l'animal. L'étude du métabolisme cérébral lors de l'activation neuronale sera menée au maximum par une technique non invasive et indolore : la spectroscopie RMN du 1H et du 13C in-vivo. L'utilisation de cette technique de suivi non- invasif du métabolisme cérébral permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'étude.

Afin d'aller plus loin dans l'analyse du métabolisme cérébral et dans la compréhension des voies métaboliques mises en jeu, des perfusions de substrats cérébraux (glucose, lactate) enrichis en 13C seront réalisées. A l'issue de la perfusion, les animaux seront rapidement euthanasiés. Les zones cérébrales activées ainsi que les zones controlatérales seront ensuite prélevées et analysées par spectroscopie RMN HRMAS, technologie de pointe permettant d'augmenter considérablement la détection du signal et permet

donc de limiter de façon importante le nombre d'animaux utilisés. Une modélisation mathématique de l'utilisation du substrat sera développée pour mettre en évidence une utilisation préférentielle de l'un de ces substrats lors de l'activation neuronale.

Dans cette étude, chaque animal sera son propre contrôle dans la mesure où l'activation est unilatérale, permettant une réduction du nombre d'animaux utilisés. Ainsi, au total, 224 rats et 144 souris au maximum seront utilisés pour cette étude. Ce projet étant le fruit d'un travail collaboratif, l'étude débutera sur des rats génétiquement modifiés par une injection ciblée de siRNA (vectorisés par des adénovirus) dans la structure d'intérêt.

Les animaux sont élevés en cage enrichie et des points limites précoces sont mis en place. Une surveillance régulière des animaux sera mise en place tout au long de la procédure afin de pouvoir réagir rapidement lorsque l'animal présente un état non-satisfaisant comme des signes de stress tels que poils hérissés et/ou claquement de dents. La souffrance pourra ainsi être rapidement détectée et soulagée par mise à mort de l'animal.

4733. Notre projet propose d'étudier les voies anatomiques qui connectent les noyaux de l'amygdale étendue à la moelle épinière par le bulbe rostro-ventral (BRV) et de connaître leurs rôles dans la transmission nociceptive en condition contrôle et de douleur chronique inflammatoire. En effet, les relations entre le stress/anxiété contrôlées par l'amygdale étendue et les sensations de douleurs sont connues. En condition de stress aigu, la douleur est atténuée (analgésie induite par le stress). D'autre part, le BRV est connu pour contrôler la transmission douloureuse dans la moelle épinière. En revanche, on connaît mal les connexions entre l'amygdale et le BRV et leurs rôles éventuels dans le contrôle de la transmission douloureuse. Pour cette étude, nous proposons d'utiliser des souris de la souche sauvage C57BL6. Dans un premier temps, nous nous proposons, de marquer les voies anatomiques à l'aide de traceur rétrogrades et antérogrades.

Dans un deuxième temps, nous injecterons un virus antérograde contenant la channel rhodopsine (ChR2) dans les structures de l'amygdale étendue rétrogradées précédemment. Une fibre optique sera alors placée au niveau du BRV et nous étudierons les conséquences de l'activation optogénétique de ces zones sur le comportement douloureux et l'activité électrique des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière.

Après comportement et électrophysiologie, les tissus seront récupérés pour identification des neurones infectés par les virus (immunomarquages ou western blot).

Dans notre étude, la réduction du nombre d'animaux est prise en compte tout en conservant une signification scientifique statistique (hétérogénéité inter-individuelle), le nombre de souris utilisé dans chacun des groupes expérimentaux ne dépassera pas ainsi 15 animaux par groupe. La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation de 140 souris. Le recours au modèle animal est indispensable car ce projet nécessite une évaluation comportementale.

Pour les procédures où cela est nécessaire, un antalgique sera donné. Les animaux seront surveillés quotidiennement jusqu'à la fin de l'expérimentation.

4734. La réglementation en vigueur concernant la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques) requiert que le personnel soit compétent. Le personnel de notre institut suit les formations théoriques obligatoires. Afin de compléter cette formation, nous offrons à nos nouveaux arrivants ainsi qu'au personnel souhaitant maintenir ses compétences techniques, la possibilité de réaliser les techniques d'administration ou de prélèvements sanguins faits en routine dans nos animaleries.

Cette formation continue permet ainsi à nos techniciens d'être compétents et de réaliser l'ensemble des projets de l'institut dans les meilleures conditions pour les animaux. L'ensemble de nos projets se déroulant sur animaux vivants, il ne nous est pas possible de réaliser des formations autrement chez la souris.

Par ailleurs, afin de réduire au minimum le nombre de souris utilisées, dès que possible, les animaux servant aux formations proviendront d'autres projets terminés et de sévérité légère à modérée. Sachant que les animaux pourront faire un maximum de 3 procédures, un maximum de 1100 animaux sera nécessaire par an pour assurer la formation continue et le maintien de compétences de l'ensemble du personnel soit 5500 animaux sur toute la durée du projet.

Aucun dommage particulier n'est attendu au cours de ces formations, les procédures étant classées légères. De plus, les animaux seront observés quotidiennement afin de s'assurer de leur bon état général et toute procédure potentiellement stressante sera réalisée sous anesthésie générale afin de préserver le bien-être animal.

4735. L'habénula latérale est une structure cérébrale dont l'implication dans plusieurs types de mémoire (mémoire spatiale de référence, mémoire de travail et mémoire émotionnelle) pourrait dépendre de sa capacité à relayer vers d'autres régions cérébrales des informations prenant leur origine dans le cortex préfrontal. Ce projet a pour but d'étudier la contribution de la voie cortex préfrontal – habénula latérale à ces différents types de mémoire, chez le Rat, en utilisant une technique pharmacogénétique (DREADD, pour «Designed Receptors Exclusively Activated by Designed Drugs»). Cette technique permet d'inactiver, par une simple injection périphérique, les neurones situés dans une structure cérébrale d'intérêt ; les effets obtenus sont transitoires et, l'injection pouvant être réalisée à plusieurs reprises, plusieurs tests comportementaux peuvent être réalisés. Pour ce faire, une construction virale doit d'abord être injectée, sous anesthésie générale, dans cette structure cérébrale. Dans le cadre de ce projet, les structures cérébrales ciblées seront le cortex préfrontal et/ou l'habénula latérale et les effets de leur inactivation seront évalués dans des tests comportementaux évaluant la mémoire, l'activité locomotrice, l'anxiété et la coordination sensorimotrice. Les

mêmes rats pourront être testés dans les différentes situations comportementales ; cela réduira de fait considérablement le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation d'un projet équivalent dans ses objectifs (i.e., inactivation transitoire d'une région cérébrale particulière) mais utilisant la technique plus traditionnelle de microinjection intracérébrale, cette dernière, lorsqu'elle est répétée, étant susceptible de léser les neurones de la région ciblée. En plus de son caractère fondamental, ce projet participera à la validation préclinique de stratégies géniques visant à contrôler l'activité neuronale dans le cadre de maladies génétiques ou neurodégénératives. Ce projet nécessitera l'utilisation de 90 rats. Règle des 3R. Réduction : le nombre d'animaux par groupe est calculé au plus juste des prérequis des analyses statistiques, ces dernières étant effectuées à l'aide de statistiques paramétriques; de plus, les mêmes rats seront testés dans plusieurs situations comportementales afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de ce projet. Raffinement : le choix des tests a été guidé par leur validité dans le domaine et le choix de l'espèce - Rat par son adaptation naturelle à réaliser les tests avec un minimum de stress ; de plus, tout sera mis en œuvre pour préserver le bien-être des animaux lors de la procédure chirurgicale réalisée sous anesthésie générale (couverture chauffante, administration d'un analgésique local, d'un antidouleur et d'un antibiotique) et lors de la phase de récupération post-chirurgicale (suivi post-opératoire régulier). Remplacement : dans la mesure où il s'agit ici d'étudier l'impact d'inactivation de structures cérébrales lors de tests comportementaux mettant en jeu des capacités de mémorisation, il n'est pas possible de recourir à d'autres modèles.

4736. Après le vêlage, l'augmentation de la production laitière et le bilan énergétique négatif des vaches laitières conduisent à une mobilisation des réserves adipeuses qui peuvent nuire à la capacité d'adaptation des animaux, conduire à des problèmes métaboliques et impacter la production et le bien-être des animaux.

Les mécanismes sous-jacents, leur régulation et leur contrôle, les facteurs de variabilité (notamment les différences entre races) restent méconnus.

Dans ce projet, nous chercherons à développer des indicateurs nouveaux du statut nutritionnel (apports énergétiques notamment) et à évaluer les différences entre races de vaches laitières sur les réponses locales et systémiques à un challenge nutritionnel.

L'objectif général est de préciser les mécanismes de régulation du fonctionnement de l'animal, de la glande mammaire et de son influence sur la composition fine du lait tout en recherchant des biomarqueurs accessibles sans geste invasif pour l'animal. Ainsi, nous nous attacherons à comparer les données d'expression obtenues à partir du tissu mammaire et celles obtenues à partir des cellules du lait ou des globules gras. Les biomarqueurs seront recherchés parmi les microARN qui présentent l'avantage d'être stables et dont l'expression est modulée par l'environnement.

Pour atteindre cet objectif, nous utiliserons un total de 30 vaches laitières en lactation, de 3 races différentes. Tous les animaux recevront des aliments conventionnels en élevage. Pour tester les effets d'une variation d'ingestion d'aliment, les vaches recevront un régime dilué en utilisant un aliment encombrant (paille d'orge) pour réduire la densité énergétique du régime, tout en conservant une ingestion à volonté. La durée de cette restriction partielle sera au maximum de 7 jours, et débutera après le pic de lactation. Avant (3 semaines), pendant et après (2 semaines) les 7 jours de restriction partielle, les animaux feront l'objet d'un suivi de la production et de l'ingestion, d'examens sanguins et d'analyses du lait. Des études sur des tissus cibles pertinents (glande mammaire, tissu adipeux et foie) seront effectuées : des prélèvements seront réalisés par biopsies, par du personnel compétent de niveau 2 et en présence d'une personne de compétence niveau 1. L'ensemble des manipulations ne devrait pas excéder 30 minutes. Ces procédures ont déjà fait l'objet d'une demande d'autorisation déposée en 2014 pour un projet précédent (envoi courrier avec AR daté du 24/09/2014).

Les attentes de ce projet sont d'identifier des biomarqueurs qui seront recherchés parmi les microARN. En effet, ces petits ARN non codants présentent l'avantage d'être stables et d'avoir une expression qui peut être modulée par l'environnement.

De plus, l'ambition de ce projet est d'apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes sous-jacents et de développer des stratégies de prévention en identifiant précocement les animaux souffrant de problèmes métaboliques, en particulier pendant des périodes de déficit énergétique, qui sont fréquents pendant la période critique périnatale.

Dans cette étude, nous proposons de faire une comparaison entre trois races du point de vue de leur capacité d'adaptation à un bilan énergétique négatif transitoire, et de développer de nouveaux indicateurs peu ou pas invasifs. L'élaboration de ce projet tient compte du principe des 3R :

- Actuellement, il n'existe malheureusement pas de modèle *in vitro* ni *in silico* pouvant se substituer au modèle animal. Le choix de l'espèce est par ailleurs imposé par l'étude, dont l'objectif est de développer des outils de diagnostic et d'étudier des différences entre races bovines laitières.

- L'utilisation de 3 x 10 vaches laitières est nécessaire du fait de la variabilité individuelle. Ce nombre d'animaux est le minimum nécessaire à l'obtention de données statistiquement représentatives dans l'étude des adaptations physiologiques aux changements nutritionnels, pour lesquels la variabilité individuelle peut être forte.

- Des études antérieures, appliquant des modèles proches de restriction partielle, ont permis d'optimiser la durée et le degré de restriction appliqués dans cette expérimentation, afin d'induire des différences suffisantes entre les régimes tout en préservant le confort de vie des animaux.

Par ailleurs, ce projet sera mis à profit afin de valider des méthodes alternatives d'obtention d'ARN mammaires en utilisant le lait (globules gras du lait) comme source biologique à la place du tissu mammaire : cette méthode alternative est nouvelle et il faut vérifier son utilisation dans différentes situations afin de valider la représentativité du contenu des globules par rapport à celui de la cellule épithéliale mammaire.

4737. Notre équipe s'intéresse aux fonctions des neurones de l'hippocampe qui permettent la formation de mémoires et comment ces fonctions sont altérées dans la maladie d'Alzheimer. Nous avons pour cela un modèle murin de la maladie. A partir de 5 mois

d'âge, ces souris présentent des marques neuropathologiques typiques de la maladie comme l'accumulation du peptide amyloïde-beta dans le cerveau. Ces souris commencent aussi à exhiber des problèmes dans leur système de communication neuronale et sont moins performantes dans les tâches comportementales qui testent la mémoire. Ces souris représentent donc un bon modèle pour tester des composés pour leurs effets bénéfiques sur ces phénomènes étroitement liés au développement de la pathologie humaine.

Le projet est centré sur l'étude de la valeur thérapeutique d'un composé chimique, le Fingolimod, en analysant si celui-ci prévient les déficits de communication entre neurones et la perte de mémoire dans ce modèle. Ce composé est déjà utilisé en clinique chez l'humain pour le traitement de la sclérose en plaque. Il a donc déjà été validé pour utilisation thérapeutique et ne présente pas d'effets secondaires contraignants. Nous pensons qu'il pourrait être aussi bénéfique pour le traitement de la maladie d'Alzheimer car il augmente de façon significative les niveaux d'une protéine, le Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), dans le cerveau. Or, plusieurs études suggèrent qu'augmenter BDNF dans le cerveau pourrait protéger les neurones dans le contexte de la maladie d'Alzheimer.

Dans ce projet, nous allons, dans un premier temps, traiter des souris saines avec plusieurs doses de Fingolimod de façon chronique par injection intra-péritonéale et nous allons quantifier la quantité de BDNF pour vérifier que ce traitement augmente bien les niveaux de BDNF dans le cerveau. Aussi, nous allons analyser comment ce traitement modifie la fonction des neurones sur ces souris contrôles pour établir un niveau de base de l'action de ce composé sur les mesures que nous allons ensuite analyser dans la lignée de souris transgéniques.

Pendant ces expériences, nous allons aussi élever les souris issues de la lignée transgénique APP/PS1 (souche C57Bl6/J), modèle de la maladie d'Alzheimer, qui est présente dans notre institut. Nous utiliserons ensuite la dose la plus adéquate de Fingolimod, comme défini par les analyses chez les souris contrôles, pour traiter ces souris et les contrôles sauvages issus des mêmes portées entre les âges de 5 et 6 mois. Nous analyserons l'impact de ce composé sur les altérations fonctionnelles de l'hippocampe et sur le déclin cognitif, phénomènes déjà décrit chez ces souris à cet âge dans la littérature et par nos collaborateurs avec qui nous exécutons ce projet. Pour cela, après le traitement chronique de fingolimod (ou placebo), nous utiliserons une partie de ces souris pour des analyses ex-vivo de biochimie (évaluation des niveaux de BDNF) et d'électrophysiologie (analyse de la communication entre neurones). Une autre partie de ces animaux seront soumis à des tests de comportement pour évaluer leurs capacités cognitives (plusieurs tests de mémoire).

Ce projet sera conduit sur le modèle souris, un modèle qui reproduit au plus près les caractéristiques de l'activité des neurones du système nerveux central de l'homme ainsi que les propriétés cognitives associées. Ce projet est en accord avec le principe des 3R: 1) Réduire le nombre d'animaux utilisés au maximum : En particulier, pour réduire l'utilisation d'animaux, nous effectuerons, quand cela sera possible, plusieurs tâches cognitives sur les mêmes animaux. 2) Raffiner le suivi des animaux et la façon dont les expériences sont menées pour s'assurer que les animaux souffrent le moins possible : En particulier, nous avons mis en place des grilles de suivi quotidien des animaux pour s'assurer de leur bien-être. Nous avons aussi opté pour des tâches de comportement qui n'engendrent soit aucun inconfort soit un inconfort modéré au maximum pour évaluer leurs capacités cognitives. 3) Remplacer l'expérimentation animale par d'autres techniques chaque fois que cela est possible: Quand cela sera possible, nous réduirons l'utilisation des animaux en testant nos hypothèses de travail sur lignées cellulaires. Cela sera particulièrement utilisé pour comprendre plus en détail les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'action du Fingolimod.

Nous utiliserons 268 souris pour ce projet : 40 souris C57BL6J pour notre évaluation préliminaire du composé fingolimod sur les niveaux de BDNF et sur la fonction des neurones, et 228 souris issues de l'élevage de souris génétiquement modifiées (APP/PS1) pour étudier les effets bénéfiques de ce composé sur les altérations de la fonction des neurones et sur la perte de mémoire déjà caractérisé chez ce modèle murin de la maladie d'Alzheimer. Le nombre d'animaux utilisés a été calculé en considérant 1/ le nombre d'expériences nécessaires planifiées ; 2/ la variabilité expérimentale des paramètres étudiés pour chaque type d'expérience, afin d'obtenir une puissance statistique suffisante (>80%). Cette variabilité expérimentale a été estimée d'après des expériences similaires préalablement effectués dans notre laboratoire ou d'après des études d'autres laboratoires publiées dans des revues internationales à comité de lecture. La puissance statistique sera régulièrement réévaluée afin de réduire les effectifs de souris utilisés autant que possible. L'utilisation de souches sauvages et transgéniques de souris est due aux besoins expérimentaux spécifiques. La dimension des colonies de souris génétiquement modifiées sera maintenue au minimum.

4738. La grippe est une pathologie respiratoire causée par le virus Influenza. Elle peut entraîner des symptômes modérés à sévères pouvant conduire à des complications et à la mort chez les personnes à risque, dont les patients âgés et les jeunes enfants.

La grippe saisonnière, résulte de l'infection par un virus humain chez l'Homme et la grippe aviaire se réfère à une maladie causée par un virus aviaire chez l'oiseau. On parlera de grippe pandémique, lorsqu'un nouveau virus non-humain (par exemple aviaire) acquière la capacité d'infection humaine et de transmission interhumaine.

Le meilleur moyen de prévenir la grippe est la vaccination. Le virus étant en permanente modification, il est nécessaire de se faire vacciner chaque année.

Le but de ce projet est de développer un vaccin universel contre la grippe, qui éviterait une vaccination annuelle.

Dans un premier temps, des formulations vaccinales ont été développées et seront testées in vitro. Avant de pouvoir faire l'objet de tests chez l'Homme, l'efficacité et l'innocuité des formulations vaccinales doivent être testées chez l'animal, en accord avec la directive sur les vaccins Influenza (EMA/CHMP/VWP/457259/2014).

Ce projet se déroulera en 3 parties :

1. Etude d'immunogénicité chez la souris (Partie 1 du projet). Cette partie du projet permettra de déterminer quelles formulations vaccinales présélectionnées in vitro sont capables d'induire une réponse immunitaire humorale (production d'anticorps) et cellulaire (production de cellules protectrices). Elle permettra également de déterminer la dose et la voie d'injection permettant d'obtenir la meilleure réponse immunitaire.

2. Mise au point de l'infection grippale. L'étude de protection devra être précédée de la mise au point de l'infection par la grippe chez la souris et le furet. Cela permettra de déterminer la dose infectieuse virale et le temps d'infection nécessaire pour obtenir une réponse inflammatoire et des symptômes grippaux suffisamment représentatifs 3. Etude de protection. Cette partie du projet permettra de déterminer si les formulations vaccinales capables d'induire une réponse immune sont également capables de protéger efficacement contre le virus de la grippe. Dans ce projet, l'étude de protection sera réalisée dans un premier temps chez la souris, puis la capacité protectrice du ou des meilleurs candidats vaccins sera validée chez le furet. En effet, la souris est un modèle couramment utilisé pour l'étude de la grippe car il dispose de nombreux outils biologiques (anticorps, protéines...) permettant l'étude de la réponse immune. En revanche, les souris ne sont pas des hôtes naturels de la grippe et par conséquent, les souches de virus utilisées pour l'étude de protection doivent avoir été adaptées à la souris pour améliorer leur capacité à infecter les cellules pulmonaires murines. De plus, certains signes cliniques de la grippe ne sont pas observés chez la souris, tels que les éternuements et écoulements nasaux. Le furet est le modèle le mieux adapté à l'étude de la grippe car ces animaux peuvent être infectés par des virus humains et aviaires sans adaptation préalable et présentent des symptômes cliniques similaires à l'Homme (notamment écoulement nasal et éternuement).

Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation va dépendre du nombre de formulations vaccinales à tester et des résultats obtenus. Le projet pourra comporter jusqu'à 340 souris au maximum et 101 furets, soit 441 animaux au total. Les furets ne seront utilisés que si une des formulations vaccinales testées permet d'obtenir une réponse immunitaire durant l'étude d'immunogénicité et une protection à l'encontre du virus de la grippe chez la souris.

Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : Le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'immunogénicité et de protection contre la grippe ne peut se faire que sur un organisme vivant entier. Néanmoins les formulations vaccinales seront sélectionnées au préalable *in vitro* pour limiter le nombre de candidats à tester.

Raffinement : Les animaux seront hébergés en groupe dans un environnement enrichi et seront observés quotidiennement par le personnel de l'animalerie.

Les souris seront hébergées dans des cages comportant des boîtes à œufs en carton et du papier absorbant leur permettant de réaliser des nids ainsi que de petites briquettes en bois.

Les furets sont hébergés dans des cages comportant 3 compartiments reliés entre eux par des tubes en PVC permettant le passage des animaux et donc leur permettant de contrôler leurs interactions sociales. De plus, les furets disposeront de hamacs et de jeux tels que des balles.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

4739. Chez les sujets en bonne santé, les périodes de récupération consécutives à des traumatismes ou des maladies nécessitent souvent une période d'immobilisation locale (plâtrage) ou générale (alitement). L'inactivité physique qui en résulte conduit à une perte de protéines musculaires rapide et à un déclin de la fonction mitochondriale, qui est un processus clé pour maintenir le statut énergétique. Ceci entraîne des adaptations métaboliques du muscle pour puiser dans ses réserves et répondre à la demande accrue en énergie, se traduisant *in fine* par une fonte musculaire et ses conséquences (i.e. perte d'autonomie, retard de récupération, coûts de prise en charge élevés, ...).

Préserver la masse musculaire lors des périodes d'inactivité physique et améliorer la récupération musculaire est donc un enjeu majeur de santé publique. Pour cela, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués est nécessaire pour envisager la mise en place de stratégies visant à préserver la masse musculaire et par conséquent l'autonomie des individus.

L'objectif général est de mieux comprendre les altérations mitochondriales lors de l'immobilisation et la récupération qui s'ensuit, dans la perspective de pouvoir définir des stratégies adaptées pour lutter contre les pertes de protéines musculaires.

Le recours à l'expérimentation animale permet d'étudier l'ensemble des mécanismes à l'origine de la perte de muscle en restant à l'échelle de l'organisme entier. Il existe plusieurs modèles de rats qui permettent de simuler la perte de muscle induite lors de l'immobilisation : la dénervation, la suspension par le train arrière et le plâtrage. Le modèle d'immobilisation par plâtrage est proche des situations d'immobilisation rencontrées chez l'homme (plâtrage, alitement) et réversible ce qui permet d'évaluer la capacité de récupération des rats après retrait du plâtre. Ce modèle est largement utilisé dans de nombreux laboratoires (et par de nombreuses équipes de recherches dans le monde) depuis plusieurs années, est très bien connu du point de vue physiopathologique, et est bien maîtrisé dans notre équipe de recherche.

Des travaux antérieurs ont montré que la récupération musculaire suite à 8 jours d'immobilisation chez le rat diffère selon le type de muscle considéré. L'atrophie musculaire induite par l'immobilisation dans le muscle gastrocnemius s'arrête dès le déplâtrage alors que celle du muscle tibialis anterior s'aggrave fortement dans les premiers jours suivant la remobilisation. Les mitochondries ont de nombreux rôles, le principal étant la production d'énergie indispensable à de nombreux processus biologiques. Lors de l'immobilisation, des altérations mitochondriales (diminution de leur abondance, augmentation du stress oxydant, diminution de leur biogenèse, ...) sont observées dans le muscle gastrocnemius. Ces aspects ont été très peu, voire pas caractérisés dans le muscle tibialis anterior d'une part, et l'étude de la dynamique mitochondriale ne concerne pas les périodes de récupérations d'autre part. Pourtant, nos données indiquent des différences de comportements entre le muscle gastrocnemius et tibialis anterior principalement pendant la récupération suite à l'immobilisation.

Ce projet vise à évaluer les conséquences de l'immobilisation sur l'intégrité mitochondriale dans ces deux muscles présentant des processus d'adaptation différents pendant l'immobilisation et la récupération. Cet objectif permettra de mieux définir des stratégies d'intervention adaptées pour préserver la fonction mitochondriale de façon optimale dans chacun des muscles et par conséquent de préserver la masse musculaire en réponse à une période d'inactivité physique.

Un total de 50 rats sera utilisé dans cette expérimentation. Les animaux seront placés en adaptation à un hébergement en cage individuel pendant 3 semaines, et seront ensuite plâtrés pendant 8 jours sur une des deux pattes arrière. Au terme de la période d'immobilisation les rats seront soit sacrifiés soit déplâtrés et placés en récupération pendant 7 jours. Pendant l'immobilisation, les animaux réduisent d'environ 15% leur prise alimentaire. Nous incluons donc 2 groupes de rats pair-fed afin de pouvoir comparer les effets de l'immobilisation et/ou de la récupération musculaire indépendamment de modifications de la prise alimentaire.

Nous aurons donc 5 groupes de 10 rats.

