



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

Résumés non techniques des projets autorisés (48)

4801. La dépression est un trouble psychiatrique qui se caractérise d'un point de vue comportemental chez l'homme par une humeur triste associée à une réduction de l'activité psychomotrice et à un désintérêt intellectuel. Cette pathologie résultant de facteurs génétiques et environnementaux peut s'avérer très invalidante. Différents antidépresseurs sont actuellement disponibles sur le marché. Leurs effets thérapeutiques reposent sur leur capacité à augmenter la transmission sérotoninergique, noradrénergique et/ou dopaminergique dans le cerveau. Toutefois, en dépit de leur efficacité avérée, ces traitements présentent un certain nombre de limites telles qu'un long délai d'action, le fait que 30% des patients sont résistants ou encore leurs effets secondaires invalidants. De plus, ces agents pharmacologiques n'agissent pas sur l'ensemble des symptômes dépressifs, ce qui encourage la recherche dans le domaine de la psychiatrie à développer de nouvelles molécules présentant un plus large spectre d'action nécessaire à un meilleur profil thérapeutique.

Les antidépresseurs actuels exercent leur activité thérapeutique en bloquant le transporteur de haute affinité de la sérotonine, le SERT, ce qui conduit après plusieurs semaines à une activation de la décharge électrique des neurones sérotoninergiques. Une piste alternative pourrait être de stimuler directement ces neurones sérotoninergiques situés dans les noyaux du raphe avec pour objectif final d'augmenter la libération de sérotonine dans les aires de projections. Cette approche pourrait éventuellement permettre d'identifier des agents pharmacologiques ayant une action plus rapide que les traitements actuels sur les troubles de l'humeur. Nous avons récemment démontré *in vitro* qu'un neuropeptide appelé neuropeptide FF (NPFF) était capable de stimuler l'activité des neurones sérotoninergiques du noyau dorsal du raphe chez la souris.

L'objectif de cette étude préliminaire est de confirmer cet effet activateur des neurones sérotoninergiques *in vivo* chez la souris et de voir si cette activation s'accompagne d'effets comportementaux de type antidépresseur. Pour ce faire, 3 types d'approches complémentaires seront utilisés:

- 1) Electrophysiologie: pour mesurer directement l'activation des neurones sérotoninergiques par le NPFF.
- 2) Comportement: pour mesurer les effets de type antidépresseur du NPFF
- 3) Microdialyse: pour mesurer directement la libération de sérotonine induite par le NPFF.

Ces trois approches devraient permettre de vérifier, en utilisant un faible nombre d'animaux, l'hypothèse selon laquelle l'activation des récepteurs NPFF induirait une activation des neurones sérotoninergiques avec pour conséquence une augmentation des niveaux de sérotonine dans les régions cérébrales régulant l'humeur et donc des effets antidépresseurs.

Cette étude nécessite l'utilisation d'un modèle intégré et nous avons choisi la souris car c'est un modèle reconnu pour étudier les effets des antidépresseurs mais aussi car nous disposons de données préliminaires obtenues *in vitro* sur des neurones de souris. Nous estimons que ce travail devrait nécessiter l'utilisation de 225 souris. Afin de limiter au maximum le nombre d'animaux pour cette étude, nous proposons d'utiliser les souris comme leur propre témoin dans la plupart des procédures. Tous les animaux seront hébergés dans l'Etablissement Utilisateur et surveillés quotidiennement par les zootechniciens en accord avec la Structure du Bien Etre Animal et en lien avec les expérimentateurs. Les expériences de microdialyse nécessitent de réaliser une chirurgie sur certains animaux. Ils seront surveillés jusqu'au réveil puis quotidiennement à la recherche de signes d'infection ou de douleur. Les animaux présentant de tels symptômes sont traités (anti-inflammatoires et/ou antibiotiques) puis euthanasiés si les symptômes persistent.

4802. Nous savons que l'insuffisance rénale (dysfonctionnement des reins) est associée au développement de nombreuses anomalies du système cardio-vasculaire, de l'immunité et du métabolisme osseux chez l'homme et que ces patients meurent principalement de complications cardiovasculaires, infectieuses ou de cancer. Les patients insuffisants rénaux présentent également un risque accru d'ostéoporose et de fracture. L'une des hypothèses pour expliquer toutes ces complications est l'accumulation de certaines molécules appelées toxines urémiques et normalement éliminées par les reins quand ils fonctionnent correctement. Nous ne savons pas combien de temps il est nécessaire pour que ces toxines urémiques s'accumulent après l'apparition de l'insuffisance rénale et si l'apparition des anomalies cardiovasculaires, immunitaires et osseuses apparaissent en même temps. Le but de cette étude est d'étudier la chronologie d'accumulation des toxines urémiques et les conséquences de ces toxines sur les systèmes cardiovasculaires, immunitaire et le tissu osseux. Une première étude (156 souris) sera consacrée à la description de la cinétique des toxines urémiques et de l'apparition des dysfonctions immunitaire, vasculaire et osseuse chez la souris insuffisante rénale. Ensuite dans une seconde étude (48 souris) nous examinerons les conséquences que peut avoir l'accumulation des toxines urémiques dans une situation de sepsis (un état de stress cardiaque et immunitaire). Dans une troisième étude nous étudierons les effets sur la survie des animaux en état de choc septique (40 souris) de la diminution des concentrations plasmatiques en toxines urémiques provoquée par plusieurs traitements. Afin d'observer si les effets observés des traitements utilisés sur la survie s'accompagnent d'une amélioration des dysfonctions immunitaires, vasculaire et osseuses nous réaliserons une

quatrième étude (72 souris). Ces 4 études seront réalisées sur des souris C57BL/6J (total = 316 souris) chez qui nous créerons une insuffisance rénale ou une opération blanche. La détermination de la concentration en toxines urémiques dans le plasma nécessite 500ul de plasma par dosage. L'analyse de la fonction immunitaire nécessite 300ul de sang total. Par conséquent il n'est pas possible de réaliser ces 2 analyses sur les mêmes animaux car la quantité de sang ou de plasma n'est pas suffisante par animal. L'étude de la vasoréactivité nécessite de prélever immédiatement l'aorte de l'animal ce qui provoque le décès immédiat de l'animal et rend difficile de prélever le sang pour analyse biochimique sur le même animal. Par conséquent nous prévoyons un groupe supplémentaire uniquement pour le dosage des toxines urémiques mais qui ne sera mis en œuvre uniquement si le dosage a échoué dans le groupe des souris utilisées pour la vasoréactivité. Afin de limiter le nombre d'animaux, nous utiliserons les mêmes animaux pour l'étude de la vasoréactivité aortique et l'étude du tissu osseux.

Notre équipe maîtrise depuis de nombreuses années la création de l'insuffisance rénale chez la souris. Cette étude doit être réalisée chez l'animal car il n'est pas possible de provoquer une insuffisance rénale et un état de choc septique chez l'homme puis d'observer sur les différents organes les modifications provoquées. Toutes les précautions d'usage en termes d'analgésie et d'anesthésie seront prises afin de soulager et limiter la douleur des animaux lors des différentes expériences. Ainsi, après chaque chirurgie, les souris recevront une injection sous cutanée d'un antalgique opiacé et seront placées sur une couverture chauffante jusqu'à leur réveil. L'administration de l'antalgique sera répétée 6 à 8 heures après la première administration si les animaux montrent des signes de douleurs. La plus grande attention sera portée afin d'éviter la survenue des douleurs et du stress chez les animaux tout au long du protocole. Ainsi, après chaque chirurgie, l'état général des souris sera surveillé par une pesée (journalière dans la semaine post-chirurgie puis semi-hebdomadaire) et la recherche de signes de souffrance (observation visuelle, sept jours sur sept). Dans le cadre d'un raffinement on placera des nids végétaux pour permettre à l'animal de s'isoler s'il le désire.