- 10 rats non plâtrés (I0)
- 10 rats plâtrés pendant 8 jours (I8)
- 10 rats plâtrés pendant 8 jours et ensuite placés en récupération pendant 7 jours (R7)
- 10 rats non plâtrés pair fed des animaux immobilisés (PF-I8)
- 10 rats non plâtrés pair fed des animaux immobilisés et placés ensuite en récupération (PF-R7)

Les rats seront suivis au niveau de leur poids, de leur prise alimentaire, et de leur comportement. Il s'agit de méthodes non invasives. Un certain nombre de critères physiologiques et comportementaux sont définis afin de s'assurer de l'absence de souffrance des animaux pendant le protocole.

Le projet sera réalisé selon la règle des 3Rs explicitée dans le projet en accord avec la réglementation européenne 2010/63/UE.

4740. Après le vêlage, l'augmentation de la production laitière et le bilan énergétique négatif des vaches laitières conduisent à une mobilisation des réserves adipeuses qui peuvent nuire à la capacité d'adaptation des animaux, conduire à des problèmes métaboliques et impacter la production et le bien-être des animaux.

Les mécanismes sous-jacents, leur régulation et leur contrôle, les facteurs de variabilité (notamment les différences entre races) restent méconnus.

Dans ce projet, nous chercherons à développer des indicateurs nouveaux du statut nutritionnel (apports énergétiques notamment) et à évaluer les différences entre races de vaches laitières sur les réponses locales et systémiques à un challenge nutritionnel.

L'objectif général est de préciser les mécanismes de régulation du fonctionnement de l'animal, de la glande mammaire et de son influence sur la composition fine du lait tout en recherchant des biomarqueurs accessibles sans geste invasif pour l'animal. Ainsi, nous nous attacherons à comparer les données d'expression obtenues à partir du tissu mammaire et celles obtenues à partir des cellules du lait ou des globules gras. Les biomarqueurs seront recherchés parmi les microARN qui présentent l'avantage d'être stables et dont l'expression est modulée par l'environnement.

Pour atteindre cet objectif, nous utiliserons un total de 30 vaches laitières en lactation, de 3 races différentes. Tous les animaux recevront des aliments conventionnels en élevage. Pour tester les effets d'une variation d'ingestion d'aliment, les vaches recevront un régime dilué en utilisant un aliment encombrant (paille d'orge) pour réduire la densité énergétique du régime, tout en conservant une ingestion à volonté. La durée de cette restriction partielle sera au maximum de 7 jours, et débutera après le pic de lactation. Avant (3 semaines), pendant et après (2 semaines) les 7 jours de restriction partielle, les animaux feront l'objet d'un suivi de la production et de l'ingestion, d'examens sanguins et d'analyses du lait. Des études sur des tissus cibles pertinents (glande mammaire, tissu adipeux et foie) seront effectuées : des prélèvements seront réalisés par biopsies, par du personnel compétent de niveau 2 et en présence d'une personne de compétence niveau 1. L'ensemble des manipulations ne devrait pas excéder 30 minutes. Ces procédures ont déjà fait l'objet d'une demande d'autorisation déposée en 2014 pour un projet précédent (envoi courrier avec AR daté du 24/09/2014).

Les attentes de ce projet sont d'identifier des biomarqueurs qui seront recherchés parmi les microARN. En effet, ces petits ARN non codants présentent l'avantage d'être stables et d'avoir une expression qui peut être modulée par l'environnement.

De plus, l'ambition de ce projet est d'apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes sous-jacents et de développer des stratégies de prévention en identifiant précocement les animaux souffrant de problèmes métaboliques, en particulier pendant des périodes de déficit énergétique, qui sont fréquents pendant la période critique périnatale.

Dans cette étude, nous proposons de faire une comparaison entre trois races du point de vue de leur capacité d'adaptation à un bilan énergétique négatif transitoire, et de développer de nouveaux indicateurs peu ou pas invasifs.

L'élaboration de ce projet tient compte du principe des 3R :

- Actuellement, il n'existe malheureusement pas de modèle *in vitro* ni *in silico* pouvant se substituer au modèle animal. Le choix de l'espèce est par ailleurs imposé par l'étude, dont l'objectif est de développer des outils de diagnostic et d'étudier des différences entre races bovines laitières.

- L'utilisation de 3 x 10 vaches laitières est nécessaire du fait de la variabilité individuelle. Ce nombre d'animaux est le minimum nécessaire à l'obtention de données statistiquement représentatives dans l'étude des adaptations physiologiques aux changements nutritionnels, pour lesquels la variabilité individuelle peut être forte.

- Des études antérieures, appliquant des modèles proches de restriction partielle, ont permis d'optimiser la durée et le degré de restriction appliqués dans cette expérimentation, afin d'induire des différences suffisantes entre les régimes tout en préservant le confort de vie des animaux.

Par ailleurs, ce projet sera mis à profit afin de valider des méthodes alternatives d'obtention d'ARN mammaires en utilisant le lait (globules gras du lait) comme source biologique à la place du tissu mammaire : cette méthode alternative est nouvelle et il faut vérifier son utilisation dans différentes situations afin de valider la représentativité du contenu des globules par rapport à celui de la cellule épithéliale mammaire.

4741. Chez l'homme, les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) sont nombreuses (maladie de Crohn, rectocolite hémorragiques) et montrent une forte dérégulation de l'homéostasie immunitaire de l'intestin. L'augmentation de l'incidence des MICI et la nature chronique et invalidante de ces maladies soulignent l'importance d'études visant à mieux comprendre les processus qui sous-tendent le développement de ces pathologies. Ici, nous proposons d'étudier les mécanismes en jeu pour le maintien de l'équilibre immunitaire intestinal à l'aide de différents modèles murins.

La réponse anticorps de classe A (IgA) est une des caractéristiques principales de la réponse immunitaire muqueuse (intestin, peau, muqueuse utérine, etc) et en particulier un déterminant majeur du maintien de l'homéostasie intestinale. En particulier, la sécrétion d'IgA joue un rôle essentiel pour le maintien d'une flore commensale riche et stable et la neutralisation des agents pathogènes présent dans l'intestin. Cette réponse anticorps est principalement initiée au niveau des muqueuses et met en jeu de nombreux facteurs cellulaires et moléculaires. Cette étude vise à étudier les mécanismes impliqués dans la régulation de l'homéostasie intestinale par la génération de réponse IgA in vivo.

Nous souhaitons ici procéder à des immunisation sur différents modèles de souris génétiquement modifiées nous permettant de tester nos hypothèses in vivo et in vitro. Plus précisément nous souhaitons : 1/ regarder la génération de réponses IgA en réponse aux antigènes administrés en comparant différentes voies d'immunisations et 2/ évaluer l'effet de l'inflammation sur ces réponses et leur dérégulation.

Cette étude permettra de disséquer les mécanismes de la mise en place de la réponse IgA ainsi que l'implication relative des différents acteurs cellulaires (cellules dendritiques, lymphocytes T). Plus généralement, cette étude vise à dégager les mécanismes fondamentaux de l'homéostasie intestinale. De plus, la modification de ces mécanismes par l'inflammation mais aussi la capacité de ces phénomènes à rétablir l'homéostasie, sont particulièrement importantes pour comprendre les mécanismes en jeux dans les maladies humaines.

Comme la complexité de l'environnement tissulaire et le réseau complexe de cellules immunitaires impliquées dans ces mécanismes ne peuvent pas être reproduits entièrement in vitro, cette étude nécessite la réalisation d'expériences à l'échelle de l'animal. Cependant, ces immunisations nous permettront aussi de mettre au point un certain nombre de modèles in vitro pour limiter notre dépendance aux modèles animaux (Remplacement).

L'ensemble des souris de ces protocoles expérimentaux seront de plus suivies au moins 2 fois par semaine pour repérer précocement et mettre fin à tout signe de souffrance (Raffinement)

Nous prévoyons donc d'utiliser au maximum 944 souris pour l'ensemble des procédures décrites ce dessous. Par soucis de réduction, nous utiliserons aussi ces animaux pour observer d'autres réponses particulièrement importantes dans le maintien de l'homéostasie intestinales, en particulier les réponses lymphocytaires T.

4742. Le psoriasis est une maladie inflammatoire de la peau d'origine inconnue et non contagieuse, affection dermatologique qui touche 2 à 3 % de la population mondiale, atteignant de manière équivalente les hommes et les femmes.

Le psoriasis en plaques, appelé également psoriasis vulgaris, est la forme la plus courante du psoriasis (plus de 90 % des cas).

Dans sa forme bénigne et typique, le psoriasis se caractérise par des lésions rouges et squameuses du cuir chevelu, des genoux et des coudes, associées à une atteinte des ongles. Dans les cas graves, l'atteinte cutanée peut être généralisée (érythrodermie) et il peut exister des atteintes des articulations. Cette dermatose évolue de façon chronique avec des poussées entrecoupées de périodes de rémissions de durée variable au cours desquelles les lésions sont minimales. Aucun traitement permettant la guérison n'est connu ; le traitement proposé permet uniquement de contrôler l'évolution de la maladie, en permettant la régression transitoire plus ou moins complète des lésions. Le traitement est adapté en fonction de la gravité et du retentissement sur la qualité de vie des patients.

Les causes précises du psoriasis sont inconnues bien que, dans près de 30 % des cas, une prédisposition familiale existe, surtout si des facteurs externes viennent se rajouter. L'épiderme se renouvelle trop rapidement, en seulement quatre à six jours, au lieu des trois semaines habituelles ce qui engendre des inflammations localisées. Les cellules épidermiques s'accumulent à la surface de la peau et forment une couche de pellicules blanches appelées squames. Parfaitement inoffensives, celles-ci ont pourtant le désavantage d'être inesthétiques.

Le but de ce projet est d'étudier les effets du composé 1657, extrait de plante naturelle, sur le traitement de psoriasis induit chez la souris BALB/c. Nous utiliserons 40 souris femelles BALB/c âgées de 6 semaines pour ce projet.

Les 40 souris BALB/c seront réparties en 5 groupes de 8 souris avec 1 groupe sans induction de psoriasis traité avec une pommade neutre (SIP-PN) et 4 groupes avec induction de psoriasis traités respectivement avec une pommade neutre (AIP-PN), avec une pommade contenant 1% de composé 1657 (AIP-1657/1%), avec une pommade contenant 2% de composé 1657 (AIP-1657/2%), et avec la crème Dermoval® (AIP-Dermoval), référence pharmaceutique utilisée pour le traitement du psoriasis chez l'Homme. Les procédures appliquées seront a) le rasage des poils sous anesthésie gazeuse, b) l'application cutanée pendant 9 jours (J1 à J9) d'une pommade contenant de l'Imiquimod, agent inducteur de psoriasis, pour les groupes AIP et d'une pommade neutre pour les groupes SIP, c) traitement des animaux par application cutanée des différentes pommades et crème testées pendant 4 jours (J6 à J9), d) l'évaluation comportementale de animaux dans un champ ouvert (open-field) pendant 10 minutes 24 heures après le dernier traitement (J10) avec enregistrement vidéo (vidéo-tracking) pour la quantification de différents paramètres, e) un prélèvement de sang avant l'euthanasie des animaux pour le dosage de biomarqueurs (J10). Des analyses histologiques seront également effectuées sur des prélèvements cutanés effectués sur l'ensemble des animaux.

Les animaux seront placés à 2 par cage (18.9 x 29.6 x 12.8 cm) pour l'ensemble des groupes expérimentaux, en cycle de lumière inversé pour réaliser l'évaluation comportementale pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des fibres de coton « Cell Best SP » seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Il n'existe pas de modèles in vitro permettant l'évaluation comportementale de composés (Remplacement) mais nous utiliserons le nombre minimum d'animaux mais suffisant pour mettre en évidence des différences significatives selon notre expérience de ce modèle de psoriasis et dans nos conditions expérimentales (Réduction).

Des observations quotidiennes seront effectuées et l'atteinte des points limites définis (perte de poids de plus de 20%, affaiblissement (cachexie), convulsions, tremblements, paralysie, vocalises...) entraînera la sortie d'étude et l'euthanasie des animaux selon les recommandations éthiques.

Compte-tenu de l'augmentation constante de l'incidence du psoriasis dans la population européenne et mondiale, le développement de ce modèle d'étude permettant ensuite d'évaluer des composés en développement présente un enjeu socio-économique certain afin de développer des traitements efficaces contre cette pathologie chez l'Homme.

4743. L'anxiété est un trouble du comportement fréquent chez le chat vivant en milieu clos (chat d'appartement) puisque 54% de ces animaux de compagnie présentent un comportement de type anxieux. Chez le chien, l'anxiété de séparation est également fréquente lorsque les animaux restent seuls la journée en absence de leurs maîtres. Les animaux de compagnie peuvent être traités avec des molécules anxiolytiques pour réduire les symptômes. Toutefois, ces médications présentent des problèmes de dépendance, de tolérance et de sevrage. De plus, ces molécules induisent une désinhibition comportementale associée à des comportements agressifs.

La recherche de nouveaux traitements anxiolytiques présentant moins d'effets secondaires est donc nécessaire. C'est dans ce cadre que se situe ce travail.

L'objectif de ce projet est d'évaluer les propriétés anxiolytiques d'une nouvelle préparation alimentaire, contenant un ingrédient actif (produit X), chez le rat utilisé comme modèle du chat et du chien. Les effets anxiolytiques du produit X sont connus, mais son inclusion dans une matrice pourrait en limiter l'efficacité. C'est pourquoi la nouvelle préparation doit être évaluée. Pour cela, 96 rats mâles Wistar d'un poids de 225-250 g seront évalués sur le plan comportemental suite à la consommation du produit X seul ou inclus dans la préparation alimentaire. Les préparations ont été créées pour être appétentes de manière à faciliter la prise de l'ingrédient actif par les animaux.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de technique in vitro permettant d'évaluer les effets antistress d'un traitement. Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum permettant une interprétation scientifique des résultats. Le test utilisé étant stressant et anxiogène pour les animaux, sa durée sera limitée au minimum nécessaire en accord avec les pratiques décrites dans la littérature scientifique.

Le modèle rat est utilisé régulièrement par l'industrie vétérinaire pour évaluer l'efficacité de produits actifs, et le test utilisé est validé et reconnu par la communauté scientifique travaillant sur les tests comportementaux.

Le protocole consiste, après consommation des produits à tester, en la mise en présence de l'animal d'une sonde électrique lui administrant une unique et très faible décharge électrique de 2 mA sur les pattes antérieures. Ensuite, le comportement de l'animal est observé pendant 5 minutes. Un rat stressé va naturellement enfouir la source de stress (la sonde) en la recouvrant de sciure. Un rat non stressé ne portera pas d'attention particulière à la sonde, il retournera volontiers dessus.

96 rats mâles Wistar d'un poids compris entre 225 et 250 g seront utilisés et répartis en 7 groupes de 6 à 15 rats chacun. Les produits testés seront Véhicule par gavage (n = 15), Diazépam par gavage (référence pharmacologique ; n = 15), Produit X par gavage (n=15), consommation spontanée de préparation alimentaire (PA) contrôle puis gavage avec le véhicule (n = 15), consommation spontanée de PA contrôle puis gavage avec le Produit X (n = 15), consommation spontanée de PA contenant le Produit X puis gavage avec le Véhicule (n = 15).

La comparaison des groupes Véhicule et Diazépam permettra de valider le fonctionnement du test avec un anxiolytique de référence.

La comparaison des groupes Véhicule et Produit X par gavage permettra de définir l'efficacité du lot d'ingrédient actif utilisé.

La comparaison des groupes Véhicules et PA contrôle permettra de s'assurer que la consommation de la PA n'entraîne pas de modification du comportement des animaux.

La comparaison des groupes PA contrôle, PA incluant le produit X et PA contrôle avec gavage de produit X permettra d'évaluer si le processus d'inclusion du produit X n'interfère pas avec son efficacité.

Les groupes seront constitués chacun de 15 rats, effectif nécessaire pour une interprétation non ambiguë des résultats du test d'enfouissement défensif conditionné (EDC) avec 6 groupes d'animaux.

Un total de 6 rats supplémentaires sera commandé pour remplacer les animaux qui ne toucheraient pas l'électrode dans les groupes Véhicule, Produits et Diazépam par gavage.

Après une période d'entraînement à la consommation spontanée et rapide des PA, chaque rat sera mis en présence du PA et/ou recevra un traitement par gavage en fonction de son groupe expérimental. Les animaux seront ensuite testés dans l'EDC. Une observation quotidienne des animaux sera effectuée avec le contrôle de l'absence de signes de douleur comme les vocalises, de stress et d'anxiété comme l'isolement et l'agressivité.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets de ces produits sur le stress car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) (remplacement). Le nombre d'animaux est cependant limité au strict minimum afin de garantir la validité et l'interprétation scientifique des résultats (réduction). Les expérimentations sont effectuées selon la réglementation et les recommandations en vigueur afin de limiter au maximum l'impact de l'administration orale et du test comportemental sur l'état de stress des animaux (raffinement).

4744. Domaines et objectifs: Les bactéries du tube digestif protègent la muqueuse intestinale notamment en produisant des peptides antimicrobiens (PAM) ou bactériocines, dirigées contre des bactéries pathogènes intestinales. Dans cette étude, nous nous intéressons à la bactérie du microbiote intestinal *Ruminococcus gnavus* E1 de l'homme et de l'animal. Ces bactériocines, dénommées RumC 1-5, pourraient constituer une nouvelle classe de molécules PAM. Elles pourraient remplacer les antibiotiques classiques et pallier ainsi les phénomènes de multi-résistance aux antibiotiques observés chez l'homme par l'Organisation Mondiale de la Santé. Ce projet tant de recherche fondamentale que de recherche appliquée est important pour la santé de l'homme et des animaux d'élevage utilisés en agroalimentaire comme les volailles et le porc par exemple.

Avantages et dommages attendus : Nous voulons développer une nouvelle stratégie thérapeutique et obtenir de nouvelles molécules, de nature peptidique, à activité antibiotique. Les bactériocines RumC1-5 ne sont produites qu'in vivo, l'utilisation des animaux est donc indispensable pour l'instant. Il nous est impossible à ce jour de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire.

Nous voulons: i/purifier ces bactériocines à partir des fèces et contenus caecaux de rongeurs monocolonisés par *Ruminococcus gnavus* E1 (rats/souris); ii/ les caractériser au niveau biochimique ; iii/ caractériser leur structure; iiiii/synthétiser in vitro des peptides analogues des bactériocines RumC1-5 pour les purifier, les produire en quantité et les utiliser en thérapeutique afin d'éviter toute utilisation ultérieure d'animaux.

Le recours aux animaux est indispensable pour répondre aux questions scientifiques du projet et leur nombre est strictement défini en fonction des besoins statistiques. Les animaux utilisés: Ces bactériocines seront produites à partir de rat et de souris monocolonisés, disponibles dans des animaleries à microbiote contrôlée. Des rongeurs stériles depuis la naissance (axéniques) sont choisis: 1/ 10 rats F344 mâles adultes 2/ 3 souris Balb/c mâles adultes provenant d'élevages autorisés. Ces animaux ont été spécialement élevés à cette fin. La colonisation du tube digestif des animaux stériles se fera par gavage adapté avec la bactérie *Ruminococcus gnavus* E1, à l'animalerie. 109 bactéries/0,5 ml de milieu de culture bactérienne seront utilisés lors du gavage par la sonde intra gastrique. Les rats/souris seront disposés dans des isolateurs distincts. Le nombre d'animaux par cage sera adapté afin d'assurer le confort de vie des animaux. Les animaux seront anesthésiés de façon adéquate puis sacrifiés à la fin de la période de colonisation optimale du tube digestif par la bactérie, soit 10 jours (rats) et 20 jours (souris).

Le nombre minimum d'animaux dans le protocole expérimental a été calculé en fonction de la quantité de peptides que nous avons pu purifier précédemment à partir de contenus caecaux. Nous purifions 10 microgrammes de peptides/rat. 10 rats vont nous permettre d'obtenir 100 microgrammes de peptides afin de réaliser notre étude. Les 3 souris seront utilisées pour réaliser des coupes de colon afin de vérifier la qualité des tissus des animaux consécutivement à la colonisation.

Il est à noter qu'à ce jour les animaux monocolonisés par *R. gnavus* E1 utilisés dans nos travaux précédents n'ont pas présenté de signes visibles de mal être, inconfort ou souffrance.

Les méthodes expérimentales choisies dans ce protocole permettent d'éviter au maximum toute souffrance des animaux. En cas de stress ou de souffrance des animaux, des protocoles d'anesthésie et d'analgésie validés par l'équipe vétérinaire de l'animalerie seront utilisés. Les animaux seront surveillés quotidiennement, hébergés dans des isolateurs stériles et adaptés. Boisson et nourriture seront servies à volonté. Pour réduire la douleur, la souffrance, et l'anxiété, le recours à des points limites et à l'anesthésie à l'isoflurane sont prévus de façon adéquate pour chaque fin de procédure. Les points limites évalués au quotidien par le personnel animalier qualifié seront : prostration, poils hérissés, agressivité non provoquée chez un animal non dérangé (par le bruit, variation de l'intensité lumineuse par exemple) et aussi grattage. Une attention particulière sera donnée au moment du gavage où une fausse route est possible dû à un mauvais gavage même si l'expérimentateur est qualifié. L'animal devra être alors plus régulièrement surveillé et si l'animal est prostré ou mal en point une euthanasie sera prévue. Chaque cage sera enrichie par ajout de sopalain afin que les animaux puissent se confectionner un nid et d'un bâton à ronger.

4745. Le test de suspension caudale est un test de résignation comportementale très largement utilisé en recherche préclinique. C'est un procédé rapide d'évaluation des effets psychotropes de substances médicamenteuses (antidépresseurs, sédatifs...) sur le comportement d'un rongeur essayant de se soustraire à une situation inconfortable. C'est un test simple et rapide (6 minutes), ne provoquant aucune douleur chez l'animal. Le principe repose sur la mesure du temps d'immobilité de l'animal.

Dans le cadre de la recherche préclinique, ce test est couramment utilisé pour mettre en évidence une altération de la sensibilité d'animaux génétiquement modifiés, permettant une détection de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Nous avons développé un système automatisé donnant des résultats proches de la réalité ce qui pourrait permettre d'augmenter la puissance statistique du test et ainsi diminuer les effectifs pour les études futures. Nous souhaiterions le valider à l'aide de substances de référence (validation pharmacologique).

Trois groupes de 12 souris, soit 36 souris, sont nécessaires pour cette validation:

-un groupe contrôle injecté en intra-péritonéale avec le véhicule (NaCl 0.9%)

-un groupe injecté en intra-péritonéale avec un antidépresseur (fluoxetine 20 mg/kg)-un groupe injecté en intra-péritonéale avec un sédatif (diazepam 3 mg/kg)

L'injection unique se fait 30 minutes avant le test.

Le test consiste à suspendre la souris par la queue à l'aide d'un scotch double face pendant 6 minutes.

Les effectifs utilisés pour cette validation correspondent à ceux classiquement utilisés dans notre protocole de test actuel et permettent d'obtenir une puissance statistique adéquate.

Il est possible qu'une étude supplémentaire soit nécessaire dans le cas où aucun effet pharmacologique n'est observé mais cela semble peu probable. Dans ce cas, nous utiliserons un maximum de 72 souris.

Raffiner : notre système pourrait permettre d'augmenter la puissance statistique du test.

Réduire : en augmentant la puissance statistique du test, nous pourrions diminuer les effectifs nécessaires pour les études futures.

Remplacer : il s'agit de valider un test utilisé pour des prestations de service se faisant chez la souris pour nos clients. Ainsi, l'utilisation de la souris est inévitable.

4746. Les gliomes du tronc cérébral (DIPG) sont des tumeurs très agressives exclusivement observées chez l'enfant, le plus souvent diagnostiquée entre 5 et 7 ans. Leur localisation dans une région essentielle du cerveau et leur capacité à infiltrer le tissu adjacent de façon diffuse représentent des obstacles majeurs pour la chirurgie et la radiothérapie, et l'absence de traitement efficace entraîne un taux de survie à deux ans inférieur à 10%. Considérant la complexité du tronc cérébral, qui ne peut être reconstituée in vitro, des études in vivo sont nécessaires pour reproduire la croissance tumorale dans l'environnement naturel. A côté des anomalies génétiques récurrentes récemment identifiées dans les cellules tumorales, des modifications pouvant jouer un rôle important dans les propriétés infiltrantes de ces gliomes ont été détectées dans les cellules non tumorales adjacentes (microenvironnement tumoral). Ces anomalies seront utilisées pour construire des modèles murins destinés à comprendre leur rôle dans les capacités infiltrantes des DIPG. L'hypothèse générale du projet est que les propriétés infiltrantes particulières des DIPG résultent à la fois des altérations des cellules tumorales et des modifications de leur microenvironnement. Notre objectif est d'élucider la contribution du microenvironnement modifié dans le processus d'infiltration tumorale. Les modèles murins seront obtenus à partir d'animaux transgéniques recréant les modifications du microenvironnement des DIPG. Les DIPG étant des tumeurs exclusivement pédiatriques, les anomalies génétiques des cellules tumorales seront donc introduites chez des souris nouveaux-nés au niveau du tronc cérébral avec des vecteurs viraux. Les animaux transgéniques ne présentent pas de symptômes, ceux ayant reçu les vecteurs viraux développeront des tumeurs du tronc cérébral. Les animaux sont régulièrement suivis et seront sacrifiés dès les premiers symptômes anormaux (activité réduite, posture anormale, symptômes neurologiques) pour éviter le développement de tumeurs massives et invalidantes. Les tumeurs se forment sur un côté du tronc cérébral et la région symétrique, sans tumeur, sert de contrôle interne, évitant le recours à des animaux contrôles et limitant ainsi le nombre d'animaux. Ce projet de trois ans utilisera 290 animaux. Il apportera une meilleure compréhension des mécanismes d'infiltration des DIPG en précisant le rôle des mutations dans les cellules tumorales et la contribution des modifications du microenvironnement. Ces données constitueront une base pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, ciblant éventuellement les propriétés du microenvironnement.

4747. Les maladies parasitaires liées aux vers parasites touchent aussi bien l'Homme que les animaux. Parmi ces vers, ceux qui parasitent le tube digestif sont capables de mettre en place une interaction fine avec leur hôte et sont responsables de désordre intestinaux pouvant conduire à la mort des animaux. L'utilisation massive d'antiparasitaires pour contrôler ces maladies a conduit à l'apparition de vers résistants à toutes les molécules disponibles sur le marché dans certaines espèces hôtes. Il est donc urgent de trouver de nouvelles solutions de contrôle de ces vers parasites. Pour cela, nous travaillons sur les mécanismes d'interaction hôte-parasite dans un modèle murin qui dispose de nombreux outils pour caractériser la réponse immunitaire de l'hôte. Pour cela, des souris âgées d'au minimum 5 semaines sont infestées avec un maximum de 200 larves infestantes du ver parasite *Heligmosomoides polygyrus bakeri*. Le cycle de développement est achevé en 10 à 15 jours. De manière à comprendre les régulations de gènes qui interviennent au moment de l'installation du ver et au cours du cycle de développement, le cycle peut être dans certains cas abrégé précocement pour isoler les stades parasitaires précoces ou se poursuivre sur quelques semaines pour réaliser des cultures de parasite à partir des matières fécales dans lesquels les œufs de parasites sont émis (libérés dans lumière du tube digestif après reproduction sexuée des vers adultes). Au cours des cinq années, un maximum de 100 souris sera utilisé. Réduction : un nombre minimal de souris est utilisé à chaque multiplication puisqu'aucune analyse statistique n'est réalisée. Il s'agit simplement d'obtenir suffisamment de vers parasites aux stades nécessaires pour réaliser des analyses moléculaires Raffinement : les souris sont hébergées en portoirs ventilés dans des cages contenant des boîtes d'œufs ou du coton pour enrichir le milieu (leur permettant de réaliser un nid) Remplacement : le ver parasite *Heligmosomoides polygyrus bakeri* est un parasite obligatoire dont le cycle de développement ne peut pas être réalisé in vitro. L'hôte animal est absolument nécessaire pour obtenir un cycle complet du parasite.

4748. Les troubles neuropsychiatriques sont aujourd'hui les premières causes de souffrance et d'handicap à l'échelle mondiale, avec les pathologies cardiovasculaires et les tumeurs cancéreuses. La résistance aux traitements pharmacologiques classiques a mené au développement d'alternatives thérapeutiques, les plus prometteuses étant les méthodes de neurostimulation. Le progrès considérable réalisé dans les domaines de la stimulation magnétique et électrique profonde souffre cependant de limitations techniques (précision ou chirurgie invasive).

Il a été démontré récemment que la stimulation transcrânienne par ultrasons, c'est à dire des ondes mécaniques, permettait de moduler l'activité électrique cérébrale de façon non-invasive et géométriquement précise, outrepassant les limites des méthodes actuelles. L'altération de l'activité de certaines zones cérébrales étant caractéristique des troubles neuropsychiatriques, la stimulation ultrasonore pourrait prendre place dans l'arsenal thérapeutique.

Malgré cet intérêt théorique et certaines études exploratoires, la stimulation ultrasonore n'a encore jamais été utilisée dans des thématiques cliniques. En effet, les différents paramètres requis pour provoquer une telle stimulation cérébrale sont encore peu étudiés.

Dans un projet précédent qui permit d'évaluer la faisabilité de cette technique chez la souris mâle, nous avons déterminé les paramètres optimaux requis pour réaliser une stimulation ultrasonore précise et efficace. Dans la poursuite de ce projet, l'objectif

de la présente étude est de mettre en œuvre un protocole thérapeutique basé sur les ultrasons dans un modèle murin mâle de dépression.

Pour cette expérience, 32 souris réparties en 2 lots sont requises.

Les règles de raffinement, remplacement et réduction (3R) sont appliquées à ce projet :

- Raffinement : les différentes procédures seront réalisées sous anesthésie. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu et hébergement en groupe.
- Remplacement : aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée, les procédures doivent être réalisées sur l'animal vivant afin d'engager des études approfondies par la suite.
- Réduction : les effectifs sont optimisés, l'évaluation de plusieurs variables méthodologiques nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle ($n = 32$). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

4749. Ce protocole a pour but de découvrir les facteurs moléculaires contrôlant la mise en place d'un cerveau fonctionnel. Le bon fonctionnement du cerveau adulte nécessite la formation et le maintien de connexions fonctionnelles et spécifiques entre des types de neurones très variés. Cette organisation ne peut être reproduite par des systèmes cellulaires. Il est donc nécessaire d'avoir recours à des animaux pour pouvoir comprendre les mécanismes moléculaires permettant le développement du cerveau des mammifères. Le modèle utilisé sera la souris *Mus musculus*. En effet, la souris est devenue un modèle de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires régulant les grandes fonctions biologiques. Elle permet l'analyse *in vivo* de ces mécanismes et des conséquences de leurs perturbations par des manipulations génétiques à différents niveaux : comportemental, physiologique et moléculaire. Elles permettent également de créer des modèles d'étude des pathologies humaines.

Le but de notre projet est de déterminer les facteurs moléculaires caractérisant chaque type de connexions excitatrices de la cellule de Purkinje (neurone du cervelet). Une première étape consiste à trouver des marqueurs spécifiques. Pour cela, nous nous basons sur des résultats d'analyse d'expression des gènes comparative pour sélectionner nos candidats. Nous créons ensuite des fusions entre ces candidats et la GFP que nous re-exprimons dans les cellules de Purkinje pour suivre leur localisation subcellulaire. Le nombre d'animaux utilisés dans notre projet est réduit à son minimum dans la limite de ce qui est permis pour obtenir des résultats scientifiquement valides. Ainsi, il est nécessaire de reproduire les résultats de manière indépendante et d'avoir plusieurs échantillons pour éviter les différences dues à la variabilité biologique. Nous prévoyons donc l'utilisation d'un total de 250 souris gestantes donc d'environ 2750 souris au total (10 bébés par souris en moyenne), sur 5 ans pour l'étude de 25 facteurs moléculaires. Les données quantitatives obtenues feront l'objet d'une analyse de variance suivie de tests post-hoc lorsque ce test sera significatif. 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.

4750. Le projet se divise en 2 grands axes. En effet le but de cette étude est de caractériser la contribution du canal Nav1.5 (codé par le gène *Scn5a*) sur 1) les arythmies, telles que des tachycardies et des fibrillations ventriculaires, observées lors d'un infarctus du myocarde et 2) sur le remodelage myocardique inflammatoire post-ischémique. Pour cela, une approche chirurgicale par ligature coronaire sera réalisée sur un modèle de souris transgénique invalidée à l'état hétérozygote pour le gène *Scn5a*, puis sur un second modèle de souris porteuses d'une mutation de *Scn5a*, identifiée

chez l'homme et conduisant à une perte de fonction du canal : la mutation T220I. Ce projet permettra de vérifier l'hypothèse corollaire que des mutations de Nav1.5 conduisant à des pertes de fonction, pourraient exacerber la survenue d'épisodes arythmiques en prédisposant ces patients à des complications lors d'un infarctus du myocarde. Si ces observations sont confirmées, nos investigations porteront sur les voies de signalisation responsables de ces phénomènes.

Les explorations se porteront à la fois sur les volets cardiaques ainsi que respiratoires. En effet, Le canal sodique Nav1.5, qui est donc majoritairement présent dans le cœur, semble néanmoins exprimé dans divers tissus chez la souris et particulièrement dans les poumons. Or les fonctionnements de ces deux organes sont très intégrés. C'est pourquoi, il n'existe pas à l'heure de méthodes *ex vivo* / *in vitro* de remplacement à l'expérimentation animale pour cette nature de projet très intégrés. Mais nous maintenons néanmoins nos efforts pour développer des méthodes alternatives. Ce projet a été construit avec la volonté de mettre en place et de respecter « la règle des 3 R ». Seules les expériences absolument indispensables au succès du projet seront mises en œuvre. Le nombre d'animaux nécessaires pour chaque expérimentation a été défini statistiquement. Nous avons pris soin d'optimiser au mieux nos expérimentations en choisissant les lignées murines les plus adaptées à l'étude. Les procédures ont été réfléchies afin de réduire au maximum le stress et les souffrances des animaux soumis aux expérimentations. C'est pourquoi les investigations cardiaques comme respiratoires seront réalisées sur les mêmes animaux. L'ensemble du projet nécessitera au total 270 animaux afin de répondre aux objectifs posés pour ce projet. : 30 animaux pour l'apprentissage des procédures, 120 animaux sur un modèle de souris transgénique invalidée à l'état hétérozygote pour le gène *Scn5a* et 120 souris porteuses de mutation de *Scn5a* T220I précédemment énoncée. Ce troisième volet expérimental sur l'importance de la mutation pour ce canal ne sera évidemment réalisé que lorsque la seconde partie portant sur l'invalidation aura été conduite avec succès.

4751. La réponse immune est contrôlée par les cellules de type macrophages. Une meilleure compréhension des facteurs qui régulent leur activité va permettre à générer des vaccins plus efficaces et éventuellement des nouvelles thérapies contre le cancer. Nous nous intéressons au couple RANK et son ligand RANKL dans la différenciation des macrophages exprimant CD169. Les macrophages qui expriment CD169 sont des cellules clé dans le fonctionnement des organes immunitaires. Notamment ces

cellules jouent un rôle important dans la capture des antigènes et de la réponse immunitaire. Dans une publication il a été décrit que des souris déficientes en RANK comportent un nombre réduit de ces macrophages dans la rate. Le ligand de RANK (RANKL) est exprimé par les fibroblastes des ganglions lymphatiques et les lymphocytes T activés. Nous cherchons à savoir si une délétion spécifique de RANKL dans ces cellules se traduit par un défaut dans la différenciation des macrophages CD169 dans ces organes chez la souris et si la réponse immunitaire est altérée. Ces souris seront étudiées pour l'expression du marqueur CD169 dans la population macrophagique et seront immunisées. Ces tests nécessitent quatre groupes de souris : un groupe avec délétion de RANKL dans les fibroblastes, un groupe avec délétion de RANKL dans les lymphocytes T, un groupe avec la délétion dans les deux types cellulaires et un groupe contrôle. Les groupes sont étudiés à l'âge adulte pour la présence des macrophages CD169+ et seront immunisés. La réponse humorale sera analysée. Le nombre total de souris est de 280 animaux. Il n'est pas possible de remplacer les animaux par des expériences en culture cellulaire car actuellement il n'existe pas de méthodologie pour générer les macrophages CD169 à partir des cellules précurseurs. Nous pouvons utiliser les connaissances rapportées dans la littérature afin de réduire le nombre de souris. L'analyse de nos données sera effectuée par des tests statistiques de type ANOVA/Bonferroni. Les prélèvements seront effectués sur souris sacrifiées et les immunisations sur souris anesthésiées générale par des personnels compétents. Les animaux seront hébergés en groupe sociaux dans un environnement enrichi et observés quotidiennement. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement, et nous efforçons de réduire au mieux une éventuelle souffrance des animaux.

4752. La réponse immune est contrôlée par les cellules de type macrophages. Une meilleure compréhension des facteurs qui régulent leur activité va permettre à générer des vaccins plus efficaces et éventuellement des nouvelles thérapies contre le cancer. Nous nous intéressons au couple RANK et son ligand RANKL dans la différenciation des macrophages exprimant CD169. Nous avons découvert que les cellules endothéliales lymphatiques expriment RANK et nous cherchons à savoir si l'activation de ces cellules par RANKL conduit à la différenciation des macrophages CD169. Pour ce faire nous souhaitons créer des souris déficientes en RANK spécifiquement dans les cellules lymphatiques et étudier la présence de macrophages CD169 tout comme leur réponse immunitaire. Ces souris seront créées grâce à la technologie Cre lox inducible. La différenciation des macrophages sera analysée par cytométrie en flux sur cellules isolées et la réponse immunitaire mesurée par la production d'anticorps après immunisation. Ces tests nécessitent aussi un groupe de souris contrôle (sans activité de la Cre recombinase). Le nombre total des souris est de 300 animaux. Les prélèvements et les immunisations seront effectués sur souris sous anesthésie générale par un personnel compétent. Il n'est pas possible de remplacer les animaux par des expériences en culture cellulaire car actuellement il n'existe pas de méthodologie pour générer les macrophages CD169 à partir des cellules précurseurs. Nous pouvons utiliser les connaissances rapportées dans la littérature afin de réduire le nombre de souris. L'analyse de nos données sera effectuée par des tests statistiques de type ANOVA/Bonferroni. Les animaux seront hébergés en groupe sociaux dans un environnement enrichi et observés quotidiennement. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement, et nous efforçons de réduire au mieux une éventuelle souffrance des animaux.

4753. Ce projet a pour objectif d'étudier les effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires potentiels de médicaments anti-cholestérol, utilisé en thérapie humaine, dans un modèle de neuroinflammation. Plus particulièrement, le but de ce projet est de mettre en évidence les effets de ces molécules sur les cellules immunitaires résidentielles du cerveau ainsi que les mécanismes d'action mis en jeu. Le modèle de neuroinflammation utilisé sera celui d'une lésion d'une partie du cerveau chez le rat adulte.

Remplacement : Cette étude de caractérisation in vivo sur des rongeurs ne peut être substituée par une méthode alternative in vitro ou sur cellules. Il s'agit d'un essai pharmacologique qui doit être impérativement réalisé in vivo. Cette étude comportera des groupes d'animaux lésés et recevant ou non des médicaments anti-cholestérol.

Raffinement : les animaux seront hébergés par deux en présence d'un enrichissement comprenant un tunnel en plastique et du papier absorbant. La douleur sera évaluée chaque jour en prenant en compte les critères suivants : Hémorragie lors de la chirurgie, puis après la chirurgie, vocalisation, réduction de la mobilité, modification de la locomotion interférant avec la capacité d'abreuvement et la prise de nourriture.

Réduction : L'utilisation de l'imagerie permet de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce protocole puisque les cerveaux des rats utilisés pour l'imagerie seront ensuite utilisés pour l'analyse par immunohistochimie et par autoradiographie.

L'effectif de 64 rats (témoins inclus) correspond à l'effectif minimum pour pouvoir tester 3 médicaments. La lésion étant unilatérale, on comparera chez chaque animal l'accumulation du traceur du côté lésé par rapport au côté intact. Les groupes seront comparés entre eux par des tests statistiques et l'imagerie permettra de réduire l'effectif.

Les animaux seront traités pendant 14 jours (J1 à J15) avec une administration quotidienne, le matin, d'un des médicaments ou de son véhicule par voie orale. Pour s'assurer de la bonne prise du médicament, de l'absence de douleur suite à cette voie orale et de la bonne tolérance du produit, les animaux seront observés pendant 30 minutes chaque jour après avoir reçu leur traitement.

De plus, nous prévoyons un effectif supplémentaire de 6 rats sur 3 ans pour permettre au personnel de pratiquer la procédure d'administration de produit par voie orale. Cela permettra de limiter le stress des animaux lors des expérimentations. Ces animaux seront ensuite mis à mort et leur cerveau prélevé, de manière à avoir des échantillons de tissus pouvant servir à la mise au point de nouveaux protocoles (immunohistochimie, autoradiographie) mais aussi à la formation des étudiants, notamment pour la réalisation de coupes histologiques.

Pour cette étude nous aurons besoin de 70 animaux pour l'ensemble du projet pendant 3 ans.

4754. Les vaccins doivent de plus en plus répondre aux exigences de sécurité et d'efficacité. L'usage d'éléments sous-unitaires des pathogènes augmente la sécurité du vaccin, mais baisse en efficacité, ces éléments étant peu immunogènes. Le recours à des adjuvants permet d'amplifier la réponse immunitaire induite en protégeant l'antigène de la dégradation et de la dilution après administration et/ou en stimulant l'immunité innée, favorable à l'induction d'une réponse immunitaire adaptative (humorale par production d'anticorps et/ou cellulaire) de forte intensité, stable dans le temps et efficace (permettant une protection contre l'infection).

Les adjuvants qui sont aujourd'hui disponibles chez l'Homme ne sont pas métabolisés (sels d'aluminium), ou peuvent présenter une certaine toxicité (émulsions à base de squalène).

Notre laboratoire exploite une technologie à base de polymère biodégradable qui permet la formulation d'un antigène favorisant sa présentation au système immunitaire et l'induction d'une réponse immunitaire humorale. La co-formulation avec des molécules immunostimulantes permet (1) d'amplifier ou de modifier la réponse immunitaire induite (réponse cellulaire) et (2) de stimuler spécifiquement les cellules de l'immunité, diminuant ainsi les effets secondaires systémiques.

Bénéficiant déjà d'un certain développement *in vitro* et *in vivo*, le laboratoire a pour ambition de poursuivre le développement clinique de cette technologie. Cependant quatre paramètres ont été identifiés comme critique pour poursuivre ce développement. L'objet de ce projet est donc d'étudier l'influence de ces paramètres sur la réponse immunitaire induite. Les critères d'évaluation seront :

- L'intensité de la réponse immunitaire à travers la quantité d'anticorps induits,
- La durée de la réponse immunitaire dans le temps,
- La qualité des anticorps induits en testant leur affinité avec leur cible, ainsi que leur capacité à neutraliser un virus (modèle grippe)
- La présence ou non d'une réponse cellulaire.

Pour évaluer l'efficacité de ce vaccin à travers ces critères ne peut se faire qu'avec une approche *in vivo*. Le modèle murin, bien caractérisé et facilement manipulable, est donc nécessaire à ce développement d'adjuvant.

Le nombre de souris nécessaires à nos travaux a été réduit au minimum, sans compromettre l'analyse statistique de nos résultats. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par un personnel compétent permet de limiter au maximum toute souffrance animale. Nous prévoyons d'utiliser au maximum 425 animaux sur une période de 4 ans.

4755. Dans la sphère cranio-faciale, les causes de pertes de substances osseuses peuvent être d'origine malformatives, traumatiques ou secondaires aux exérèses tumorales. Plusieurs procédés permettent de les restituer selon la taille du déficit : les greffes osseuses, les biomatériaux ou encore les transplants micro-anastomosés. Les greffons autologues et les substituts osseux peuvent être utilisés de manière isolée ou combinée dans les terrains les plus favorables (défaut osseux limité, richesse médullaire environnante, éloignement des zones contaminées). Dans les défauts osseux maxillo-mandibulaires étendus, souvent situés en zone contaminée ou cicatricielle, seuls les transplants osseux micro-anastomosés sont indiqués, au prix de procédés chirurgicaux lourds et d'une morbidité accrue. L'étude chez l'animal a montré que l'association de biomatériaux phosphocalciques de type « Biphase Calcium Phosphate » (BCP) ou d'un autre biomatériau phosphocalcique (CaP) à de la moelle osseuse totale (MOT) permettait d'obtenir une néoformation osseuse mais sans pouvoir égaler les techniques de greffe osseuse autologue. Nos travaux précédents, ont d'ailleurs montré l'intérêt d'associer une autogreffe de moelle osseuse totale (MOT) ou des cellules souches mésenchymateuses différenciées (SCM) à des BCP pour favoriser la repousse osseuse dans ce territoire à faible trophicité. Les résultats obtenus par ces associations étaient proches bien qu'inférieurs à ceux obtenus par la technique de référence (greffe autologue) responsable de morbidités et permettant la reconstruction de volumes limités.

La réparation osseuse peut être compromise du fait de l'altération de l'environnement de la zone à régénérer (hypoplasie tissulaire, cicatrices), et/ou du fait du volume du greffon, qui n'est que lentement revascularisé et de manière centripète. L'utilisation de facteurs moléculaires (adjuvants) améliorant la régénération osseuse en terrain défavorable est une voie de recherche prometteuse pour pouvoir limiter le prélèvement osseux autologues ou l'utilisation de procédés chirurgicaux lourds pour les patients. L'association d'adjuvants aux biomatériaux peut ainsi avoir un rôle majeur dans l'amélioration des procédés d'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) en vue de se substituer aux prélèvements autologues chez le patient.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'intérêt des adjuvants dans la régénération osseuse *in vivo* dans des modèles pré cliniques de défauts de calvaria (voûte crânienne) chez le rat Lewis.

Les trois types d'adjuvants étudiés en ITO pour l'amélioration de la néoformation osseuse seront :

- Les transporteurs en dioxygène (TO2), en vue d'améliorer la diffusion de l'O₂ au sein du greffon afin d'augmenter la viabilité des cellules souches implantées.
- Les molécules à trophisme osseux (facteurs de croissance), en vue d'améliorer la production cellulaire ostéoblastique
- Les molécules à trophisme vasculaire (facteurs de croissance), en vue d'améliorer la formation du réseau vasculaire au sein du greffon

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'intérêt de l'association des adjuvants aux biomatériaux dans la régénération osseuse des défauts de calvaria (voûte crânienne).

Cette étude a donc pour but de montrer qu'il est possible d'améliorer un procédé d'ITO peropératoire afin d'éviter les techniques greffe osseuse nécessitant un prélèvement osseux contraignant pour les patients en diminuant la morbidité de cette procédure

Cette étude se déroulera sur 5 ans. 144 rats seront nécessaires, soit moins de 30 par an. Le remplacement de l'animal n'étant pas possible pour cette expérimentation *in vivo* le nombre d'animal sera divisé par 2. Afin de réduire de moitié le nombre de rat, 2 défauts de calvaria seront réalisés par animal. La réalisation de ces 2 défauts à montrer une très bonne tolérance dans les

expérimentations précédentes réalisées au sein du laboratoire. Nous raffinerons les conditions d'hébergement des animaux par un enrichissement des milieux dans chaque cage. Les animaux seront observés de manière quotidienne par les animaliers de l'unité thérapeutique expérimentale de l'UTE IRS-UN pour s'assurer du bien-être des animaux. Une analgésie sera donnée de façon systématique en post-opératoire immédiat ainsi qu'en cas de détection de signe de souffrance même mineure (cf 3.4.13).

4756. La médecine nucléaire thérapeutique repose sur l'administration d'un médicament radioactif (ou radiopharmaceutique), qui va se distribuer dans le corps du patient et se fixer plus spécifiquement dans les régions tumorales afin de les détruire. Aujourd'hui, on assiste à un fort développement de nouveaux radiopharmaceutiques. Parmi eux, les émetteurs alphas sont en plein essor. Ils ont l'avantage par rapport aux émetteurs beta- de délivrer une plus grande quantité d'énergie sur un faible parcours. Ces propriétés leur confèrent donc une plus grande cytotoxicité pour les cellules tumorales tout en limitant l'irradiation non désirée aux tissus sains.

Le Xofigo, 223Ra-dichlorure, est le premier radiopharmaceutique, émetteur de particules alphas, à avoir obtenu l'autorisation de mise sur le marché. Il est utilisé dans le traitement des métastases osseuses après un cancer de la prostate et un essai clinique est actuellement en cours sur les métastases osseuses après un cancer du rein.

Compte-tenu des challenges posés par l'arrivée de ce nouveau type de radiopharmaceutiques, il est apparu nécessaire d'optimiser la dosimétrie au patient, c'est-à-dire l'énergie reçue par unité de masse, suite à l'exposition à des rayonnements ionisants. La littérature rapporte, à ce jour, peu d'études dosimétriques sur le 223Ra et uniquement à l'échelle de l'organe.

Cependant, pour les radiopharmaceutiques émetteurs de particules alphas, le défi pour relier la dose aux effets biologiques est d'autant plus importante que les particules ont une courte portée. En effet, au-delà de la connaissance de l'anatomie du patient et de la biocinétique de l'isotope, il est nécessaire de connaître sa distribution à l'échelle sub-cellulaire, l'irradiation des cellules cibles pouvant être fortement hétérogène. Pour comprendre et prédire les effets biologiques, une dosimétrie conventionnelle à l'échelle de l'organe peut ne pas être adaptée. A cette échelle, l'approche microdosimétrique peut s'avérer nécessaire. Pour cela, des images de la biodistribution du radionucléide au niveau cellulaire devront être effectuées. Il n'est pas possible à l'heure actuelle d'obtenir ces informations directement chez l'homme. Ces données pourront être déterminées chez l'animal (autoradiographie) et être utilisées pour établir une relation dose-effet (survie cellulaire, toxicité).

Ainsi, des modèles de souris saines et malades peuvent fournir des réponses aux questions en suspens concernant les paramètres qui influencent la distribution du 223Ra. Ceci aura des implications importantes pour la conception et l'interprétation des études pré-cliniques.

Le Xofigo étant utilisé sur deux types de métastases osseuses, les modèles utilisés sont trois modèles de souris : l'un porteur de tumeurs ostéoblastiques et ostéolytiques (IGR-CaP1) correspondant au type métastases après cancer de la prostate et l'autre porteur de tumeurs ostéolytiques (786 O) correspondant au type de métastases après cancer du rein, ainsi qu'un modèle témoin sain. Chacun de ces modèles (au total 75 animaux) recevra une injection de Xofigo, du même ordre de concentration que lors d'un traitement chez l'homme. Ce projet sera réalisé conformément à la règle des 3R et le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum nécessaire permettant d'obtenir une puissance statistique suffisante. De plus, un maximum d'organes sera prélevé et sera conservé de façon à pouvoir constituer une banque d'échantillons utilisables dans des études futures.

Les objectifs de ce projet sont :

- de quantifier la fixation du 223Ra dans l'os sain et la métastase. Pour ceci, des expériences comparatives du suivi de la biocinétique seront réalisées avec les trois modèles de souris ;
- d'étudier la possible différence de fixation entre des métastases lytiques et ostéoblastiques. Pour ceci, les différents modèles de souris malades seront suivis à différents temps pour différents paramètres sanguins, tissulaires et cellulaires.

L'objectif global de ce projet est de collecter des données de biocinétique à l'échelle de l'organe et de la cellule, de quantification et de dosimétrie qui permettront de contribuer à optimiser l'activité de Xofigo à injecter au patient.

Règle des 3R:

Réduire le nombre d'animaux utilisés en tenant compte des contraintes statistiques et en conservant tous les prélèvements d'organes et tissus pour des analyses ultérieures.

Le nombre de 75 souris nécessaires pour ces études prend en compte cette règle.

Raffiner en assurant une surveillance quotidienne par l'expérimentateur dès la période critique et en fixant des points limites stricts qui conduisent à l'euthanasie ainsi qu'en assurant aux souris un hébergement de qualité avec 5 souris par cage enrichie.

4757. De nombreuses études montrent qu'il est possible d'utiliser les odeurs corporelles (présentes par exemple dans les fèces, substances ayant été en contact intime avec leur producteur), pour distinguer différents états physiologiques, voire même identifier des maladies. A cette fin des chiens peuvent être entraînés, ou des capteurs olfactifs électroniques développés. L'identification de l'œstrus (période où peut se dérouler la fécondation) chez les chevaux est difficile. Il est important de pouvoir établir le statut reproductif des juments car cela permet de faciliter le processus de reproduction, tout en ménageant le bien-être des animaux impliqués. Actuellement les éleveurs disposent de différentes méthodes pour effectuer cette détection, dont l'échographie (laborieuse, chère) et l'utilisation d'étalon souffleur (dangereux, risque de maladie). Il a été décrit que l'œstrus se signale par des odeurs particulières et que la détection de ces odeurs dans les fèces constituerait un outil complémentaire plus simple et plus rapide à utiliser que les autres méthodes.

L'olfaction est un sens très développé chez les rats. Ils peuvent détecter la maladie et le stress chez leurs congénères à partir des odeurs qu'émettent ces derniers. Les rats sont également capables de détecter le sexe et le statut hormonal, par exemple l'œstrus, chez les rates, ainsi que chez les femelles d'autres espèces. Afin de contribuer au développement de capteurs olfactifs, nous

étudierons le comportement de rats en réponses à des odeurs corporelles et utiliserons ainsi ces animaux comme bio-détecteurs pour identifier des odeurs d'œstrus. Il est nécessaire de bien comprendre quelles odeurs sont détectées, ainsi que les réponses comportementales que celles-ci induisent chez le rat. Pour révéler les différences olfactives entre différents échantillons biologiques, des rats seront exposés à des odeurs différentes et leur comportement sera enregistré. L'analyse et la comparaison des comportements nous aideront à interpréter la signification biologique d'une odeur.

Les rats, qui sont des animaux sociaux, seront logés par paires ou par groupes. Dans une phase préparatoire, ils seront habitués à demeurer seuls durant quelques minutes dans une arène d'observation. Au cours des tests d'observation, ils seront exposés seuls à une ou plusieurs sources d'odeurs. Les odeurs naturelles complexes utilisées comprendront les fèces et les fluides biologiques de rats et d'autres espèces, y compris de prédateurs. Nous exposerons aussi les rats soit à des mélanges de molécules odorantes, soit à des molécules isolées représentatives d'odeurs naturelles complexes à signification physiologique (odeur d'œstrus de diverses espèces, odeur de prédateurs et odeur alimentaire). Les résultats seront comparés et confrontés aux résultats obtenus par d'autres approches neurobiologiques *in vitro* et *in vivo* au laboratoire.

Dans ce projet, seront utilisés 300 rongeurs nés et élevés dans un élevage agréé. Le nombre d'animaux dans chaque groupe expérimental est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'emploi de tests statistiques pour analyser les résultats. Il n'existe pas aujourd'hui de méthode de remplacement des rongeurs susceptible de nous apporter les réponses attendues de cette étude sur animaux. Ni la modélisation mathématique, ni les méthodes *in vitro* disponibles ne sont encore capables de rendre compte de la richesse et de la diversité des réponses comportementales des rongeurs exposés à une odeur. Les procédures mises en œuvre ne sont pas susceptibles de provoquer douleur, souffrance ou détresse durables, puisque ce projet est basé sur l'observation de comportements induits suite à l'exposition à des odeurs. Les rongeurs sont visités quotidiennement par du personnel agréé. Ils seront replacés à l'animalerie à l'issue du projet et pourront être utilisés dans d'autres projets. Grâce à ces travaux, nous contribuerons à une meilleure compréhension des réactions des rats aux odeurs, et développerons une méthode non-invasive et rapide pour évaluer les états physiologiques d'autres animaux.

4758. Notre établissement accueille des étudiants pouvant être amenés à travailler en laboratoire de biologie dans les domaines médical, vétérinaire, agroalimentaire, biotechnologie et pharmaceutique. Au niveau de la formation, ils acquièrent les bases sur les appareillages et les techniques les plus couramment utilisés en immunologie. Ils pourront être amenés à réaliser des dosages immunologiques. Parmi celles-ci, la méthode d'immunodiffusion double (IDD) reste utilisée dans la sérologie parasitaire en laboratoire. L'utilisation de 4 rats Wistar immunisés présente un intérêt pédagogique puisque l'on peut tester différents antigènes à partir d'un même protocole (le protocole est renouvelé chaque année et ce, pour une durée de 5 ans). Un total de 20 rats sera utilisé sur cette période. On peut ensuite précisément comparer les propriétés des immunosérums produits dans les mêmes conditions mais aussi en quantité suffisante pour l'ensemble des étudiants. Également, les étudiants sont sensibilisés aux protocoles d'immunisation réalisés sur les rats, dans le respect de la règle des 3R, notamment en ce qui concerne le suivi du bien-être animal. Le travail d'immunisation réalisé sur les animaux sera effectué par le personnel qualifié en expérimentation animale (niveaux 1 et 2). Une surveillance sera assurée quotidiennement par ce même personnel sur les animaux au niveau de l'alimentation et du comportement. Les animaux utilisés sont des rats Wistar mâles, au nombre de 4, ce qui est un nombre au maximum réduit et qui est suffisant pour que les prélèvements sanguins effectués en fin de protocole puissent couvrir les besoins pédagogiques; ces 4 animaux seront utilisés par l'ensemble des étudiants en formation, soit un nombre d'une quarantaine de binômes. Les animaux sont hébergés en conditions contrôlées, deux par cage (L x l x P 48 x 27 x 20) dans un milieu enrichi. Afin de permettre aux rats de développer leur activité naturelle, le milieu est enrichi en emballage carton modifiable. Le suivi quotidien permettra d'évaluer un comportement qui ne semblerait pas compatible avec le bien-être des animaux.

4759. L'environnement familial et socio-économique, la génétique et l'éducation sont des facteurs de risque déjà bien connus de développer une obésité. Cependant, ce risque d'obésité pourrait également être transmissible directement de la mère à l'enfant puisque l'indice de masse corporelle (IMC) de la mère avant la gestation, plus que celui du père, est le meilleur prédicteur du risque d'obésité de l'enfant à 8 ans. Parmi les voies de transmission possibles de la mère à l'enfant, un enchaînement de constats scientifiques désigne les microbiotes maternels comme bons candidats. Premièrement, de nombreuses données font état d'une différence entre le microbiote intestinal et celui du lait selon le poids de la mère (obèse versus normopondérale). De plus, le microbiote intestinal de l'enfant est majoritairement déterminé par ceux de sa mère. Enfin, les bactéries intestinales apparaissent influencer le fonctionnement des zones cérébrales jouant un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique d'une part, de l'appétit et de la satiété d'autre part.

L'hypothèse de ce projet est que le transfert d'un microbiote spécifique de la mère obèse vers ses descendants serait responsable de modulations des circuits neuronaux hypothalamiques et du tronc cérébral chez cette descendance, et contribuerait à des modifications de la régulation de l'appétit et du métabolisme énergétique, ce qui prédisposerait ainsi la descendance à l'obésité à l'âge adulte.

Remplacement :

Ce projet nécessite la manipulation dirigée du microbiote intestinal des descendants. Pour des raisons d'éthique évidentes, un tel projet ne peut être réalisé chez l'Homme. En outre, l'expérimentation *in vitro* ne permettrait pas de conserver la complexité des mécanismes physiologiques mis en jeu dans l'axe intestin-cerveau, nécessaires dans cette étude. En conséquence, l'usage d'un modèle animal ne peut être remplacé, et nous permettrait de caractériser les impacts à moyen terme dans un délai plus réduit que chez l'Homme.

La première étape du projet aura pour objectif de valider l'utilisation du modèle expérimental de rat Obese-Prone (OP) / Obese-Résistant (OR) lors de la consommation d'un régime riche en calories. Cet objectif sera atteint si nous mettons en évidence des différences de microbiote intestinal entre un rat obèse (OP) et non obèse (OR) comme déjà documentées, et si une telle différence existe également pour les microbiotes du vagin et du lait. Des prélèvements de lait et des frottis vaginaux seront donc effectués sur un total de 25 rates (lignées confondues). Si aucune différence en termes de densité et de diversité d'espèce n'apparaît entre les microbiotes OP et OR, la poursuite du projet sera abandonnée. La deuxième étape aura pour objectifs de réaliser le transfert des microbiotes issus du vagin et du lait de mères obèses ou normopondérales chez les descendants en période néonatale, puis de caractériser les impacts à la fois immédiats (ie au sevrage) et à moyen terme (ie jeune adulte) de ce transfert sur le microbiote intestinal, le statut métabolique, ainsi que sur la structure des zones cérébrales cibles (hypothalamus et tronc cérébral) et le comportement alimentaire des descendants. Pour cette étape, un total de 88 rates sera utilisé pour obtenir autant de portées issues de mères OP que de mères OR. Des prélèvements de lait et des frottis vaginaux seront également à nouveau effectués sur d'autres rates OP et OR afin de fournir les microbiotes du vagin et du lait utilisés pour les transferts contrôlés allant être administrés par gavage aux ratons des portées OP et OR ci-dessus. Ceci est réalisé dans le but d'éviter, chez les portées suivies jusqu'à l'âge adulte, les séparations mère-descendants et les anesthésies maternelles répétées nécessaires aux prélèvements.

Réduction :

Les deux étapes réunies nécessitent un total de 167 rates, 28 rats et 288 ratons OP et OR confondu(e)s, soit un total de 483 animaux. Ce nombre, bien que très élevé, a été réduit au minimum et prend en compte les risques de non fécondation qui sont de 56% chez les OP et 4% chez les OR selon une étude de Levin & Govek en 1998 (Am J Physiol 275 :R1374), la fréquence avec laquelle naissent des ratons mâles et femelles en un nombre multiple de 6 pour réaliser des adoptions systématiques dans le but de s'affranchir de l'origine biologique des ratons (respectivement env. 57% et 69% des portées selon l'expérience obtenue dans notre laboratoire), ainsi que la nécessité d'obtenir un nombre suffisant de ratons mâles et femelles pour chaque condition permettant une exploitation statistique fiable des données de comportement alimentaire.

Raffinement :

L'ensemble des procédures prévues relève de la classe de sévérité « légère ». Les situations pouvant engendrer un stress ou une douleur de courte durée chez les animaux seront, pour les ratons nouveau-nés, les gavages quotidiens sur une courte période, pour les femelles lactantes « donneuses » de microbiotes, les injections quotidiennes d'ocytocine sur une courte période, et pour les descendants conservés après sevrage, l'hébergement en cage individuelle des rats sur une longue période. Pour s'assurer au maximum du bien-être des animaux, les ratons seront gavés avec un matériel et des volumes adaptés à leur taille, les injections seront réalisées par du personnel compétent et les cages individuelles seront enrichies (tunnel en PVC et matériel permettant de construire un nid). L'évaluation de la douleur se fera par une observation quotidienne des animaux basée sur de multiples critères comportementaux, physiologiques, et d'apparence. Ceci permettra d'établir un score pour chaque animal à partir desquels les éventuelles décisions d'administration d'analgésiques ou de mise à mort seront établies. Les prélèvements d'organes seront effectués après anesthésie profonde et mise à mort de l'animal.

4760. Un dysfonctionnement du système immunitaire peut provoquer la rupture de la tolérance au soi et être à l'origine du développement de maladies auto-immunes. Ainsi, la connaissance approfondie des mécanismes immunologiques impliqués dans la tolérance représente un enjeu capital pour améliorer à la fois la compréhension et le traitement des maladies auto-immunes.

L'objectif de ce projet est d'établir un nouveau modèle animal déficient pour le gène Aire, qui est le gène responsable en pathologie humaine des symptômes des patients souffrant d'APECED ou APS 1, afin de mieux comprendre son rôle et ses mécanismes d'actions dans l'auto-immunité, l'alloréactivité et la génération des T régulateurs. Cette maladie monogénique rare se caractérise par l'apparition progressive de nombreux symptômes auto-immuns dont les 3 majeurs sont : la candidose, l'hypoparathyroïdisme et la maladie d'Addison. En France, cette maladie est très rare mais peut atteindre une prévalence de 1/14000 chez les Sardes.

Des souris Aire KO existent depuis Janvier 2002. Le choix du rat repose essentiellement sur le fait que cet animal présente de plus fortes similitudes immunologiques et génétiques avec l'Homme que la souris. Des rats déficients pour le gène Aire ont donc été générés via l'utilisation d'une technique basée sur l'utilisation de zinc finger nucléase. Nous avons décidé, en plus d'effectuer ce modèle knockout dans une souche de rats consanguins beaucoup plus sensible au phénomène d'auto-immunité : souche Brown-Norway, de dériver cette mutation dans 2 autres fonds génétiques.

Une étude du phénotype de ces animaux du point de vue pathologique et immunologique en comparaison aux symptômes des patients souffrant d'APECED sera donc réalisée. Cela après la mise en place d'un élevage de rats KO Aire ayant un statut homozygote pour la délétion.

Pour ce projet, un total de 227 rats sera nécessaire afin de réaliser les expériences permettant une évolution de la compréhension de cette maladie touchant essentiellement les jeunes enfants.

Le bien-être animal étant crucial, le nombre d'animaux a été réduit au maximum, des solutions d'anesthésie et un tableau complet définissant les points limites a été établi afin qu'aucun animal ne se retrouve dans un état de souffrance importante. Afin d'améliorer leurs conditions de vie et d'éviter l'angoisse, des produits d'enrichissement sont disposés dans la cage (rouleau de carton + « paper wool »).

4761. La radiothérapie joue un rôle majeur dans la guérison des patients cancéreux, mais induit des effets secondaires sévères qui limitent l'augmentation de la dose de rayonnement et donc le contrôle tumoral. Une nouvelle modalité de radiothérapie basée sur l'augmentation du débit de dose a été développée et permet l'épargne des tissus sains tout en conservant le contrôle tumoral. Cette

nouvelle technique nommée radiothérapie Flash est réalisée avec un accélérateur d'électron (LINAC) permettant de délivrer un débit > 40 Gy/s alors que les accélérateurs cliniques standards (RX ou électron) utilisés actuellement en clinique délivrent un débit de 3-4 Gy/min. Dans le cerveau, l'irradiation Flash (10 Gy) permet la préservation des capacités cognitives de souris irradiées au niveau de l'encéphale entier et une protection des sites de neurogenèse que ne permet pas l'irradiation conventionnelle. Ces expériences ont été réalisées avec un accélérateur d'électron et nous souhaitons tester l'hypothèse selon laquelle l'effet protecteur observé est lié au haut débit de dose et pourrait être reproduit avec des photons (RX) délivrés à très haut débit de dose. L'irradiation à l'ESRF en « broad beam » permettra d'irradier en RX avec un débit de dose >50 Gy/s et de valider cette hypothèse sur 30 souris C57Bl6. L'effet protecteur de l'irradiation Flash nécessite un système physiologique complexe et n'est jamais observé in vitro, c'est pourquoi les expériences doivent être réalisées in vivo mais le nombre de souris a été réduit grâce à l'analyse de puissance statistique. Le groupe irradiation conventionnelle ne sera pas réalisé car nous utiliserons nos données antérieures et les données de la littérature. Cette expérience n'induit aucune souffrance immédiate ni à long terme chez la souris (c'est comme une radiographie).

4762. L'État de Stress Post-Traumatique (ESPT ou PTSD, pour Post-Traumatic Stress Disorder, APA 1994) est une pathologie psychiatrique à forte prévalence dans la population générale (8 – 12%) qui, en l'absence de prise en charge adaptée, peut se compliquer en formes handicapantes et comorbides (dépression, addictions, anxiété, etc.)

Le PTSD se caractérise par une constellation de symptômes qui surviennent après l'expérience d'un événement traumatique pouvant être léthal, causer une blessure grave ou menacer l'intégrité physique. Ce traumatisme va provoquer une réaction de peur intense, un sentiment d'impuissance ou d'horreur. La symptomatologie du PTSD se définit alors par un syndrome de reviviscence traumatique, un évitement et émoussement affectif et une activation neurovégétative.

L'implication de l'hippocampe dans la vulnérabilité à cette pathologie a été bien documentée. Or, au sein de l'hippocampe, on trouve des néoneurones formés à l'âge adulte. On peut donc penser que ces néoneurones pourraient être impliqués dans la vulnérabilité à développer des symptômes de PTSD.

L'utilisation d'un modèle animal est alors nécessaire pour une investigation approfondie. Plusieurs modèles murins valides de PTSD existent, notamment ceux basés sur l'exposition à un choc électrique. Ce protocole de conditionnement de peur classique provoque des modifications comportementales durables (évitement, freezing), associées à la symptomatologie et aux altérations neurobiologiques chez l'humain. Par ailleurs, chez l'animal il est possible d'induire expérimentalement de la neurogenèse.

Ce modèle s'intéressant au comportement animal, il ne peut s'entreprendre que sur l'animal vivant et aucune méthode de remplacement (par exemple, une étude in vitro) n'est envisageable. L'enrichissement du milieu des cages d'hébergement est systématique (cabanes, tubes et smarthomes®).

Le but de cette expérience est d'évaluer les effets d'une augmentation de la neurogenèse adulte sur la vulnérabilité au stress traumatique. Il s'agira d'évaluer la contribution de neurones de différents degrés de maturation (1 semaine, 2 semaines, 4 semaines, 6 semaines, 8 semaines).

Les degrés de maturation de 2 et 4 semaines ayant déjà été testés, il s'agit ici d'évaluer l'impact de nouveaux neurones âgés de 6 et 8 semaines.

Pour ces deux points, on testera 8 lots expérimentaux de 18 souris chacun, qui se distingueront par 3 facteurs : le fait d'avoir ou non subi le stress traumatique, le fait d'exprimer ou non la mutation qui induit la neurogenèse, le fait d'avoir ou non subi l'administration de Tamoxifène (qui active la construction génétique). Ainsi, pour un point temporel donné, il y aura $8 * 18 = 144$ souris. Etant donné qu'il faudra entreprendre 2 expériences pour tester les différents âges de neurones, cela représente donc un total de $144 * 2 = 288$ souris.

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

Raffinement : le stress traumatique appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen, en raison de sa brièveté, comparé à ce qui est pratiqué dans d'autres laboratoires. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu.

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

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

4763. L'objectif principal de ce projet est de développer une nouvelle approche thérapeutique permettant le traitement des cancers ayant acquis une résistance aux anti-tumoraux classiques. Cette nouvelle stratégie repose sur la mise au point de nouveaux vecteurs lipidiques permettant d'encapsuler et de diriger vers les cellules tumorales des médicaments anti-tumoraux.

Ce projet de recherche a été évalué par un comité d'experts internationaux et bénéficie d'un financement du Labex Medalis sous l'appellation "NCIS Code".

Des études préliminaires in vitro de ces nouveaux vecteurs ont permis de montrer de fortes réductions de la prolifération tumorale.

Les atouts majeurs de ces nouveaux vecteurs sont :

- leur très petite taille qui devrait permettre une bonne diffusion à l'intérieur des tumeurs,
- la possibilité de combiner plusieurs médicaments dans un seul vecteur,

- et leur faible toxicité.

Afin de vérifier le potentiel thérapeutique de ces nouveaux outils, il faut désormais s'assurer que les effets anti-tumoraux accrus observés *in vitro* peuvent être reproduits chez le petit animal portant une tumeur. Cette approche est nécessaire pour prendre en compte les différents paramètres biologiques liés à la nature des tissus dans lesquels se développent les tumeurs. Ces conditions complexes ne peuvent pas être mimées *in vitro*.

L'expérience consistera donc à injecter en péri-tumoral pendant 4 semaines (à raison de trois injections par semaine), une série de vecteurs anti-tumoraux. Les injections seront menées dans deux séries d'expériences composées chacune de 4 groupes de 10 animaux (soit 80 souris au total), dans lesquels nous effectuerons au préalable une greffe de cellules tumorales de sein (MDA-MB-231) pour reconstituer un édifice tumoral complexe. Les quatre groupes permettent de comparer la croissance dans les conditions contrôles (animaux recevant le produit de solubilisation sans principe actif) et des conditions de traitement avec un seul agent (groupe 2 et 3) ou la combinaison de deux agents thérapeutiques (groupe 4).

Si les résultats de cette première série sont concluants, 2 autres types d'injections seront alors testés : en intrapéritonéal et en intraveineux, afin de déterminer quelle est la voie d'administration optimale pour obtenir l'effet thérapeutique maximal. Ces expériences seront conduites selon le même schéma expérimental (40 souris par expérience), chaque série étant répétée 2 fois de façon indépendante, ce qui portera le nombre total de souris utilisées pour l'ensemble de cette étude à 240 (2 x 40 souris x 3 types d'injections).

Réduire :

Le nombre d'animaux nécessaire a été déterminé au minimum mais néanmoins suffisamment pour pouvoir réaliser une analyse statistique pertinente.

Raffiner:

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

Des points limites ont notamment été établis pour éviter toute souffrance animale. Les souris sont maintenues en groupe de 3 minimums par cage pour maintenir une interaction entre individus. L'environnement d'élevage est enrichi à l'aide de carrés de cellulose pour la construction des nids et de tunnels en plastique rouge pour favoriser l'activité des souris. Les souris ont accès ad libitum à une nourriture de type normal (RM1, Dietex) et à de l'eau filtrée. Si une souris présentait des symptômes traduisant l'apparition de douleurs (cf tableau de détermination des points limites, Annexe 1) une injection en IP d'un analgésique sera effectuée une fois par jour (Metacam 2mg/ml solution injectable, à raison d'une injection en IP de 0.2mg/kg de souris) jusqu'à disparition des symptômes.

Remplacement:

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

4764. La radiothérapie représente avec la chirurgie et la chimiothérapie, l'une des stratégies thérapeutiques les plus utilisées contre le cancer. Plus de la moitié des patients atteints de cancers sont traités par radiothérapie. Cependant, l'efficacité de la radiothérapie est limitée par une sensibilité aux radiations ionisantes très variable d'un organe à l'autre et par les effets secondaires sur les tissus sains environnants la tumeur. C'est pourquoi, de nombreux patients atteints de cancer ne reçoivent pas une dose suffisante pour détruire efficacement la tumeur. Il est donc impératif de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'augmenter l'efficacité des traitements.

Lors de récents travaux, il a été montré que les radiations ionisantes induisaient du cannibalisme cellulaire. Le cannibalisme cellulaire (ou entose) a été identifié comme un processus de destruction des cellules cancéreuses par d'autres cellules cancéreuses. Il existe une corrélation inverse entre l'induction de l'entose et la présence de métastases dans des cancers humains suggérant ainsi que le cannibalisme peut être défini comme un mécanisme intrinsèque anti-tumoral. C'est pourquoi nous voulons développer de nouvelles approches thérapeutiques dont l'objectif est d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie en favorisant le déclenchement du cannibalisme cellulaire.

Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier l'immunité anti tumorale dans sa globalité avec toutes les interactions nécessaires (système immunitaire, voies hormonales, médiateurs physiologiques). Cet environnement est impossible à reproduire dans toute sa complexité et sa régulation *in vitro* ou *ex vivo* (un de nos objectifs étant de comprendre les mécanismes immunitaires mis en place contre les cellules entotiques).

Etant donné que la détection du cannibalisme cellulaire et de la sénescence dans des cancers du sein semble prédire *in vitro* la réponse clinique des patients aux traitements neo-adjuvants il est maintenant indispensable de tester l'effet anti-tumoral de ces modulateurs *in vivo* (molécules de la banque Prestwick) sur des modèles murins.

Suite à différents criblages, nous avons identifié des agents pharmacologiques capables d'augmenter le déclenchement du cannibalisme cellulaire à la suite de l'exposition aux radiations ionisantes et nous souhaitons apprécier l'effet anti-tumoral (régression de la taille de la tumeur et activation ou non du système immunitaire) de ces modulateurs *in vivo* en mettant en œuvre des modèles murins de transplantation. Nous suivrons la croissance tumorale en fonction des différents traitements.

Le recours à des modèles animaux est donc indispensable pour étudier les effets de ces nouvelles combinaisons thérapeutiques dans un contexte qui inclut le micro environnement tumoral et donc le système immunitaire. Il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire *ex-vivo* du fait de sa complexité.

Pour mener à bien ce projet et avoir une idée précise du potentiel en thérapeutique humaine de ces nouveaux produits, 3920 souris seront nécessaires et plusieurs expérimentateurs interviendront sur 4 années d'étude. Une analyse statistique a été effectuée afin de

calculer le nombre d'animaux nécessaires pour détecter des différences significatives de croissance tumorale. L'effet attendu doit être une régression de la taille de la tumeur d'au moins 20% (effet significatif). Nous fixerons le risque alpha à 0,05, le risque beta à 0,10 et donc une puissance de 0,9 et un écart type σ correspondant à 70% de la valeur de la « différence attendue » au niveau de la régression du volume tumoral. Dans ces conditions, 11 sujets seront inclus dans chaque groupe de traitement.

Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au minimum l'inconfort et la souffrance des animaux. Les animaux seront observés quotidiennement pour détecter tout signe éventuel de souffrance ou de toxicité des traitements. Un enrichissement (« cocoons ») sera mis à disposition des animaux en permanence.

4765. Ce projet de recherche fondamentale vise à mieux comprendre l'évolution des réponses de neurones dopaminergiques (associés à la récompense et les comportements orientés vers un but), celle des réponses de neurones noradrénergiques (associés avec la vigilance) et leurs effets sur un circuit cérébral spécifique lors de l'apprentissage et de réapprentissage successifs. En effet, les neuromodulateurs sont diffusés largement dans de grandes régions du cerveau afin de réguler et orchestrer les fonctions de diverses populations de neurones. Ce projet apportera des connaissances sur cette autogestion cérébrale et la sélection parmi de multiples processus menés en parallèle pour le traitement de signaux liés à la prise de décision et de l'automatisation de comportements appris. Ce projet s'inscrit dans un programme de recherche mené depuis plus de 20 ans au sein de notre équipe sur la même problématique, dans lequel différentes structures liées dans un grand circuit ont été étudiées chez des rongeurs effectuant des tâches comportementales similaires. Nous enregistrons les signaux de communication entre des neurones pendant plusieurs semaines de comportement chez des rats adultes mâles, des souris adultes mâles mutantes et des souris adultes de type sauvage grâce à des implants incluant micro-descendeurs d'électrodes et microélectrodes qui permettent l'exécution d'enregistrements cellulaires ainsi qu'un microfaisceau de fibre optique pour effectuer des stimulations au niveau de certaines structures ciblées du cerveau et modifiées génétiquement. Les animaux seront légèrement privés d'eau (rats) ou de nourriture (souris). Les rats seront familiarisés avec un dispositif de labyrinthe (avec des récompenses de gouttes d'eau saccharinées) et les souris seront pré-entraînées dans une boîte de conditionnement avec des tâches de discriminations sensorielles avec des indices visuels ou d'odorat (avec des récompenses alimentaires). Puis les enregistrements seront effectués lorsque les animaux effectueront une série de différentes tâches successivement. Les stimulations optogénétiques permettront l'identification définitive des neurones dopaminergiques et noradrénergiques chez les souris et les rats respectivement. Ceci permettra de mieux comprendre comment le cerveau réachemine les voies actives automatiquement selon le contexte et l'histoire récente des comportements et des récompenses. Les animaux seront euthanasiés à la fin des expériences afin de contrôler la position des implants sur la base de préparations histologiques.

Les 3 R's seront respectés. Réduction : L'utilisation des électrodes multiples permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaires à acquérir une base de données suffisante pour obtenir des données statistiquement significatives. La 'réduction' sera également augmentée par nos outils statistiques de « Monte Carlo » qui sont plus sensibles que des tests dits non-paramétriques (c'est à dire des tests qui ne présument pas des connaissances de la nature de la distribution mathématique des données). Raffinement : Les protocoles seront raffinés grâce au choix des souches de rats ou souris consanguines (c'est à dire avec les mêmes gènes). En effet, la consanguinité assure une variabilité moins importante dans les mesures de données que des souches sauvages, et donc moins d'animaux seront requis. On pourra donc éviter l'utilisation de primates, de races canines ou félines. Un total de 80 rats et 91 souris seront utilisés. Les animaux recevront un tranquillisant, une anesthésie générale et une anesthésique locale lors des interventions chirurgicales. L'implant d'enregistrement a été développé afin de réduire son poids au minimum et est bien supporté par les animaux, selon des normes acceptées au niveau international. Un autre exemple de raffinement de notre protocole sera l'identification des neurones avec des propriétés biochimiques identifiées grâce aux technologies d'optogénétique (c'est à dire la modification génétique de classes spécifiques de neurones afin de permettre de modifier leur activité après l'application des stimulations optiques). Afin de motiver les animaux à effectuer les tâches comportementales, ils seront légèrement privés d'eau ou d'alimentation. Ils seront mis sous surveillance stricte avec des pesés et observations d'état de santé journalières, et au moindre signe de détresse ou souffrance, la restriction sera arrêtée. Le protocole de mise à mort sera conforme à des protocoles standardisés du comité d'éthique. Remplacement : Comme nous établissons les corrélations entre l'activité de neurones et le comportement, il ne sera pas possible de remplacer notre protocole par des approches in vitro ou de la modélisation avec des réseaux de neurones formels. Les connaissances acquises dans ce projet seront utilisées pour la modélisation.

4766. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la forme la plus fréquente de cancer du foie, deuxième cause de décès lié au cancer dans le monde. Un diagnostic précoce et précis est essentiel pour le traiter à temps. Actuellement, le diagnostic se fait par imagerie médicale et biopsie. Cependant, ces méthodes présentent des limites dans la caractérisation du type de cancer. Un dispositif d'aide au diagnostic du cancer a été développé. Ce dispositif est équipé d'une aiguille comprenant une fibre optique qui permet de mesurer la fluorescence des cellules. L'utilisation se fait par insertion de cette aiguille au sein du tissu cible dans le but d'obtenir un diagnostic immédiat. Il permet d'une part de déterminer si le nodule est de nature bénigne ou maligne et d'autre part de guider les biopsies. Un projet a été mis en place pour l'application de ce dispositif au cancer du foie. Ce projet fait l'objet d'un financement ANR pour les essais précliniques sur des modèles murins.

L'une des particularités du cancer du foie est qu'il se développe sur un organe déjà malade. Il a été démontré lors d'une étude pilote sur des pièces opératoires de foies humains que la fluorescence des cellules hépatiques est impactée par la maladie sous-jacente à la tumeur. Dans le cadre de ce projet nous allons tester le dispositif sur des modèles murins de stéatose, de stéatohépatite, de fibrose et de CHC afin de déterminer l'impact propre à chacune de ces maladies du foie sur la fluorescence des cellules. Nous

pourrons ainsi établir un algorithme prenant en compte ces paramètres pour différencier les nodules malins des bénins, le plus sensiblement possible.

Nous ne pouvons pas déterminer ces paramètres en utilisant des pièces opératoires humaines car nous ne pouvons pas disposer de foies humains sains ou présentant une seule de ces maladies. Nous ne pouvons pas utiliser des modèles cellulaires puisqu'il est impossible de reproduire in vitro les conditions physiologiques de ces maladies. De plus, il est indispensable de tester le dispositif in vivo sur des modèles animaux dans le cadre d'une étude préclinique avant de pouvoir passer en étude clinique chez l'Homme.

Pour avoir des résultats significatifs, le minimum nécessaire pour chaque lot est de 5 souris pour les conditions contrôle et 7 à 10 souris pour les conditions à tester, du fait de la variabilité inter-animal. Pour la totalité de l'étude, 236 animaux seront nécessaires.

4767. Vu l'augmentation massive du nombre de personnes atteintes de diabète de type II en France et dans le monde, nous voulons développer de nouvelles molécules antidiabétiques permettant de pallier les 5% d'échec thérapeutique de la metformine, antidiabétique mondialement prescrit, et comportant moins d'effets secondaires que les molécules retirées récemment du marché. 200 molécules ont été conçues par une personne expérimentée en leur prédisant le moins d'effets toxiques possibles avec la perspective d'obtenir entre deux et cinq molécules efficaces. Dans les premières expériences, l'animal nous servira à sélectionner des molécules sur la base de leur effet hypoglycémiant et de leur non toxicité aiguë et c'est la souris, avec sa petite taille, qui sera le rongeur le plus adapté au screening de ces molécules. Afin de s'assurer de l'efficacité des molécules sélectionnées et d'approfondir l'étude pharmacologique, nous prévoyons des expériences chez le rat. Les modèles de diabète de type 2 existants chez la souris et le rat seront utiles pour mettre en évidence les organes cibles et les mécanismes d'action des candidats-médicaments.

Une des cibles de nos molécules est la synthèse de glucose qui existe dans le foie et le rein de l'animal mais qui n'existe pas dans les lignées cellulaires. C'est pourquoi on ne peut remplacer l'animal dans notre projet.

Nous prévoyons d'utiliser sur 5 ans, environ 850 souris et 400 rats parmi lesquels différents modèles de diabète. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux, nous organiserons les lots d'animaux de façon à minimiser la taille des groupes tout en tenant compte de la variabilité de chaque souche animale afin de pouvoir pratiquer un test statistique fiable. Les animaux participeront à plusieurs tests à condition qu'ils ne présentent pas de modification de leur état général et en respectant un temps de repos entre 2 expériences ; cela réduit aussi le nombre d'animaux. Dans un souci de raffinement des méthodes, un temps d'acclimatation à l'expérimentateur est prévu de façon à réduire le stress animal et le gavage sera pratiqué sous un volume adapté à la taille de l'animal. Les glycémies seront mesurées sur quelques microlitres de sang prélevés à la veine latérale de la queue minimisant ainsi le risque de souffrance de l'animal. Dans les expériences nécessitant des prélèvements d'organes, les animaux seront systématiquement anesthésiés et un antalgique sera associé.

Nous établirons une grille de suivi des animaux avec la mesure de différents critères permettant d'évaluer les effets indésirables et potentiellement toxiques des molécules testées, comme par exemple un changement de poids, de comportement, d'apparence physique, etc. Si un ou plusieurs critère(s) évolue(nt) mal plusieurs jours de suite, l'animal sera écarté de l'expérience afin de se rétablir. Si malgré l'arrêt du traitement il ne se rétablit pas et montre de plus en plus de signes de souffrance, il sera euthanasié. Si plusieurs effets irréversibles sont notés, entraînant à plus ou moins long terme la mort de l'animal, la molécule sera abandonnée dans la suite des expériences.

4768. L'hyperpression oculaire est la principale cause de glaucome. Cette maladie grave et fréquente, le plus souvent indolore, touche principalement les personnes âgées de plus de quarante-cinq ans et peut entraîner une perte de la vision. Aujourd'hui dans le monde, soixante-dix millions d'individus sont atteints, un million en France.

Ce projet a pour but de contribuer au développement de nouveaux traitements médicaux en permettant d'identifier et de tester l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques visant à diminuer cette hyperpression et à protéger les cellules rétiniennes permettant la vision.

Compte tenu des particularités physiologiques et anatomiques de l'œil et l'absence pour l'instant de modèle alternatif, nous devons avoir recours à des animaux. Les informations bibliographiques recueillies, les analyses statistiques ainsi que notre expérience, nous permettent de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Pour ce projet, un maximum de 9800 rats et 9800 souris adultes sont prévus afin de valider les différents protocoles expérimentaux et de tester différents candidats à visée thérapeutique.

Cette pression étant un équilibre entre la production et l'élimination de l'humeur aqueuse (liquide transparent contenu dans l'œil) les protocoles réalisés, sous anesthésie, ont pour but de limiter son élimination. La mesure de la pression intraoculaire est réalisée à l'aide d'un appareil spécialement conçu pour cet usage. La prise de mesure n'entraînera aucune douleur et ne durera que quelques secondes. Il est important de rappeler qu'en plus de la notion d'éthique, il est dans l'intérêt du projet de réduire au maximum le stress ou la souffrance de l'animal car cela impacterait de manière significative la validité des mesures obtenues. Les examens effectués par la suite en imagerie ou en électrophysiologie pour étudier le fonctionnement des cellules de l'œil ainsi que certains traitements administrés par voie péri ou intraoculaire se font sous anesthésie générale afin d'immobiliser l'animal et de ne pas occasionner de stress pour celui-ci. Ces examens complémentaires ainsi que ces voies d'administration sont également pratiqués chez l'homme ou l'animal en ambulatoire et en clinique vétérinaire et peuvent dans la majorité des cas être réalisés sans anesthésie.

Afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux, un suivi quotidien des rongeurs est effectué. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces, permettant de limiter une éventuelle douleur à son minimum ainsi qu'un

enrichissement des cages d'hébergement sont mis en place. Ce projet a été évalué par un comité d'éthique composé d'un vétérinaire et sera suivi par la structure de bien-être animal de l'établissement.

4769. Le but de ce projet est de tester chez la souris une nouvelle molécule à visée thérapeutique dans le cadre d'une maladie rare, la glycogénose de type 1a. Le maintien de la glycémie autour de 100 mg/dl est crucial et nécessite la production de sucre par l'organisme dès la fin de la digestion d'un repas. La glycogénose de type 1a se caractérise par des hypoglycémies sévères lors de jeûnes courts entrainées par l'incapacité de l'organisme de produire du glucose (sucre) en dehors des repas. De plus, ces patients développent des pathologies associées à l'accumulation de glycogène (stock de sucre) et de graisses dans le foie et les reins.

La preuve d'efficacité de cette molécule a été démontrée dans un modèle de souris transgéniques qui développent la pathologie uniquement dans le foie. Ces souris sont un modèle unique pour cette étude puisqu'elles ne peuvent pas utiliser leur stock de glycogène et se caractérisent par un gros foie et une hypoglycémie légère au cours d'une période de jeûne court (6h de jeûne). Cependant, elles sont capables de réguler leur glycémie au cours d'un jeûne plus long grâce à une induction de la production de glucose par les reins et l'intestin, organes non touchés par la maladie. L'accumulation de glycogène dans le foie n'entraîne pas de souffrance ou mal-être chez les animaux jeunes qui seront étudiés (âgés de moins de 6 mois).

Lors d'une étude précédente, l'injection unique de cette molécule a permis aux souris atteintes de glycogénose de type 1a de diminuer significativement les stocks de glycogène après un jeûne prolongé de 24h et de réguler leur glycémie de façon similaire à des souris non malades. Ces premiers résultats, obtenus 4 jours après le traitement, sont très encourageants et ont permis de valider cette approche. Nous proposons maintenant d'étudier l'effet de plusieurs injections et plusieurs doses, administrées par voie intraveineuse et espacées sur 3 semaines, sur la régulation de la glycémie et l'utilisation des stocks de glycogène au cours d'une période de jeûne. Les souris traitées devraient être capables de produire du glucose grâce à la dégradation des stocks de glycogène du foie, et ainsi réguler leur glycémie. Pour analyser leur effet thérapeutique, ces molécules doivent être injectées chez l'animal avant de proposer de nouvelles perspectives de traitement aux patients.

Ce projet sera réalisé en respectant la règle des 3R.

Remplacement :

L'efficacité des molécules à tester a été validée in vitro en cellules mais seul le traitement des animaux atteints de GSD1 permettra de valider leur efficacité sur le tissu ciblé, c'est à dire le foie, après leur injection dans la circulation sanguine.

Réduction :

Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances de la pathologie dans ce modèle animal et du métabolisme glucidique (utilisation des stocks de glycogène du foie, régulation de la glycémie au cours du jeûne) et des résultats d'études précédentes ayant permis de valider la preuve de concept. Afin de pouvoir faire une analyse statistique, des groupes de 6 souris seront analysés. Au total, ce projet nécessitera l'obtention de 162 souris mâles transgéniques. Les souris femelles transgéniques non utilisées dans ce projet seront utilisées pour la reproduction ou incluses dans un autre projet. Un groupe de 12 souris non transgéniques sera utilisés comme contrôles.

Dans un souci de raffinement des méthodes, les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés régulièrement pour suivre leur prise de poids. Un anesthésique sera appliqué avant l'injection dans la veine de la queue. La connaissance du modèle animal a permis de définir des points limites. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation.

En conclusion, ces études réalisées chez la souris pourraient permettre de proposer une nouvelle approche thérapeutique dans le cadre de la glycogénose de type 1a. Au total, cette étude nécessitera 174 souris sur une durée de 1 an.

4770. L'œil sec est une maladie multifactorielle des larmes et de la surface oculaire aux manifestations cliniques variées qui concerne 5 à 35% de la population. Les symptômes (rougeurs, photophobie, douleurs, baisse de l'acuité visuelle...) impactent considérablement la qualité de vie des sujets et font l'objet de nombreuses études cliniques. Le projet présenté a pour objectif de mettre au point un modèle expérimental de sécheresse oculaire chez le rongeur et le lapin. Pour cela des procédures publiées seront mises en place et évaluées. Elles devront permettre de diminuer la sécrétion de larmes par l'administration de substances chimiques ou par l'ablation d'une partie des glandes lacrymales. Ce modèle doit permettre, une fois mis en place, de tester différentes classes pharmacologiques (substituts lacrymaux, anti-inflammatoires...).

Ce projet nécessite d'avoir recours à des animaux compte tenu des particularités de l'organe concerné. En effet, l'œil est composé de différents tissus de physiologie différente ne permettant pas d'utiliser pour l'heure un modèle alternatif.

Les informations bibliographiques recueillies, les analyses statistiques ainsi que notre expérience nous permettrons de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés à 8040 animaux par espèce pour la totalité du projet.

Une évaluation de la surface oculaire sera réalisée afin d'évaluer la quantité de larmes et l'atteinte cellulaire de la surface de l'oeil. Ces mêmes évaluations sont réalisées chez l'homme en cabinet médical ou chez l'animal en clinique vétérinaire et n'entraînent aucune douleur ou souffrance chez l'animal.

Afin de minimiser l'impact de ce projet sur le bien-être des animaux utilisés, un suivi quotidien des animaux sera effectué et des analgésiques seront administrés. De plus, des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet ainsi qu'un enrichissement des cages d'hébergement seront mis en place. Ce projet a été soumis et évalué par un comité d'éthique et sera suivi par la structure de bien-être animal de l'établissement.

4771. Le recrutement de cellules inflammatoires au niveau pulmonaire est évalué de façon très courante par la réalisation de lavages broncho-alvéolaires (BAL).

Cette technique est couramment utilisée au laboratoire pour de nombreux projets.

L'objectif de cette formation est d'apprendre et maîtriser cette technique par de nouveaux personnels.

D'un point de vue pratique nous utiliserons 3 lots de 8 souris chacun pour chaque formation. Le premier lot composé de 8 souris traitées avec une substance pro-inflammatoire, permettra un apprentissage de la technique. Le second lot également composé de 8 souris traitées avec une substance pro-inflammatoire, permettra d'évaluer la variabilité entre les différentes souris. Le troisième lot également composé de 8 souris traitées avec une substance pro-inflammatoire, permettra d'évaluer la variabilité entre deux expérimentations à plusieurs semaines d'écart.

Remplacement :

Pour réaliser cette formation, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle *in vitro* ou de culture cellulaire ne nous permet d'étudier le recrutement de cellules inflammatoires au niveau respiratoire. De plus, la souris est déjà largement utilisée et bien étudiée dans différentes pathologies inflammatoires au niveau pulmonaire comme l'asthme, du fait des similitudes avec la pathologie humaine.

Raffinement :

Le modèle utilisé ici n'engendre pas de douleur particulière. En cas d'observation de douleur, les souris recevront un traitement analgésique, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient mis à mort pour éviter toute souffrance. Enfin, le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés sera optimisé pour obtenir des résultats exploitables. En effet, 24 animaux par formation dispensée seront utilisés. Au cours du projet, nous prévoyons de former 3 personnes, ainsi 72 animaux seront utilisés.

4772. La dépression est une maladie fréquente touchant 350 millions d'individus dans le monde dont la sévérité peut engager le pronostic vital du fait du risque suicidaire, elle figure également parmi les affections les plus invalidantes. Par ailleurs, en cas de rémission, elle s'accompagne chez près de 50% des patients, de troubles cognitifs limitant la réhabilitation de ces patients. La plupart des antidépresseurs utilisés actuellement ont pour cible pharmacologique les systèmes aminergiques. Environ 30% des patients ne répondent pas de manière satisfaisante à ces traitements malgré plusieurs lignes de traitements bien conduites. Les antidépresseurs utilisés en pratique clinique courante présentent par ailleurs de longs délais d'action thérapeutique de l'ordre de 4 à 6 semaines lorsqu'ils sont efficaces. Il existe donc un important besoin clinique à combler (1) en matière de nouveaux traitements concernant les dépressions résistantes d'une part, (2) en matière de nouveaux traitements d'action plus rapide concernant l'ensemble des épisodes dépressifs d'autre part et (3) en matière de prévention des troubles cognitifs post-rémission.

Récemment, plusieurs résultats d'études convergent vers l'implication de mécanismes inflammatoires dans la dépression et les troubles cognitifs au sens large. Depuis quelques années, un certain nombre de preuves s'accumule sur l'effet antidépresseur de la kétamine, agent anesthésiant, et sur son action rapide en quelques heures notamment en contexte inflammatoire. Ces effets pourraient être liés à ses propriétés anti-inflammatoires médiées notamment en modulant l'action des cellules immunitaires du cerveau : la microglie. D'autres substances telles que la dexmédétomidine et les gaz inertes pourraient également avoir une activité modulatrice de la microglie. Il n'existe cependant à l'heure actuelle que des données parcellaires neuropathologiques et le plus souvent *in vitro* pour conforter ces hypothèses. Outre une meilleure compréhension des effets antidépresseurs de la kétamine, la dexmédétomidine et des gaz inertes, la caractérisation des effets bénéfiques, au niveau microglial mais aussi aux niveaux comportemental et cognitif, de ces substances dans les situations de neuroinflammation pourrait conduire à leur utilisation dans d'autres indications telles que la prévention de l'encéphalopathie septique ou les troubles cognitifs post-opératoires.

L'hypothèse principale sur laquelle est construite cette étude est la suivante : des anomalies neuro-inflammatoires pourraient être impliquées dans la physiopathologie de la dépression par le biais d'une activation microgliale. La kétamine, la dexmédétomidine et les gaz inertes pourraient inhiber l'activation microgliale au cours d'une inflammation systémique et ainsi prévenir ou traiter l'apparition de comportements dépressifs et des troubles cognitifs associés. Nous nous proposons donc d'étudier les liens entre ces molécules, neuro-inflammation, microglie et dépression selon trois axes :

- Etude de l'impact de la kétamine, la dexmédétomidine et des gaz inertes sur la cellule microgliale au niveau morphologique et fonctionnel dans un modèle de dépression inflammatoire (injection de lipopolysaccharide (LPS)),

- Etude de l'impact de de la kétamine, la dexmédétomidine et les gaz inertes sur les comportements dépressifs et les troubles cognitifs dans ce même modèle de dépression inflammatoire

- Et ainsi, caractérisation des corrélats comportementaux des effets de la kétamine, la dexmédétomidine et des gaz inertes sur les modifications microgliales.

Ces différents axes de recherche seront explorés chez des souris de laboratoire aux phases très précoces mais aussi tardives après induction d'un état de neuro-inflammation. Il n'existe en effet aucun modèle *in vitro* de cellule microgliale et de neurones au repos permettant de caractériser dans des conditions pertinentes, l'initiation, la progression et le traitement de la neuro-inflammation, ce qui nécessite l'étude de modèles *in vivo*. Cette étude nous permettra, à terme, de développer un essai préclinique et in fine de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la prise en charge de la dépression et plus vastement des troubles cognitifs rencontrés dans les situations de neuro inflammation.

Les expérimentations seront réalisées chez la souris. Nous utiliserons 936 souris mâles d'âge adulte (10 semaines). Elles seront réparties dans 3 procédures de classe de sévérité modérée différentes : (1) contrôle, les souris seront soumises à une injection

unique de LPS, kétamine, dexmédétomidine ou de mise en contact avec des gaz inertes, (2) préventif : préalablement à l'injection de LPS, les souris seront soumises à une injection unique de kétamine, dexmédétomidine ou de mise en contact avec des gaz inertes. (3) thérapeutique : concomitamment à l'injection de LPS, les souris seront soumises à une injection unique de kétamine, dexmédétomidine ou de mise en contact avec des gaz inertes. Aucune altération du bien être ni de l'état général de l'animal n'est attendue. Pour chaque expérimentation, nous mettrons en œuvre : (1) une analyse statistique de façon à déterminer le nombre optimal d'animaux nécessaire par groupe d'expérimentation, (2) des procédures d'anesthésie/analgésie pour toutes les manipulations qui le nécessitent et (3) des règles d'élevage en accord avec la réglementation pour limiter la souffrance et le mal être des animaux..

4773. Le vieillissement de la population mondiale a des conséquences économiques et sociales immédiates. Il est associé à une diminution des capacités régénératives et une forte augmentation des maladies chroniques incluant les cancers, le diabète et les maladies neurodégénératives. Par conséquent, comprendre la physiologie du vieillissement et décoder comment il permet ces changements est devenu l'un des plus urgent défis biomédical. La capacité de générer des CSPi (Cellules Souches Pluripotentes induites) à partir de cellules somatiques adultes a révélé certains mécanismes de la plasticité des cellules, c'est à dire leur capacité à changer de destin. Cette capacité à générer des CSPi représente un potentiel énorme pour la découverte de médicaments et la médecine régénérative. Cependant, les mécanismes de régulation de la plasticité des cellules somatiques pendant le vieillissement restent très peu connus ce qui a des conséquences directes sur l'amélioration de la durée et la qualité de vie. En outre, comprendre les impacts du vieillissement sur la plasticité des cellules somatiques permettra d'identifier les régulateurs majeurs de la régénération des tissus qui ont de claires implications dans la médecine régénératives.

Le vieillissement est un processus complexe et multifactoriel qui ne peut pas être entièrement mimé par des expériences in vitro. L'utilisation de la souris pour la recherche sur le vieillissement se justifie par le fait qu'elles reflètent fidèlement la physiologie et la biochimie humaine puisque ce sont des mammifères proches au niveau de l'évolution. Le court temps entre chaque génération, une génétique bien connue et la possibilité de mettre en place une variété de manipulations contrôlées in vivo (quand cela est justifié) fait de la souris un modèle idéal et probablement le seul modèle valable pour évaluer l'impact du vieillissement sur la plasticité cellulaire. Le modèle de souris reprogrammable présente les mêmes altérations génétiques dans le même fond génétique ce qui prévient la fluctuation des résultats dus aux variations génétiques entre les animaux et obtenir ainsi des résultats fiables tout en utilisant moins d'animaux. De plus, grâce à une analyse statistique appropriée des expériences proposées, il a été déterminé que 192 souris âgées de 3 à 24 mois et indépendamment du sexe serait le nombre suffisant de souris pour obtenir des résultats significatifs. Les protocoles qui seront utilisés dans ce projet ont été bien établis et publiés. Aucun de ces protocoles n'a montré d'effets indésirables majeurs sur les souris. Dans les expériences prévues, les droits des animaux seront respectés en tenant compte des contrôles stricts sur l'expérimentation animale appliqués par les Autorités compétentes. Si les animaux impliqués dans les expériences de tumorigenèse venaient à souffrir, ils seraient mis à mort par exposition au CO₂ et utilisés exclusivement comme donneurs de cellules pour des expériences in vitro. Le projet comporte 3 procédures, 2 de sévérité modérée et 1 de sévérité légère.

Ce projet fournira les connaissances nécessaires pour mieux comprendre les processus du vieillissement avec une incidence significative dans l'avancement de la modélisation des maladies, la découverte et le développement de médicaments ainsi que de potentielles applications cliniques. Tout cela pourra faciliter le développement de la médecine régénérative afin de pallier au vieillissement de la population et par conséquent aux maladies portants sur un vieillissement accéléré afin d'améliorer notre santé.

4774. La maladie d'Alzheimer (MA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente avec près de 26 millions de personnes souffrant de la maladie dans le monde, et 106 millions de personnes devraient être diagnostiquées avec la maladie en 2050. Il est essentiel de développer des thérapies pour l'Homme, pour la santé de notre population vieillissante. Pour ceci, il est impératif d'identifier les mécanismes moléculaires et des circuits neuronaux de la dégénérescence. Ceci est possible avec la manipulation génétique et moléculaire in vivo chez des animaux de laboratoire. On sait que le peptide bêta-amyloïde (A β), agent causal de la maladie, se lie au récepteur nicotinique $\alpha 7$. Cette interaction entraîne des modifications pathologiques dans une étape précoce de la MA. En plus, il existe des preuves significatives que la nicotine joue un rôle neuroprotecteur contre la MA chez l'Homme, et dans des modèles animaux les mécanismes de cette neuroprotection peuvent être établis. Par exemple, un traitement à court terme avec la nicotine réduit l'accumulation des plaques amyloïdes par 80%, et aussi restore le comportement cognitif de la souris. Il est donc essentiel de développer des modèles in vivo adaptés à l'étude du rôle des récepteurs nicotiniques dans la MA, ceci afin de comprendre leurs rôles, pour ensuite pouvoir intervenir avec des médicaments qui ciblent de façon spécifique les mécanismes pathogéniques.

Bien que des systèmes in vitro permettent d'étudier l'interaction directe entre la A β et le récepteur nicotinique, il est nécessaire d'étudier les conséquences de cette interaction dans l'animal in vivo, comme les troubles de la mémoire et les modifications moléculaires et cognitives qui sont les principales caractéristiques de la MA. Ceci n'est pas possible en culture.

Le but du projet est de développer des systèmes modèles pour pouvoir étudier cette interaction in vivo, comprendre les mécanismes impliqués dans la pathogénèse de la MA avec l'objectif final d'identifier des traitements efficaces. Ce projet comporte deux procédures, l'une classée en modérée et l'autre en sévère.

On propose d'utiliser une imagerie bi-photonique répétée chez le même animal. Ceci permettra d'observer des altérations de l'activité du cerveau dues à l'expression du peptide A β dans la même souris pendant le développement de la maladie. Ceci réduit de façon importante le nombre d'animaux nécessaires.

Les animaux seront surveillés chaque semaine pour : s'assurer que la pose de la fenêtre d'observation reste intacte, qu'il n'y a pas d'inflammation, ou de douleur détectable. Les animaux seront entraînés à l'observation par le deux-photons durant quatre sessions afin de réduire le stress de l'animal.

Ce projet utilisera jusqu'à 350 souris sur 3 ans.

4775. La coccidiose aviaire due à *Eimeria acervulina* est une pathologie fréquente qui cause des pertes de poids importantes lors de l'engraissement des poulets de chair. Elle provoque peu ou pas de mortalité mais les conséquences zootechniques sont importantes avec une baisse du gain de poids des animaux et une augmentation de l'indice de consommation qui induisent une perte sèche pour l'éleveur.

Elle affecte majoritairement les jeunes animaux de 1 à 15 semaines d'âge. A ce stade de la vie, le système immunitaire est encore considéré immature, rendant les animaux très sensibles à ce type d'affection. Il est difficile à l'heure actuelle de prévenir ces pathologies par un traitement efficace, sans risque pour l'environnement et sans risque de contamination des viandes destinées à la consommation humaine.

Notre laboratoire développe un immunostimulant capable d'activer rapidement le système immunitaire des animaux nouveau-nés afin de prévenir le développement des maladies infectieuses. La capacité de ce candidat produit à activer le système immunitaire a été initialement démontré *in vitro* et *in vivo* dans deux espèces, le mouton et la poule domestique. Cette activation du système immunitaire illustre le potentiel du produit, mais n'est en aucun cas une preuve d'efficacité objective vis à vis d'un pathogène donné.

L'objectif de ce projet est d'établir la preuve d'efficacité de ce produit comme un agent préventif de la coccidiose aviaire. Ces expérimentations seront réalisées sur une période de 12 mois et nécessiteront 258 animaux au total.

La règle des trois R a été strictement respectée.

Remplacement : Toutes les mesures de « remplacement » ont été considérées au préalable à cette expérimentation. Néanmoins, ce projet ne peut être traité seulement *in vitro* pour plusieurs raisons. D'une part, la coccidiose aviaire fait intervenir un cycle parasitaire qui n'a lieu que chez l'animal vivant. D'autre part, la maturation du système immunitaire requiert la libre interaction entre les cellules du système immunitaire et le parasite. Enfin l'efficacité réelle du produit nécessite une évaluation clinique et un score d'évaluation de lésion qui n'est faisable que sur l'intestin de l'animal. Afin d'établir la preuve d'efficacité de notre produit, nous devons donc conduire un test préclinique sur l'espèce cible.

Réduction : Le nombre d'animaux inclus dans le protocole a été réduit « Réduction » à son minimum grâce à un plan d'expérience optimisé pour obtenir le maximum de données scientifiques, tout en maintenant une validité statistique suffisante du modèle pour garantir l'interprétabilité des résultats.

Raffinement : la méthodologie expérimentale a, elle aussi, été raffinée à son maximum par l'utilisation de méthodes analytiques sensibles et reproductibles qui limitent, in fine, le nombre d'animaux inclus dans l'étude. De plus, pour limiter le stress et améliorer la qualité de l'expérience, les animaux seront élevés avec soin en présence d'un enrichissement à base de jouet et aucun prélèvement « vigile » n'est prévu, car ils auraient pu induire un stress ou une douleur pour l'animal. Les études seront menées en tenant compte des besoins éthologiques des volailles, en limitant leur stress et la souffrance au maximum.

4776. Pour traiter certaines maladies hématologiques, comme des leucémies, on recourt de plus en plus à la greffe de moelle osseuse. Le greffon, qui comporte des cellules du sang, donc parmi elles de l'immunité, sert à détruire les cellules malades de l'hôte et à remplacer ses cellules sanguines ; mais il peut reconnaître les tissus de l'hôte comme étranger et déclencher une réponse immunitaire contre lui : c'est la maladie du greffon contre l'hôte (GvH). Cette maladie se déclare à 40 % dans les semaines ou mois suivant une greffe de moelle osseuse ; la survie à un an est de 50 %.

Aujourd'hui, la GvH est traitée par immunosuppresseurs. Or, ils diminuent la capacité du greffon à détruire les cellules sanguines malades de l'hôte.

Notre projet vise donc à étudier la GvH et essayer de l'éviter, ou d'en minimiser l'intensité. Notre stratégie consiste à traiter les souris avec une préparation purifiée de glycoprotéine 96 (Gp96), protéine au pouvoir de modulation de la réponse immunitaire, qui pourrait donc éviter l'activation des cellules immunitaires du greffon contre les tissus de l'hôte.

Nous purifierons cette protéine à partir de foies et de rates de souris (utilisées à cet effet). Il n'est pas possible d'utiliser la protéine Gp96 commerciale, car elle n'est pas totalement identique à la Gp96 « naturelle », et des études ont montré qu'elle serait probablement inefficace.

Un modèle animal est nécessaire car l'objectif est de tester l'efficacité d'une vaccination *in vivo*. Le modèle GvH chez la souris est bien décrit dans la littérature et déjà maîtrisé dans notre laboratoire. Il nous permettra d'observer l'effet du traitement sur l'état clinique des souris selon une méthode établie (score clinique basé sur l'observation de symptômes connus), et d'explorer la réaction de leurs organismes organe par organe.

Nous estimons à 96 le nombre total de souris utilisées sur la durée du projet pour obtenir des résultats statistiquement exploitables, y compris les souris utilisées pour la purification de la protéine Gp96.

Ce nombre d'animaux a été réduit au maximum et estimé à partir de notre expérience dans le design d'études similaires. Il correspond au nombre minimal permettant d'obtenir une étude statistique valable avec les tests prévus.

Toutes les souris seront surveillées attentivement pendant la durée de l'étude ; si elles atteignent les points limites établis (score clinique supérieur à 5/10), elles seront euthanasiées selon l'une des méthodes acceptées par la législation.

Les souris seront hébergées dans un environnement enrichi et adapté pour réduire le risque d'infections et de l'eau et de la nourriture seront mises à disposition facilitée pour éviter déshydratation et dénutrition.

Nous nous attendons que les souris GvH vaccinées avec la préparation purifiée de Gp96 endurent une maladie atténuée. L'exploration sur leurs organes doit montrer les signes de dégâts moindres et d'une activation immunitaire moindre par rapport aux souris GvH non vaccinées.

Ces résultats pourraient ouvrir la voie à une approche thérapeutique visant à améliorer la prise en charge des patients atteints par la GvH.

4777. L'Organisation Mondiale de la Santé Animale définit le bien-être animal notamment par la possibilité de l'animal d'exprimer des comportements normaux. Cette liberté d'expression comportementale peut être permise par l'enrichissement du milieu de stabulation des animaux. Le but premier de ce projet est d'étudier l'effet de différents degrés d'enrichissement sur la physiologie et le comportement des souris. Le poids et les consommations d'eau et de nourriture seront suivis pour évaluer si l'enrichissement a un effet sur la physiologie des souris. Des tests comportementaux non invasifs permettront de comparer l'émotivité, la locomotion et la sociabilité des souris hébergées dans des cages avec plus ou moins d'enrichissements. Pour ce projet visant à améliorer le bien-être des animaux au sein de l'animalerie en leur octroyant un milieu de stabulation plus adapté à leurs besoins, il ne peut pas être envisagé une autre alternative que de travailler sur des organismes vivants. Cependant, dans le but de réduire le nombre total d'animaux utilisés, ces mêmes animaux feront partie d'un second protocole. Un test de puissance a été réalisé pour déterminer le nombre minimal d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats analysables statistiquement pour ces études : 76 animaux participeront ainsi à ce projet. La seconde partie de l'étude vise à tester 6 mélanges anesthésiques différents afin de comparer leur efficacité tant sur la profondeur de l'anesthésie que sur la durée, ou encore la vitesse d'induction et de réveil. Un score sera utilisé pour estimer la profondeur de l'anesthésie et déterminer ainsi les mélanges qui permettent d'atteindre une anesthésie suffisante pour effectuer des actes chirurgicaux. En outre, un électrocardiogramme, la pression non invasive et des mesures de saturation en oxygène seront effectués pour déterminer l'impact des différents mélanges sur les paramètres hémodynamiques.

Cette étude a donc pour but, à court et moyen terme :

- d'optimiser l'enrichissement, et donc le bien-être, des souris au sein de l'animalerie.

- de proposer de nouveaux protocoles anesthésiques plus performants et plus adaptés aux futurs projets du laboratoire.

Compte tenu de l'aspect très peu invasif de cette étude et afin de réduire encore le nombre global d'animaux utilisés dans le laboratoire, il est envisagé de replacer les souris de cette étude, après avis du vétérinaire référent, dans deux autres protocoles déposés par ailleurs.

4778. Les cellules lymphoïdes innées (ILCs) jouent un rôle fondamental dans l'initiation et la régulation des réponses immunitaires. Trois types de réponses immunitaires sont déployées contre les pathogènes et les dommages tissulaires, parmi lesquelles les ILC1s sont requises contre les infections intracellulaires, portées par les virus et certaines bactéries, ainsi que contre les cellules tumorales. Néanmoins, ces mêmes cellules sont aussi impliquées dans les réactions auto-immunitaires. Disséquer leur rôle dans ces phénomènes de défense immunitaire est d'une importance reconnue pour combattre les infections virales et l'auto-immunité, mais les modèles animaux permettant ces études n'ont pas été disponibles jusqu'à ce jour. Nous avons développé un modèle murin unique permettant la déplétion des ILC1s de façon inductible et réversible, et ainsi, l'exploration de ces phénomènes complexes. Ces souris permettent aussi, dans le futur, d'étudier des voies thérapeutiques nouvelles contre les infections virales et l'auto-immunité.

Dans ce projet, les souris IND1 seront utilisées afin de détecter et d'étudier les ILC1s dans les tissus d'une souris normale, ou souffrant d'infection virale, bactérienne ou d'une inflammation auto-immunitaire. Les ILC1s seront éliminées spécifiquement par l'injection indolore d'une toxine bactérienne qui ne ciblera que ces cellules, et les réactions immunitaires et physiologiques de la souris seront étudiées en détail. Ce projet mènera au ciblage ou à l'utilisation des ILC1s dans des stratégies préventives ou thérapeutiques.

Huit procédures expérimentales sont proposées pour remplir les objectifs de ce projet, dont le niveau de sévérité n'excède pas le niveau modéré. Les perturbations induites chez les souris sont ceux d'une infection, contrôlée, par des virus, des bactéries, ou d'une inflammation auto-immunitaire, et qui n'excède pas un degré de souffrance modéré. La complexité des phénomènes étudiés exigent une étude *in vivo*, dont le remplacement est impossible à ce jour. Néanmoins, le nombre de souris utilisées est limité au maximum statistique requis dans les expériences et leur répétition. Finalement, le raffinement des expériences est assuré par une étude moléculaire et cellulaire détaillée des phénotypes, ce qui permet une limitation de la durée expérimentale et de la souffrance. Ces procédures expérimentales impliquent l'utilisation de 1000 souris d'âge adulte des deux sexes.

4779. Les cellules lymphoïdes innées (ILCs) jouent un rôle fondamental dans l'initiation et la régulation des réponses immunitaires. Trois types de réponses immunitaires sont déployées contre les pathogènes et les dommages tissulaires, parmi lesquelles les ILC2s sont requises contre les infections par les vers, pour la réparation tissulaire et le métabolisme du glucose. Néanmoins, ces mêmes cellules sont aussi impliquées dans les réactions allergiques. Disséquer leur rôle dans ces phénomènes de défense immunitaire, de réparation et de régulation métabolique est d'une importance reconnue pour combattre les allergies, les pathologies fibrotiques et le diabète, mais les modèles animaux permettant ces études n'ont pas été disponibles jusqu'à ce jour. Nous avons développé un modèle murin unique (FID2) permettant la déplétion des ILC2s de façon inductible et réversible, et ainsi, l'exploration de ces phénomènes complexes et dans le futur, l'identification de nouvelles voies thérapeutiques contre l'allergie, la fibrose et les infections parasitaires. Dans ce projet, les souris FID2 seront utilisées afin de détecter et d'étudier les

ILC2s dans les tissus d'une souris normale, ou souffrant d'infection parasitaire, d'allergie, de dommage tissulaire ou encore d'un état pré-diabétique. Les ILC2s seront éliminées spécifiquement par l'injection indolore d'une toxine bactérienne qui ne ciblera que ces cellules, et les réactions immunitaires et physiologiques de la souris seront étudiées en détail. Ce projet mènera au ciblage ou à l'utilisation des ILC2s dans des stratégies préventives ou thérapeutiques. Huit procédures expérimentales sont proposées pour remplir les objectifs de ce projet, dont le niveau de sévérité n'excède pas le niveau modéré. Les perturbations induites dans les souris sont celles d'une infection contrôlée par des vers intestinaux, l'alimentation riche en graisse, l'allergie pulmonaire ou la blessure localisée. Les souris sont suivies quotidiennement et tout signe d'inconfort entraînera la mise à mort de la souris. La complexité des phénomènes étudiés exigent une étude in vivo, dont le remplacement est impossible à ce jour. Néanmoins, le nombre de souris utilisées est limité au minimum statistique requis dans les expériences et leur répétition. Finalement, le raffinement des expériences est assuré par une étude moléculaire et cellulaire détaillée des phénotypes, ce qui permet une limitation de la durée expérimentale et de la souffrance. Ces procédures expérimentales impliquent l'utilisation de 1900 souris d'âge adulte des deux sexes.

4780. L'objectif de ce travail est de caractériser les mécanismes physiopathologiques impliqués dans une maladie rare, l'holoprosencéphalie, afin d'en améliorer le diagnostic. Cette pathologie possède un mode de transmission multigénique et résulte d'un défaut de formation du cerveau lors du développement embryonnaire.

Notre projet implique l'utilisation de la souris comme modèle vertébré pour produire des embryons. Ces embryons sont ensuite utilisés pour étudier la mise en place de cette malformation.

La procédure qui justifie cette demande d'autorisation est l'administration intragastrique (ou gavage) de vismodegib et le prélèvement de fœtus. Le vismodegib est un médicament antinéoplasique oral utilisé en cas de carcinome basocellulaire mais est utilisé dans notre étude comme un antagoniste des protéines de la famille hedgehog, qui sont impliquées dans le développement embryonnaire du cerveau.

Le nombre de souris femelles utilisé sera de 50 et le nombre de fœtus de 40. Les souris femelles gestantes seront gavées avec une dose unique de vismodegib et 6 jours après les embryons seront prélevés.

Ce projet respecte la règle des 3R :

- Une première étude a été précédemment réalisée sur des œufs de poulet fécondés. Ce qui nous a permis d'obtenir des résultats préliminaires chez le modèle vertébré sans engager de souffrance aux animaux (Réduire).

- De plus nous n'avons pas à définir la concentration d'antagoniste à utiliser ni le stade embryonnaire auquel administrer le traitement car ça a déjà été fait (Raffiner).

- La mise en place de cette pathologie implique des processus de développement embryonnaire complexes qui ne peuvent pas être reproduit à l'échelle de la cellule. Le développement du cerveau embryonnaire est très conservé entre les mammifères, le modèle murin est donc le bon modèle pour étudier la physiopathologie de l'Holoprosencéphalie (Remplacer).

4781. Le cancer du poumon est le cancer le plus meurtrier chez la population adulte en Europe et en Amérique du Nord. Une grande partie des patients ne réalise que tardivement qu'ils sont atteints d'un cancer du poumon et lorsque la maladie a atteint un stade avancé, il devient impossible d'avoir recours à la chirurgie pour retirer la tumeur. Les patients sont traités par chimiothérapie, mais le corps développe fréquemment une résistance aux agents chimiothérapeutiques au cours de la première année de traitement. La radiothérapie serait donc la seule option thérapeutique permettant à ces patients de prolonger leur durée de vie.

La radiothérapie conventionnelle du poumon s'accompagne de risques élevés : développement d'une infection aiguë du tissu pulmonaire (la pneumonite) et le développement consécutif d'une fibrose pulmonaire. Celle-ci peut entraîner la mort du patient ou réduire de manière significative sa qualité de vie, puisque celui-ci respirera sous oxygène artificiel.

En raison de ce risque très élevé, l'irradiation du poumon est limitée à environ 20 Gy en radio-oncologie clinique. Cette dose de radiations n'est malheureusement pas assez élevée pour pouvoir traiter de manière efficace le cancer du poumon. Aujourd'hui, l'espérance de vie moyenne d'un patient atteint de cancer du poumon (cancer bronchique non à petites cellules) est d'environ 2 ans après le diagnostic de la maladie.

Au cours des dernières décennies, une stratégie prometteuse pour établir de nouvelles thérapies contre le cancer a émergé : une radiothérapie avec fractionnement spatial avec émission d'un flux très élevé de photons à basse énergie. À l'inverse de la radiothérapie par faisceau large, que la pratique clinique utilise de nos jours, le tissu sain présente une tolérance plus élevée pour la radiothérapie avec fractionnement spatial. Une dose de radiations plus élevée peut donc être appliquée en très peu de temps à la tumeur, sans entraver le fonctionnement normal du tissu sain. Les résultats obtenus précédemment par notre équipe et d'autres groupes de recherche ont démontré que, grâce au fractionnement spatial, les cellules cancéreuses résistantes aux radiations sont détruites, tout en préservant le fonctionnement du tissu sain.

La radiothérapie avec fractionnement spatial sur les tissus cérébraux n'a entraîné que peu de déficits fonctionnels du cerveau alors que les doses administrées étaient nettement supérieures à celles délivrées lors d'une radiothérapie conventionnelle. Aucune donnée n'est disponible concernant l'impact de la radiothérapie avec fractionnement spatial sur le tissu pulmonaire.

Notre hypothèse de travail est que les caractéristiques fonctionnelles et morphologiques (c'est-à-dire la bonne préservation des fonctions et de la morphologie du tissu) restent inchangées après une irradiation du poumon avec fractionnement spatial.

Nous souhaitons développer une radiothérapie qui permette aux patients atteints d'un cancer du poumon de vivre plus longtemps et de préserver leur qualité de vie.

L'objectif de ce projet, intégré dans un projet de recherche plus vaste subventionné par l'Union Européenne, est de :

a) déterminer la toxicité de la radiothérapie avec fractionnement spatial pour le poumon (c'est-à-dire, les doses de radiations et les géométries de faisceaux qui provoquent la pneumonite et la fibrose du poumon, si elles la provoquent), et b) découvrir les réactions exactes du tissu pulmonaire et d'autres tissus du corps des animaux irradiés, suite à leur exposition aux radiations (radiobiologie).

Chaque expérience a été entreprise en veillant à respecter le plus possible les animaux utilisés à ces fins expérimentales, afin d'éviter toute souffrance animale, dans le respect de la règle des 3 R. Pour ce faire,

1. nous coopérerons avec une équipe de mathématiciens, de statisticiens et de physiciens spécialistes dans le domaine de la modélisation des radiations et des réactions que peuvent présenter le tissu afin d'optimiser les plans de traitement qui feront l'objet de tests et ;

2. pour une partie des études de radiobiologie, nous utiliserons un modèle récemment développé de biodosimétrie pour les animaux de petite taille, afin de ne pas utiliser d'animaux vivants.

L'expérience doit cependant être conduite sur un nombre d'animaux suffisamment élevé pour nous permettre d'obtenir une puissance statistique significative et de pouvoir ainsi tirer des conclusions. Le nombre total d'animaux utilisés au cours des trois prochaines années sera de 883 souris et / ou rats. Nous prévoyons d'effectuer ces expériences sur des souris. La viabilité technique de ce choix sera testée au cours de l'expérience n°1. Si celle-ci échoue, et uniquement dans ce cas, nous changerons d'espèce et travaillerons sur des rats. C'est uniquement en réalisant ces expériences sur des animaux vivants qu'il est possible de standardiser les conditions expérimentales et d'obtenir des résultats avec une puissance statistique pertinente (ce qui n'est pas le cas lorsque les conditions ne sont pas standardisées et que l'on utilise un nombre plus faible d'animaux atteints de tumeurs spontanées).

4782. Avec près de 7 millions de décès par an, le cancer (tous types confondus) représente en ce début de 21ème siècle environ 12% des décès humains au niveau mondial, valeur qui n'est dépassée que par celles des maladies cardio-vasculaires (30%) et des maladies infectieuses (19%). Du fait notamment du vieillissement de la population, le cancer est un enjeu majeur de santé publique dans les pays développés. Plus de 70% des décès imputables au cancer sont enregistrés dans des pays pauvres ou en voie de développement. Des études indiquent que le nombre de décès imputables au cancer a augmenté d'environ 30% dans les pays développés sur la période 1990-2010, contre plus du double (71%) dans les pays en voie de développement, et ce, en dépit des progrès thérapeutiques réalisés.

L'identification de nouvelles cibles tumorales et de nouveaux modes d'action thérapeutique pour le contrôle et/ou l'éradication des tumeurs chez les patients reste donc une priorité. Cet objectif est sérieusement contrarié par l'absence de modèles pleinement représentatifs de la maladie humaine. Ce besoin est d'autant plus important pour le test préclinique de nouvelles molécules anti-tumorales qui nécessitent la présence de cellules immunitaires humaines pour valider leur mode d'action, et pour lesquelles toute évaluation dans un modèle in vitro et dans un modèle animal classique est peu informative.

Pour répondre à ce besoin, nous souhaitons générer de nouveaux modèles expérimentaux des cancers humains, dans un système faisant intervenir des cellules immunitaires humaines. Nous avons déjà pu établir, la pertinence du recours à la génération d'un modèle animal humanisé pour le système immunitaire (HSI).

Dans le cadre de ce projet, nous développerons pour différents types de tumeurs humaines, de nouveaux modèles animaux doublement humanisés (HSI et tumeurs), avec une double perspective : (i) identifier et caractériser expérimentalement les interactions entre le système immunitaire humain et des tumeurs humaines ; et (ii) établir une plate-forme préclinique pertinente pour le développement et le criblage de nouvelles approches thérapeutiques. Ces nouveaux modèles seront validés avec des molécules anti-tumorales connues, puis ils seront confrontés à de nouveaux traitements expérimentaux contre différents types de tumeurs humaines. Cela sera effectué au travers d'un suivi régulier des animaux par imagerie (non invasive), de prélèvements sanguins permettant d'identifier des biomarqueurs de l'activité immunitaire, et de prélèvements de tissus pour juger de l'efficacité anti-tumorale des molécules testées. Toutes ces expérimentations seront effectuées en limitant la douleur des animaux : des protocoles d'anesthésie et d'analgésie préalablement réfléchis seront mis en place.

Un nombre de 1500 rongeurs, nés et élevés dans des établissements agréés seront utilisés sur une période de 5 ans. Ce nombre a été calculé comme le minimum nécessaire pour mener à bien l'ensemble des études prévues dans ce projet.

4783. Etude in vivo de l'efficacité antivirale de composés chimiques inhibiteurs de l'infection par le virus de la Dengue

Selon les chiffres 2008, la dengue serait l'arbovirose la plus répandue au monde, avec environ 55 % de la population mondiale exposée au virus, soit 3,6 milliards de personnes, 124 pays endémiques, 70 à 500 millions d'infections (symptomatiques ou non) par an, dont 36 millions de cas de dengue classique, 2,1 millions de formes sévères (formes hémorragiques et formes avec syndrome de choc) et 21 000 décès. Le virus de la Dengue appartient au genre Flavivirus et est transmis par la piqûre de moustique. Il existe quatre sérotypes distincts du virus de la dengue étroitement apparentés et entraînant les mêmes signes cliniques. Même s'ils sont très proches les uns des autres, il n'existe pas de protection immunitaire croisée entre eux. Ainsi un même individu peut être atteint plusieurs fois par la dengue, une fois par chacun des quatre sérotypes. Un seul vaccin a été mis sur le marché. Aucun traitement curatif spécifique antiviral de la dengue n'est cependant disponible actuellement. L'objectif du projet est donc l'étude d'efficacité de nouveaux composés antiviraux spécifiques de l'infection par le virus de la Dengue qui auront été préalablement sélectionnés sur des modèles cellulaires. Ces composés seront testés sur un modèle animal murin mimant l'infection humaine afin de valider leur intérêt dans un organisme complexe.

Les bénéfices attendus découlant du projet sont le développement de nouvelles thérapies antivirales prophylactiques ou curatives contre l'infection par le virus de la dengue.

Pour reproduire la maladie humaine, les souris vont être injectées avec le virus de la Dengue. Elles seront en parallèle traitées par les composés à tester et monitorées avec des prélèvements sanguins réguliers. Les animaux seront suivis quotidiennement, le degré d'infection évalué et ils seront euthanasiés si le point limite éthique est atteint. Tous les animaux seront euthanasiés en fin d'expérimentation avec toutes les considérations éthiques inhérentes à l'euthanasie de sujets sensibles.

La règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) sera appliquée. Concernant le remplacement, il est impossible à l'heure actuelle de reproduire toute la complexité d'un organisme vivant avec des systèmes cellulaires, ceci est d'autant plus vrai lorsqu'il s'agit d'étudier l'efficacité d'une thérapie antivirale où la réponse immunitaire et les facteurs de pharmacocinétiques entrent en jeu. Concernant la réduction, le nombre d'animaux estimé est basé sur notre expérience et sur l'étude de biostatisticiens afin d'évaluer le nombre minimal d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats exploitables et fiables. Nous estimons l'utilisation d'un maximum de 1200 animaux sur 3 ans pour tester 10 composés. Concernant le raffinement, les souris seront logées dans une animalerie adéquate, en groupes, dans des cages comportant une litière avec enrichissement, une boisson et une nourriture adaptées. Les doses infectieuses administrées seront évaluées afin de minimiser la douleur de l'animal en restant en adéquation avec les objectifs scientifiques de l'étude.

4784. La maladie de Huntington (HD) est une maladie neurodégénérative progressive et fatale pour laquelle aucun traitement n'est disponible à ce jour. Cette pathologie à transmission autosomale dominante se caractérise par des troubles moteurs, cognitifs et psychiatriques. Au niveau moléculaire la maladie de Huntington est due à une mutation du gène codant pour la protéine « huntingtine » conduisant à la création d'agrégats formant des corps d'inclusion nucléaires caractéristiques de la pathologie, et ceci entraîne une perte massive des neurones du striatum.

Il existe actuellement des modèles de souris transgéniques exprimant le gène muté de la protéine huntingtine humaine. Parmi ces modèles, la souris R6/1 (qui exprime un transgène avec environ 115 répétitions CAG) est celui dont l'évolution des symptômes suit le plus fidèlement la pathologie humaine. En effet, de précédentes études ont montré que ces animaux présentent une progression lente de la maladie. Les inclusions intracellulaires apparaissent à partir de l'âge de 9 semaines, les troubles comportementaux à l'âge de 8–10 semaines (test rotarod) et 14 semaines (test du tail clasping) ; ces différents symptômes s'aggravent par la suite avec l'âge des animaux. En outre, les souris R6/1 présentent des déficits cognitifs qui sont observés avant l'apparition des symptômes moteurs, ainsi qu'une altération des comportements sociaux, et leur espérance de vie est de 32 à 40 semaines (contre plus de 2 ans pour une souris Wild type).

Notre projet consiste à caractériser l'altération des réseaux neuronaux (ganglion de la base) chez la souris transgénique R6/1, modèle murin de la maladie de Huntington afin : (1) de décrire le dysfonctionnement au niveau cellulaire permettant de rendre compte des déficits comportementaux, (2) de proposer un outil permettant de suivre l'évolution temporelle de la pathologie, (3) de confirmer la pertinence du modèle, et (4) de mettre en évidence l'efficacité des traitements pharmacologiques au niveau cellulaire/réseau, puis au niveau intégré (comportement).

Le projet, en renouvellement, implique 1540 animaux qui comprend 10-20 % des animaux utilisés pour l'ajustement des techniques biochimique, électrophysiologique et comportementale déjà en place ou à mettre en place. Comme mentionné plus haut, les souris en tant que modèle animal de cette maladie héréditaire représente un outil indispensable, les études sur l'animal vigile sont nécessaires et irremplaçables par celles sur des tissus en culture / en tranche, les organes perfusés ou des fractions subcellulaires lorsque notre étude porte sur le dysfonctionnement des réseaux nerveux "en action". Le nombre d'animaux utilisés tient compte du fait qu'un nombre minimal (n=15) par groupe expérimental est nécessaire pour assurer la solidité des observations par des analyses statistiques paramétriques suivant un plan expérimental complet et rigoureux.

Tous les efforts requis afin de diminuer le discomfort et la souffrance des animaux étudiés seront mis en place. Ces précautions respectent les principes de 3R (remplacement, réduction, raffinement).

4785. Les troubles du spectre autistique (TSA) résultent d'un désordre neuro-développemental et sont reconnus en France comme un handicap depuis 1996. Ils touchent 1% de la population mondiale. Les individus atteints par les TSA présentent des troubles cognitifs et comportementaux variables : altération de l'interaction sociale réciproque, du langage et de la communication non verbale (contact visuel, intonations, etc.), comportements répétitifs et stéréotypés, intérêt restreint, et intolérance au changement. Les TSA peuvent aussi s'accompagner de retards mentaux et plus généralement de difficultés dans les apprentissages, de troubles du sommeil et d'une prédisposition à l'épilepsie (1/3 des patients environ).

Les syndromes à caractéristiques autistiques dont les causes génétiques sont bien définies représentent moins de 10% des patients. D'autre part, les mécanismes neuronaux (structures cérébrales et types cellulaires concernés) impliqués dans ces troubles, notamment ceux qui régissent l'interaction sociale (comportement principalement altéré) sont encore très peu connus. La compréhension des bases neurales de l'interaction sociale qu'elle soit physiologique ou pathologique dans le cadre de l'autisme apparaît donc indispensable à la fois pour la découverte de biomarqueurs des TSA, mais également pour fournir de nouvelles pistes thérapeutiques.

Dans cette optique, les recherches sont orientées sur l'identification de gènes de susceptibilité à l'autisme, par le biais d'études épidémiologiques. Les mutations identifiées chez des patients sont ensuite reproduites dans des modèles murins afin d'étudier in vivo les modifications comportementales qu'elles induisent, ainsi que les effets cellulaires et moléculaires susceptibles de les causer. Dans ce contexte, de nombreuses études pointent la convergence fonctionnelle entre les gènes liés à l'autisme et les voies impliquées dans le développement synaptique, la plasticité et la signalisation, notamment hippocampiques. La théorie prédominante postule que les TSA surviennent en raison d'une dérégulation de mécanismes dépendants de l'activité neuronale, à savoir le développement et le fonctionnement de la synapse.

L'étude de ces modèles aux niveaux cellulaire et moléculaire a permis de déceler des altérations au niveau des épines dendritiques des synapses glutamatergiques, notamment hippocampiques, en corrélation avec des phénotypes comportementaux dits « autistiques », soit des altérations du comportement social.

Notre projet consiste à étudier les modifications des réseaux neuronaux hippocampiques chez des modèles murins de l'autisme, en corrélation avec les modifications comportementales observées. Ces enregistrements électrophysiologiques permettront l'étude de l'activité unitaire des cellules, aussi bien que le potentiel de champ local, lors des comportements sociaux, de sommeil, ou d'épilepsie.

Ce projet nécessite l'utilisation d'animaux comme modèles de l'autisme, afin de réaliser les enregistrements électrophysiologiques en condition réelle de comportement social (interaction directe avec un autre individu, ou avec des odeurs ou vocalisations). Cette méthode expérimentale est la seule qui permette l'étude de l'activité neuronale unitaire et de réseau réelle en réponse à des stimuli sociaux complexes. Le nombre d'animaux sera réduit au maximum, notamment en réutilisant autant que possible les souris dans les différents tests de comportement (social, sommeil, épilepsie). Il est envisagé l'utilisation de 260 animaux. A chaque étape du projet, une attention particulière sera apportée au bien-être animal, et nous éviterons toute souffrance ou stress inutile. Des paramètres comportementaux et physiques ainsi que les points limite correspondants ont été définis, qui permettront d'évaluer au jour le jour le confort et le bien-être animal, et d'apporter le cas échéant une réponse adaptée et immédiate, soit par une modification du protocole ou des conditions d'hébergement, soit par l'euthanasie de l'animal.

4786. L'allergie alimentaire constitue un problème majeur de santé publique du fait de sa prévalence et de la gravité des symptômes qu'elle engendre. Les mécanismes immunitaires conduisant à la sensibilisation et à l'allergie sont encore mal connus bien qu'il semble que la peau pourrait être une voie de sensibilisation. Cependant, la voie cutanée est également impliquée dans l'induction de tolérance.

Dans ce cadre, nous souhaitons étudier les mécanismes immunitaires au niveau de la peau et des organes immunitaires associés (ganglions) impliqués dans ces phénomènes de sensibilisation et/ou de désensibilisation afin de les comprendre et de pouvoir éventuellement intervenir dessus.

Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). En effet, nous projetons de réduire le nombre de souris utilisées tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, nous envisageons donc d'utiliser, sur une période de 5 ans, 16490 souris âgées de 5 semaines. Le bien-être des animaux (raffinement) est également pris en compte, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées avec la mise en place d'une diversification du milieu (ajout de papier cartonné permettant la nidification, maisonnette, musique). Aucun test *in vitro* (remplacement) ne permet d'intégrer la réaction immunitaire de la peau et des organes immunitaires associés dans leur ensemble dans le cadre de l'allergie.

4787. Environ 10% des décès dans le monde sont d'origine traumatique et 30 à 40% d'entre eux sont liés à une hémorragie. Le choc hémorragique est ainsi la deuxième cause de mortalité après les traumatismes crâniens. L'état de choc se caractérise par une hypoxie tissulaire systémique persistante, conséquence de la diminution de la volémie plasmatique et de la perte des hématies transportant l'oxygène. Pour tenter de compenser le manque d'oxygène au niveau tissulaire, le métabolisme anaérobie sera activé. Une acidose lactique, la production de radicaux libres et de protons sont ainsi observées entraînant inflammation et mort cellulaire dont les conséquences (défaillance multi-viscérale et coagulopathie) engagent le pronostic vital du patient. En conséquence, améliorer l'oxygénation tissulaire en cas de choc hémorragique présente un intérêt majeur dans la prise en charge du choc hémorragique. Parmi les pistes potentielles, les substituts d'hémoglobine dont celui développé à partir de l'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* apparaît être un excellent candidat. En effet, ce substitut a démontré sa grande capacité de fixation de l'oxygène (156 molécules d'O₂ à saturation). Si l'innocuité de ce substitut a été montrée (pas de mortalité après injection chez la souris), son efficacité dans le cadre de la prise en charge du choc hémorragique n'a jamais été évaluée. Ce projet nous permettra de mieux comprendre les effets de cette molécule et son intérêt dans le cadre du choc hémorragique. Les travaux réalisés se veulent au plus proche « du terrain ». Ainsi, les protocoles expérimentaux réalisés sur modèle murin seront calqués sur les modalités de prise en charge clinique du choc hémorragique non contrôlé. In fine, l'objectif est de réaliser des travaux précliniques permettant d'évaluer l'intérêt et l'innocuité de M101 dans le cadre de la prise en charge du choc hémorragique non contrôlé avant de proposer, en fonction des résultats, des essais cliniques.

Ce projet a une durée de 12 mois. Il a pour objectif d'évaluer les effets d'un substitut de l'hémoglobine sur la coagulation et l'inflammation. Il impliquera l'utilisation de 150 rats Sprague Dawley.

Les expérimentations seront réalisées dans le respect de la règle des 3R :

- le nombre d'animaux utilisés est limité au minimum permettant une étude statistique cohérente.
- Le raffinement est respecté au niveau des conditions d'hébergement des animaux et au niveau des procédures d'anesthésie/Analgésie.

Les résultats attendus sont une amélioration significative de la coagulopathie entraînée par un choc hémorragique et des processus inflammatoires des rats bénéficiant d'une prise en charge par le substitut d'hémoglobine par rapport aux rats avec une réanimation conventionnelle ainsi que vis-à-vis du groupe contrôle. A terme l'objectif est le développement d'une solution de réanimation utilisable en perfusion par voie intraveineuse assurant à la fois une oxygénation tissulaire et un maintien de la volémie.

En clinique humaine cette solution remplacerait l'association soluté d'expansion volémique et concentré sanguin globulaire (issu des collectes de sang) utilisés actuellement. Cette nouvelle solution s'affranchirait des contraintes liées à l'histocompatibilité des groupes sanguins A/B/O rhésus. La solution permettrait un usage hospitalier et extrahospitalier afin d'assurer une ré-oxygénation

tissulaire précoce des tissus en souffrance anoxique tel que les chocs hémorragiques, les pneumonies graves, les infarctus du myocarde ou encore les accidents vasculaires cérébraux. De même elle pourrait potentiellement être un produit de substitution transitoire aux globules rouges sanguins lors des chirurgies hémorragiques.

4788. Le projet a pour but le développement d'un modèle de lymphome humain xénotransplanté en intrafémoral chez des souris femelles NOD SCID GAMMA (NSG). En effet, le lymphome est une pathologie cancéreuse dont la fréquence a énormément augmenté ces 40 dernières années. Il se traduit par le développement de tumeurs au sein des ganglions (amygdales...) mais également au sein de la moelle osseuse. L'aboutissement de ce projet conduirait à la création d'un nouveau modèle animal pour l'étude de cette pathologie et pour le test de différentes molécules destinées à son traitement.

Les animaux seront tout d'abord pré-conditionnés afin de leur induire une hypoplasie médullaire. Deux types de pré-conditionnement seront testés et comparés : un traitement chimique avec de l'hydroxyurée (procédure expérimentale 1) et un traitement par radiations ionisantes avec des doses allant de 0,5 Gray à 3,5 Gray (procédure expérimentale 2). Un lot de souris n'ayant reçu aucun traitement sera également réalisé afin d'avoir un groupe d'animaux contrôle (procédure expérimentale n°3). Basé sur l'optimisation du pré-conditionnement, trois lignées de lymphome humain seront implantées chez des souris au niveau intrafémoral avec des quantités de cellules variant de 10⁵ à 10⁷ cellules/animal (procédure expérimentale n°4). Une fois les conditions optimales de xénotransplantes déterminées pour chaque lignée, du Matrigel (procédure expérimentale n°5) ou des cellules stromales humaines (procédure expérimentale n°6) seront ajoutés afin d'améliorer la prise de greffe. L'utilisation conjointe de Matrigel et de cellules stromales sera également testée afin d'obtenir une croissance tumorale optimale (procédure expérimentale n°7). Ces conditions optimales de pré-conditionnement et de xénotransplante seront finalement utilisées pour l'implantation intrafémorale de prélèvements de lymphome provenant de patients atteints par cette pathologie (procédure expérimentale n°8).

Le choix de la souris NSG repose sur le fait que ce type de xénotransplante requiert une souche immunodéficiente dépourvue de lymphocytes T, B et NK.

Le respect de la règle des 3R se traduit par:

- Raffiner: l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques afin d'éviter toute souffrance aux animaux. De plus, l'évaluation régulière du score de grimace des animaux et le suivi de leur poids et de leur comportement permettra d'avoir un contrôle sur leur état de santé.

- Remplacer: le développement du lymphome est étroitement lié à la présence d'un microenvironnement tumoral adapté (cellules stromales de différents types, facteurs de croissance...). Ce microenvironnement n'est pas reproductible *in vitro* et c'est pourquoi le recours à des animaux vivants est indispensable pour le développement de ce type de tumeur.

- Réduire: ce projet nécessite également de tester un grand nombre de paramètres différents (le pré-conditionnement, le type et la quantité de cellules à implanter, l'utilisation ou non de Matrigel, la co-implantation de cellules stromales humaines et la greffe d'échantillons issus de lymphome de patient). A cela s'ajoute tous les lots de souris « contrôle » indispensables à la réalisation de cette étude (souris sans aucun traitement ou avec injection de milieu seul ou traitées par un pré-conditionnement seul etc...). Il faut également prendre en compte les 80 souris qui seront commandées auprès du fournisseur pour l'élevage. Ainsi, le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet sera de 900 souris (voir tableau ci-joint).

4789. Au cours d'une analyse génétique pour rechercher des gènes de prédisposition aux infections de la glande mammaire chez la brebis, une mutation ponctuelle p.R96C de SOCS-2 (Suppressor of Cytokine Signaling-2) a été identifiée. Cette protéine est un facteur de régulation de la signalisation par des récepteurs hormonaux ou cytokiniques. Des tests *in vitro* ont montré que la mutation était responsable d'une perte d'affinité de la protéine pour certains de ses ligands comme le récepteur à l'hormone de croissance (GHR) ou le récepteur à l'érythropoïétine (EpOR). Ces données suggèrent que les signaux émanant de récepteurs des cytokines ou de détection des agents pathogènes (TLR) sont eux aussi modifiés en présence de la mutation, avec comme conséquence une dérégulation de la réponse immunitaire et de l'inflammation.

L'objectif de ces travaux est de déterminer i) les modifications de la réponse des cellules immunitaires sanguines à des ligands de récepteurs aux agents pathogènes, et ii) les conséquences fonctionnelles en termes de production de cytokines et d'immunité générale engendrées par la mutation.

Pour cela, des tests fonctionnels *in vitro* et *in vivo* dans le but d'éprouver la réponse cellulaire seront réalisés chez des brebis dont le génotype *socs2* aura été préalablement déterminé. Pour les essais *in vitro*, des prises de sang seront réalisées afin de collecter des cellules sanguines pour la stimulation. Pour les essais réalisés directement chez l'animal, une dose de lipopolysaccharide (LPS) d'*Escherichia coli* ultrapur sera injectée par voie veineuse. Un suivi clinique, incluant l'enregistrement de la température en continu, sera réalisé. Des prises de sang toutes les deux heures jusqu'à 12h, puis toutes les 4 heures ensuite et jusqu'à 24 heures après l'injection. Ces échantillons seront utilisés pour doser les cytokines et les protéines de la phase aiguë de l'inflammation induites par cette stimulation.

Afin de réduire le nombre d'animaux à éprouver, nous avons développé des tests sanguins en tubes clos qui permettent une meilleure maîtrise de la variabilité technique. Par ailleurs, la constitution de trios indépendants de brebis apparentées par leur père permet de révéler les différences liées à la mutation avec des effectifs moindres, en maîtrisant les autres sources de variabilité génétique. Le nombre de prises de sang a été réduit au minimum à partir de l'extrapolation des données recueillies dans les autres espèces où cette épreuve a été réalisée. Afin de minimiser le stress, la contention et les prélèvements seront réalisés par des manipulateurs expérimentés. Un cathéter jugulaire sera mis en place pour les prélèvements répétés à des intervalles de temps courts, pour éviter la répétition de la ponction veineuse et ainsi réduire la souffrance. En cas de réaction anormalement marquée à la stimulation, un traitement anti-inflammatoire sera administré pour une régression rapide des signes inflammatoires.

4790. De nombreuses analyses de diagnostic ou de recherche nécessitent de détecter, de visualiser ou de quantifier une protéine dans un échantillon biologique. La plupart d'entre elles reposent sur l'utilisation d'anticorps qui reconnaissent spécifiquement la protéine d'intérêt. Ces anticorps sont produits en immunisant un animal contre la protéine (comme pour une vaccination). La protéine est injectée à plusieurs reprises en présence d'un adjuvant qui stimule la réponse immunitaire pour augmenter la concentration des anticorps. L'organisme produit une variété d'anticorps qui reconnaissent différentes parties de la protéine (anticorps polyclonaux). Ces anticorps sont extraits du sérum provenant d'un prélèvement sanguin.

Ce projet concerne la production chez le lapin d'anticorps polyclonaux contre des protéines variées intéressant des projets de recherche ou d'analyse médicale. Un total de 209 animaux seront utilisés durant la période de 5 ans. Les protéines sont injectées par diverses voies (sous-cutanée, intra-dermique, intra-veineuse ou intra-musculaire) selon un planning qui est adapté en fonction de l'intensité de la réponse immunitaire, mesurée par des prélèvements sanguins réguliers. Lorsqu'une concentration satisfaisante d'anticorps a été obtenue, un grand volume sanguin est prélevé sous anesthésie générale et l'animal est euthanasié.

Le recours au lapin permet d'obtenir sur un seul animal la quantité d'anticorps nécessaire pour travailler pendant plusieurs mois voire années. Les injections induisent une réaction inflammatoire locale pendant quelques jours. Une partie de ce projet consistera à tester l'efficacité de plusieurs adjuvants (qui stimulent la production d'anticorps) induisant une moindre réaction inflammatoire au site d'injection que l'adjuvant habituel. Si les résultats sont satisfaisants, cette étude pilote contribuera à réduire les dommages causés aux animaux.

Le prélèvement sanguin terminal est réalisé sous anesthésie générale sans réveil de l'animal. La sévérité globale de la procédure est modérée.

4791. Différentes stratégies alimentaires (nature et quantité d'aliments) sont mises en place pour les animaux d'élevage. Ces stratégies visent en premier lieu à faire transformer de la biomasse primaire végétale en produits animaux riches en protéines. L'efficacité de transformation de cette biomasse est métaboliquement et économiquement très variable et peut s'accompagner de rejets « indésirables ».

Ce projet vise donc à quantifier certaines réponses animales (ingestion, digestion, croissance, production laitière, émissions non alimentaires (gaz, fèces, urines), santé (parasitisme gastro-intestinal), reproduction. Les principales espèces animales étudiées sont les caprins, les ovins, les bovins et les porcs. Des essais ponctuels - moins analytiques - de type essais "en ferme", seront réalisés sur d'autres espèces animales (volailles, lapins).

Ce projet associe 2 types d'essais: 1) des essais avec des animaux en production (672 agneaux et/ou chevreaux, 384 porcs en croissance, 648 brebis et/ou chèvres allaitantes) conduits dans les conditions d'un élevage classique où la production de viande et de lait de ces animaux sera mesurée. Des prélèvements de sang sont également réalisés pour effectuer des bilans nutritionnels et parasitaires. 2) des essais de digestion avec des animaux canulés (12 béliers, 3 vaches et 12 porcs) placés dans des loges individuelles où des prélèvements de contenu digestif seront réalisés pour effectuer des bilans de la digestion. Au total, 1731 animaux seront utilisés.

Pour les animaux opérés, l'antibiotique sera associé à un anti-inflammatoire non stéroïdien pour, entre-autres, soulager la douleur. Le comportement des animaux (dont le comportement alimentaire) est observé quotidiennement afin d'identifier d'éventuels écarts relativement à la norme

4792. La dépression est la pathologie mentale la plus fréquente. Elle nécessite une prise en charge très longue et sera, en 2030, au plan mondial, une des pathologies les plus importantes en termes de santé et société. En plus du stress chronique, la douleur chronique est un facteur déterminant dans son apparition puisque la co-morbidité douleur chronique/dépression atteint 50%. Des altérations cellulaires et moléculaires, affectant un certain nombre de réseaux complexes de structures cérébrales, ont déjà été impliquées dans la dépression. Bien que différents changements d'expression génique aient été largement décrits dans plusieurs régions cérébrales de sujets dépressifs, il est aujourd'hui de plus en plus admis qu'une meilleure compréhension de la maladie nécessite d'identifier les modifications pouvant avoir lieu au sein de ces réseaux de structures cérébrales. Dans ce contexte, la connexion réciproque cingulo-amygdalienne apparaît comme primordiale dans cette pathologie. Nous proposons une étude comportementale ainsi qu'une analyse moléculaire pour pouvoir étudier le rôle de la voie BLA-CCA dans la dépression.

Le projet nécessitera 840 animaux. Le projet sera conduit en respectant la règle des 3R visant à réduire le nombre d'animaux ainsi qu'à optimiser les procédures. En effet, les expériences seront réalisées en diminuant autant que possible le nombre d'animaux par condition expérimentale mais toujours dans l'optique d'obtenir le maximum d'informations scientifiques par test. Pour cette raison, une même cohorte d'animaux sera étudiée et caractérisée aux niveaux comportemental et émotionnel, puis fera l'objet d'investigations moléculaires. Pour pouvoir raffiner les protocoles, les animaux seront observés tous les jours et leur comportement sera suivi afin de déceler tout signe d'inconfort ou de stress. Au regard des données de la littérature et de la variabilité phénotypique interindividuelle, les groupes expérimentaux explorant les comportements anxio-dépressifs liés à la douleur neuropathique seront constitués de 20 souris. Pour répondre à la question posée, il est nécessaire d'utiliser les modèles animaux pour ce projet. Lorsque cela est possible, par exemple pour toute l'analyse moléculaire, nous allons utiliser des approches in vitro pour pouvoir remplacer le modèle in vivo. Ce projet comporte 5 procédures expérimentales, mais certaines d'entre elles font partie d'un enchaînement et utilisent les mêmes animaux ce qui limite considérablement leur nombre. Seules des souris mâles seront étudiées dans le cadre de ce projet, mais nous prévoyons de conduire une analyse dédiée spécifiquement aux souris femelles dans un futur proche.

4793. L'angiogenèse est un processus biologique qui consiste en la formation de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus est conduit par les cellules endothéliales. Il est fondamental pour la cicatrisation des tissus et le développement embryonnaire. Cependant, l'angiogenèse aggrave de nombreuses maladies telles que le cancer et les pathologies inflammatoires chroniques. Une dérégulation de ce processus est responsable des rétinopathies. D'autre part, les connexines constituent une famille de protéines transmembranaires qui s'assemblent pour former les jonctions communicantes permettant ainsi de synchroniser les fonctions cellulaires. La Connexine 40 (Cx40) est majoritairement exprimée par les cellules endothéliales et nous avons récemment identifié un rôle pour cette protéine au cours de l'angiogenèse tumorale (Alonso, Oncotarget, 2016). Dans ce contexte, le projet vise à mieux comprendre le rôle de la Cx40 au cours du processus angiogénique mais aussi à déterminer si cette protéine représente une cible thérapeutique pour le développement de nouvelles stratégies anti-angiogéniques. Ainsi, nous proposons de réaliser une étude *in vivo*, afin d'évaluer l'effet d'une inhibition locale de la Cx40 sur l'angiogenèse au cours de la vascularisation de la rétine chez la souris. Ce modèle d'angiogenèse est largement utilisé dans la communauté scientifique car il est reproductible. Ce modèle permet également de réaliser une analyse très fine de l'angiogenèse. Pour cette étude, nous prévoyons d'utiliser 35 animaux pour ces expériences (5 lots de 7 souris). Les procédures seront réalisées par du personnel formé à l'expérimentation animale et en accord avec la règle des 3R qui préconise : le Remplacement des animaux par une méthode alternative quand cela est possible (nous souhaitons évaluer l'effet d'une inhibition locale de la Cx40 sur l'angiogenèse, par conséquent nous sommes contraints d'utiliser un modèle animal car seuls les modèles d'angiogenèse *in vivo* récapitulent l'ensemble des étapes du processus et permettent d'évaluer l'effet global et les éventuels effets secondaires d'un inhibiteur.) ; la Réduction du nombre d'animaux (nous allons inclure 35 animaux dans cette étude repartis en 5 groupes de 7 animaux. Pour chaque groupe, nous avons pris en compte : (1) la difficulté d'administration locale de l'inhibiteur (intraoculaire), (2) des difficultés inhérentes à la microdissection et à la fixation des rétines néonatales et (3) de la variabilité expérimentale. D'autre part, le sexe des animaux n'étant pas un critère d'exclusion, le nombre de portée sera réduit.) ; le Raffinement favorise le comportement naturel des animaux pour éviter tout stress (nous serons, dans ce cadre, attentifs à l'enrichissement du milieu (litière, abris) mais également nous veillerons au bon comportement de la mère vis-à-vis des souriceaux. Des points limites seront établis afin d'éviter toute souffrance inutile des animaux (poche de lait, non isolement)). La procédure d'injection sera réalisée sous anesthésie générale et une médication adéquate sera administrée. Des observations quotidiennes seront réalisées afin de s'assurer du bien-être des animaux.

4794. L'endométriose est une pathologie bénigne, chronique, inflammatoire et oestrogéno-dépendante, dont la physiopathologie demeure mal élucidée, bien que l'inflammation semble jouer un rôle central. L'endométriose se définit par la présence de tissu endométrial, associant stroma et glande, en dehors de la cavité utérine.

L'hétérogénéité nosologique de cette pathologie ainsi que sa prévalence élevée en font un centre d'intérêt de nombreux spécialistes. Au regard de la littérature récente, l'endométriose toucherait 5 à 15% des femmes en âge de procréer; cette prévalence étant accrue en cas de douleurs pelviennes et/ou d'infertilité.

Le diagnostic d'endométriose est fait le plus souvent après un long délai de souffrances et de nomadisme médical.

Les manifestations cliniques principales de l'endométriose sont les douleurs d'intensité variable, parfois sévères et invalidantes ; ainsi que l'infertilité, avec un impact fréquent sur la qualité de vie des femmes touchées par cette pathologie

L'existence d'une thyroïdite auto-immune pourrait participer à la physiopathologie de l'endométriose et éventuellement aux pathologies de l'interface foeto-maternelle en cas de grossesse. Il a été démontré que les hormones thyroïdiennes influencent l'endomètre, l'ovaire et de la physiologie du placenta. Des données de la littérature supportent l'hypothèse selon laquelle les hormones thyroïdiennes jouent un rôle crucial pendant l'implantation embryonnaire et les premières étapes du développement embryonnaire.

En effet il est aujourd'hui admis que les hormones thyroïdiennes et leurs dysfonctionnement sont associées à l'infertilité, ainsi que au surrisque de complications obstétricales, y compris les fausses couches spontanées et les pathologies de la grossesse, l'accouchement, et les troubles de la vie néonatale précoce. Par ailleurs l'existence d'une association épidémiologique entre l'endométriose, maladie due à l'implantation ectopique de tissu endométrial, et les dysthyroïdies, plaide pour un rôle spécifique des hormones thyroïdiennes dans l'endométriose et l'éventuel surrisque obstétrical associé.

Au cours de cette étude nous allons évaluer l'impact de la thyroïdite sur un modèle de souris endométriosiques gestantes ou non. En effet, la grossesse est une greffe semi-allogénique du fœtus chez la mère et son bon déroulement nécessite une tolérance immunitaire materno-fœtale stricte dépendant d'une adaptation du système immunitaire maternel et fœtal.

Le modèle de thyroïdite sera réalisé dans un premier temps, soit par l'injection de thyroglobuline porcine pour le modèle de thyroïdite auto-immune soit par l'ingestion per-os de perchlorate de sodium pour le modèle de thyroïdite induite. Des prises de sang seront effectuées pour nous assurer de la maladie. Dans un second temps, nous implanterons des fragments de cornes utérines à des souris atteintes de thyroïdite, afin de mimer l'endométriose. Ces souris seront accouplées avec des mâles DBA/2 pour étudier l'influence de la thyroïdite sur l'endométriose et sur la gestation. Les résorptions fœtales et les implants endométriosiques seront étudiés. Un contrôle quotidien du bien-être et de l'état général des souris sera réalisé. De l'enrichissement sera placé dans chaque cage afin de ne pas perturber le comportement de nos souris. Au total nous utiliserons 468 animaux expérimentaux (108 femelles + 360 fœtus).

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'anxiété infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des antalgiques

sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans le développement des lésions endométriosiques en présence d'une thyroïdite auto-immune et dans les pathologies de l'interface fœto-maternelle en cas de grossesse.

4795. Troisième cancer de l'appareil urogénital, le cancer du rein est la 6^è cause de décès par cancer dans les pays industrialisés. Le carcinome rénal à cellules claires (CRCC) représente 80% des cancers du rein.

Des études récentes, basées sur le TCGA database, confirme le rôle important de l'effet Warburg dans la carcinogenèse rénale. Ce « Switch métabolique », décrit par O. Warburg en 1920, est caractérisé par une promotion, par les cellules cancéreuses, de la glycolyse comme moteur énergétique, aux dépens de la classique phosphorylation oxydative mitochondriale, accessible par la beta-oxydation des corps cétoniques, rendant les cellules cancéreuses dépendantes du glucose, qui devient alors leur principal substrat énergétique.

Le régime cétogène est un régime alimentaire associant une majorité de lipides, avec une proportion faible de protéines et une réduction importante de l'apport en glucides, forçant ainsi l'organisme à produire son énergie par la voie de la cétolyse, et non plus par la voie de la glycolyse.

L'hypothèse est que, sous régime cétogène, les cellules cancéreuses, privées de leur principal substrat énergétique, vont cesser de proliférer. Les cellules saines conservent un métabolisme énergétique efficace, grâce aux corps cétoniques et à la phosphorylation oxydative mitochondriale, tandis que les cellules cancéreuses, sous exprimant les protéines de la chaîne respiratoire, ne peuvent pas métaboliser les corps cétoniques pour leur production énergétique.

Pour cette étude, nous allons comparer, selon le régime alimentaire administré, la croissance tumorale du carcinome rénal à cellules claires (CRCC) chez 45 souris nude BLAB/c préalablement xénogreffes avec une lignée cellulaire de CRCC (ACHN) en sous-cutané. 15 souris seront nourries pendant 60 jours avec un régime normal, 15 avec un régime cétogène dès la xénogreffe (modélisant la prévention des récurrences), et 15 seront nourries avec un régime normal les 30 premiers jours puis un régime cétogène les 30 jours suivant (modélisant l'action curative). Les tumeurs seront régulièrement mesurées

Cette étude se fera dans le respect de la règle des 3 R :

- REMPLACER : nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle in vitro.
- REDUIRE : nous réduisons au maximum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique, en tenant compte des risques de décès liés à l'anesthésie et à la fragilité constitutionnelle des souris. Nous utiliserons un test de Student pour comparer la taille des tumeurs dans les différents groupes.
- RAFFINER : 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, suivant l'âge et le poids des animaux. De plus, les cages sont enrichies par des jouets (rouleaux, sopalin, copeaux). Les animaux sont surveillés au quotidien par le personnel de l'animalerie et le poids est suivi 2 fois par semaine.

4796. La toxoplasmose, parasitose cosmopolite due au protozoaire *Toxoplasma gondii*, demeure un véritable problème de Santé Publique. Généralement asymptomatique, la toxoplasmose peut toutefois revêtir un caractère de grande sévérité sous forme d'une neurotoxoplasmose, d'une chorioretinite toxoplasmique ou bien encore d'une toxoplasmose congénitale. En France, on estime à 800000 le nombre de patients atteints d'une toxoplasmose oculaire active ou cicatricielle, liée à la prolifération de *T. gondii* au niveau des tissus rétiens. La toxoplasmose congénitale (300 cas/an en France), liée à la transmission du parasite de la mère au fœtus par passage transplacentaire, peut se traduire par un avortement ou par l'apparition plus ou moins tardive de troubles psycho-moteurs et/ou oculaires chez l'enfant, dont certains subsisteront à vie. Des traitements existent, cependant leur efficacité reste discutable d'autant plus qu'ils demeurent contraignants, en terme de surveillance et d'effets secondaires.

Le but de ce projet est d'évaluer une approche thérapeutique alternative à l'utilisation des traitements actuellement utilisés dans la prise en charge (i) de la chorioretinite toxoplasmique et (ii) de la toxoplasmose congénitale, basée sur l'administration de fragments d'anticorps thérapeutiques. L'utilisation de ces fragments d'anticorps, spécifiques de la forme infectieuse de *T. gondii*, a pour finalité de combiner une activité anti-parasitaire neutralisante, une diminution des effets secondaires et une absence de résistance au traitement. Dans cette étude, 288 souris femelles et leur progéniture (soit 600 souriceaux) de souche CBA/J seront utilisées afin d'établir l'efficacité neutralisante de fragments d'anticorps thérapeutiques lors d'une infection par *T. gondii*.

Règle des 3R

- Remplacement : Si une approche in vitro sur le pouvoir neutralisant de nos fragments d'anticorps thérapeutiques a, d'ores et déjà, été développée en amont, cela ne reproduit pas un modèle physiologique et biologique complexe permettant de valider notre hypothèse de travail. La toxoplasmose, qui résulte de l'infection d'un organisme vivant par un autre, ne peut pas être à ce jour modélisée in vitro, aucune autre méthode expérimentale ne serait en mesure d'apporter un niveau équivalent d'information que la procédure expérimentale impliquant l'utilisation d'animaux vivants.
- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit au minimum sans toutefois compromettre les objectifs. Ce minima a été défini en prenant en considération deux points : 1) nous ne possédons pas de données préalables nous permettant de déterminer avec exactitude, par un test de puissance statistique, le nombre de souris, 2) nous devons tenir compte du rendement de gestation (environ 50% pour des souris CBA/J). Comme ce projet se déroule en plusieurs étapes, il sera donc possible de réduire le nombre d'animaux utilisés en cours de projet et au fur et à mesure des résultats obtenus.

- Raffinement : Les souris seront hébergées en accord avec les directives européennes et dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger). Le personnel des animaleries et les expérimentateurs surveilleront quotidiennement toutes les souris, et les méthodes utilisées seront les plus appropriées pour éviter toute douleur, souffrance ou angoisse que pourraient ressentir les souris.

4797. Les trypanosomes africains sont des parasites unicellulaires flagellés transmis aux mammifères par la piqûre infectante de la glossine ou mouche tsétsé. Ils sont responsables de la maladie du sommeil chez l'homme et de nombreux hôtes mammifères. Les trypanosomes prolifèrent d'abord librement dans le sang, puis passent la barrière hémato-méningée pour envahir le cerveau après plusieurs semaines ou plusieurs mois selon l'espèce de parasite et la susceptibilité immunogénétique de l'hôte. Les étapes précoces de l'infection de l'hôte restent cependant peu connues. Durant les 5 premiers jours après la piqure, la localisation précise (derme, ganglions lymphatiques,...), le comportement des parasites (prolifération, différenciation, migration,...), ainsi que l'initiation de la réponse immunitaire sont des éléments cruciaux qui déterminent le développement de l'infection. Une meilleure connaissance de ces mécanismes précoces permettrait donc d'envisager de nouvelles cibles diagnostiques, thérapeutiques et / ou vaccinales.

Pour comprendre ces mécanismes, le recours à l'animal est indispensable. Nous suivrons donc les premières étapes de l'infection de la souris après injection intra-péritonéale, injection intra-dermique ou après piqûre infectante de mouche tsétsé par des méthodes d'imagerie intravivante (microscopie confocale et imagerie sur organisme entier) en utilisant différents parasites fluorescents et / ou bioluminescents. Ceci nous permettra de préciser, localiser et quantifier les mécanismes de dissémination, de prolifération et de différenciation des parasites dans le temps et dans l'espace. Chaque individu sera suivi chaque jour pendant 5 jours, puis trois fois par semaine jusqu'à 3 semaines au maximum. Toutes les étapes d'infection, de prélèvements sanguins, puis d'imagerie intravivante seront réalisées sous anesthésie générale.

Puis, nous examinerons le rôle du flagelle des trypanosomes dans ces différentes étapes précoces de l'infection. Le flagelle pourrait être impliqué dans la virulence des parasites en raison de son rôle crucial dans la mobilité et de ses capacités de perception sensorielle. Le comportement de différents trypanosomes mutés pour l'une de ces fonctions sera donc comparé à la situation sauvage selon la même procédure d'imagerie intravivante.

Enfin, par une approche similaire, nous préciserons le rôle de certaines voies métaboliques spécifiques potentiellement impliquées dans la différenciation des trypanosomes au cours de ces étapes précoces de l'infection, en particulier l'utilisation du glycérol comme source de carbone.

Au total, au maximum 558 souris mâles adultes seront incluses dans une seule procédure de classe de sévérité modérée sur une durée totale de 5 ans. D'après la littérature et nos expériences préliminaires : (1) aucune réaction inflammatoire localisée n'est observée au site de piqure de glossine, (2) les symptômes de la maladie ne s'installent chez la souris qu'après au moins 3 semaines, (3) la mort ne survient qu'à partir de 5 à 8 semaines. Dans nos conditions d'observation d'une durée maximum de 3 semaines, aucun dommage évident n'est donc attendu.

L'approche d'imagerie intravivante envisagée permet une réduction significative du nombre d'animaux et minimise grandement le nombre et la gravité des gestes techniques réalisés sur ces animaux.

4798. L'alcoolodépendance est une pathologie chronique hautement récidivante touchant 3% de la population et causant plus de 49000 décès annuels en France.

La maladie alcoolique du foie (MAF) est la pathologie induite par les effets répétés d'intoxications alcooliques. Il s'agit d'une pathologie courante, responsable de 20% de la mortalité induite par l'alcool et présentant différents signes cliniques à la sévérité variable. Sa forme la plus sévère est l'hépatite alcoolique aiguë (HAA) qui a un taux de mortalité de 44% à 28 jours sans traitement, et de 35-80% à 6 mois en fonction de la réponse au traitement.

Notre objectif est d'étudier l'HAA :

- 1) Sur le plan moléculaire : pour trouver des marqueurs de développement et de réponse au traitement.
- 2) Sur le plan pharmacologique : en comparant de nouvelles stratégies thérapeutiques à celles actuelles, et en adaptant au mieux leurs dosages et leurs durées en fonction de nos marqueurs.

Cela nécessite un modèle vivant puisque le développement de l'HAA implique entre autres les systèmes digestif et immunitaire, et que les effets de différents traitements seront étudiés sur la santé globale de l'animal. Nous avons choisi pour ce projet la souris qui est la plus utilisée dans la littérature du modèle d'hépatopathie alcoolique.

La première procédure modélisera le développement de l'HAA via une exposition aux vapeurs d'éthanol associée ou non à des injections aiguës d'éthanol et (ou non) à des LipoPolysscharides bactériens. Ces différents traitements (inhalation, injections aiguës, LPS) agiront en synergie pour induire des atteintes hépatiques grâce au déclenchement de processus inflammatoires. Pour démontrer l'effet de synergie, les différents traitements seront réalisés seuls ou en combinaison. Cette procédure permettrait de mimer le développement de la maladie chez l'Homme.

Ces diverses expositions se feront sur 3 temps pour étudier la trajectoire de la MAF et sur 1080 souris.

Après confirmation des atteintes hépatiques, il s'agira d'étudier des cibles d'intérêt identifiées chez l'Homme. Ainsi que les facteurs environnementaux modulant leur expression.

La seconde procédure vise à optimiser les stratégies thérapeutiques. En s'intéressant aux traitements et à leur efficacité. L'intérêt de cette procédure est d'optimiser le dosage et la durée de traitement permettant le meilleur ratio bénéfice/risque; d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Pour cela 1120 souris seront exposées à la première procédure, puis divisées en sous-groupes correspondant à chaque stratégie thérapeutique et différents temps d'exposition.

Pour réduire au maximum la répétition de ces manipulations et donc le nombre d'animaux tout en gardant un effet statistique significatif, chaque groupe sera composé de 20 souris (cages de 5 individus, 10 durant l'inhalation). Les souris auront un accès illimité à la nourriture et à l'eau. L'enrichissement sera composé de litière foisonnante et d'une roue d'activité motrice.

La souffrance des animaux sera évaluée régulièrement à l'aide d'une grille de notation, en particulier durant les périodes d'exposition, pour s'assurer que celle-ci ne dépasse pas les points limites. En cas de souffrance l'expérimentateur habilité appliquera les soins nécessaires.

Ce projet nécessite un total de 2200 souris (mâles et femelles).

4799. Un modèle animal permet d'étudier dans des conditions contrôlées de laboratoire les causes, les processus et les traitements éventuels d'une pathologie. Il doit présenter des similitudes avec la pathologie humaine correspondante en termes de symptômes et de mécanismes physiopathologiques. Ces modèles animaux de pathologies sont obtenus par des méthodes physiques, chimiques et pharmacologiques ou par sélection de lignées spécifiques. De nombreux modèles génétiquement modifiés ont également été obtenus par ajout ou retrait de gènes (souris knock-in ou knock-out). Une grande partie des connaissances en biochimie, physiologie ou pharmacologie ont été acquises grâce à l'étude des modèles animaux.

Dans ce contexte, l'imagerie et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) sont des techniques d'investigation non irradiantes, non invasives, n'entraînant pas de douleur ou de souffrance chez l'animal anesthésié. L'application de ces méthodes in vivo chez le petit animal permet la caractérisation et la compréhension de modèles de pathologies, tant d'un point de vue anatomique que fonctionnel. Elle permet également la validation préclinique de nouvelles molécules à visée thérapeutique et l'étude des mécanismes d'action de médicaments actuellement utilisés.

Le premier avantage de l'imagerie RMN in vivo est la possibilité de suivre des phénomènes biologiques complexes chez un animal au décours de sa pathologie et donc d'utiliser moins d'animaux que lors d'approches in vitro ou in vivo invasives.

Le second avantage de l'imagerie RMN in vivo tient au fait que les technologies utilisées (aimants RMN, produits de contraste) sont identiques à celles utilisées chez l'Homme, permettant ainsi une recherche biomédicale translationnelle.

Or la mise au point de cette approche nécessite régulièrement de nouvelles séquences d'acquisition et méthodologies qui doivent être développées, évaluées et optimisées sur des animaux avant d'être applicables dans des projets de recherche.

Objectifs

Ainsi les objectifs principaux du projet mené sur des rongeurs sont :

- d'optimiser les paramètres d'acquisition de séquences existantes afin de les adapter au mieux au modèle biologique et à ses spécificités ;
- de développer et mettre au point de nouvelles techniques d'imagerie et de spectroscopie RMN.

Pour mener à bien ces objectifs, les développements et optimisations des méthodes RMN sur 5 ans seront réalisées sur 90 rats et 50 souris. Le caractère non-invasif de la méthode chez l'animal anesthésié permet des examens répétés chez un même animal, ce qui entraîne une réduction du nombre d'animaux utilisés pour ces développements méthodologiques. Les conditions d'hébergement (plusieurs animaux par cage, stimulation régulière par un expérimentateur), le recours à l'anesthésie pendant les acquisitions et la définition au préalable de points limites permettent de réduire l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subis par les animaux.

4800. La radioimmunothérapie (RIT) est une stratégie anticancéreuse prometteuse du fait de la haute spécificité des anticorps pour leurs cibles antigéniques. Cependant, la RIT possède des inconvénients majeurs tels qu'une importante toxicité sanguine des anticorps radioactifs. Ainsi, le projet se propose d'étudier une stratégie de pré-ciblage, la pré-RIT, de la tétraspanine 8, protéine surexprimée dans le cancer colorectal. La stratégie de pré-ciblage consistera en l'injection dans un premier temps d'un anticorps monoclonal modifié par des groupements trans-cyclooctène (TCO) suivie par l'injection différée d'une sonde tétrazine (TZ) radiomarquée. La liaison entre les deux entités chimiques que sont le TCO et la TZ se fait directement in vivo du fait de la très forte affinité entre ces deux molécules. Cette stratégie thérapeutique permettra ainsi de délivrer une dose radioactive suffisante et adaptée au traitement de chaque tumeur. Nous disposons d'un anticorps spécifique de cette protéine : le TS29.2, qui sera fonctionnalisé par l'ajout d'un nombre variable de groupements TCO et avec des bras espaceurs de différentes longueurs entre l'anticorps et les TCO (chaînes polyéthylène-glycol PEG). La tétrazine utilisée sera radiomarquée pour les études de biodistribution par imagerie afin de déterminer le meilleur couple Ac-(PEG) n-TCO(n)/TZ en vue d'une approche thérapeutique. De plus, une tétrazine couplée à de l'albumine sérique sera utilisée comme agent de clairance afin d'éliminer plus rapidement les Ac-(PEG)n-TCO(n) circulants non fixés à la tumeur. Cette caractérisation sera également complétée par une étude quantitative permettant d'évaluer l'impact des modifications des anticorps sur la reconnaissance de l'antigène Tspan8 dans des tumeurs xénogreffées sur les souris ainsi que l'abondance du signal de fixation TCO/TZ validant ou non la stratégie de pré-RIT. Enfin, nous comparerons les effets de la RIT traditionnelle avec ceux de la pré-RIT en vue de la validation de cette stratégie thérapeutique.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. En effet, le nombre de souris nécessaire pour les expériences de biodistribution a été calculé pour permettre de déterminer la dosimétrie, paramètre essentiel pour les essais thérapeutiques. Le modèle animal est la xénogreffe sur souris nude de cellules humaines HT29 exprimant de façon constitutive Tspan8. La procédure expérimentale induit peu de douleur. Afin de surveiller les souris porteuses de tumeurs, elles seront observées quotidiennement et pesées régulièrement. Si les tumeurs atteignent 10% du poids de l'animal, elles seront anesthésiées par isoflurane puis euthanasiées par dislocation cervicale. Le nombre d'animaux nécessaire est de 133 souris.