4803. La maladie du sommeil concerne une population estimée à 100 millions de personnes sur le continent africain et couvrant plus de 37 pays. La maladie peut être aiguë ou chronique et l'issue généralement fatale en l'absence de thérapeutique. Côté animal, plus de 100 millions de petits ruminants sont directement concernés. Ces maladies dues à des parasites appelés trypanosomes et transmises par la piqûre de glossines ou mouches tsé-tsé sévissent dans des zones rurales pauvres des pays africains et constituent un obstacle majeur à l'installation humaine et au développement de l'élevage et de l'agriculture avec un fort impact socio-économique pour des populations déjà fortement appauvries.

Pour améliorer les méthodes de lutte contre cette maladie, il est primordial d'étudier les modalités de la transmission des trypanosomes par les mouches tsé-tsé à l'homme et à l'animal afin de rompre cette transmission. Ce type d'étude est réalisable car nous disposons d'un élevage de 5 espèces et sous espèces de mouches tsé-tsé d'intérêt médical et vétérinaire. Les mouches tsé-tsé mâles et femelles se nourrissant exclusivement de sang, il est donc nécessaire de leur fournir des repas de sang réguliers pour les conserver en vie et les faire se reproduire. A cette fin, un maximum de 60 lapins sera utilisé sur une période de 5 ans. L'habituation progressive des animaux à la procédure et au personnel en charge d'appliquer la procédure (réduction du stress des animaux), le choix de la taille des groupes d'animaux au cours de ces travaux (chaque lapin n'est utilisé qu'une fois par semaine) et le respect strict des points limites définis assureront l'application maximale du principe des 3R dans ce projet.

4804. Les bases neurobiologiques de l'altération mnésique propre à l'état de stress post-traumatique (ESPT) restent aujourd'hui encore peu connues. Cet état est caractérisé par une altération qualitative de la mémoire impliquant simultanément une hypermnésie et une amnésie. Une étude réalisée en collaboration avec notre équipe a montré que la mémoire de peur contextuelle normale dépend de l'activation d'une voie de signalisation des glucocorticoïdes dans l'hippocampe. Ce projet a pour objectif d'étudier les altérations de cette voie susceptibles de sous-tendre le passage d'une mémoire émotionnelle normale à une mémoire de type traumatique. Ainsi, en identifiant les bases neurobiologiques spécifiques de la mémoire traumatique, ce projet doit ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de ce trouble anxieux.

Cette étude sollicite un modèle comportemental développé récemment au sein de l'équipe qui permet de modéliser chez la souris l'altération qualitative de la mémoire observée chez des patients atteints de stress post-traumatique. Ce projet nécessite l'utilisation de 820 souris issues d'un centre d'élevage agréé. L'utilisation de ces animaux se justifie pour plusieurs raisons :

1) Aucune alternative ne permet de se passer de l'utilisation de modèles animaux lorsqu'il s'agit d'étudier les processus mnésiques. L'organisation du système nerveux central de cette espèce est assez proche de celle de l'Homme, ce qui permet une extrapolation acceptable des résultats obtenus chez ces espèces à l'espèce humaine.

2) Le modèle comportemental a été établi chez la souris et les appareils comportementaux sont dimensionnés pour cette espèce.

La réalisation des expériences sera confiée à des utilisateurs expérimentés. Le présent dossier démontre par la suite la conformité des expérimentations envisagées qui se feront en complète adéquation avec la nouvelle directive européenne.

Dans un souci de respect du R de réduire, nous utiliserons au maximum 820 souris sur 5 ans pour ce projet, ce qui nous permettra de limiter la variation interindividuelle et de pouvoir avoir tous les groupes contrôles nécessaires. Dans le respect du R de raffiner, toutes les douleurs seront soulagées à l'aide des molécules les plus adaptées au protocole et à l'état des animaux.

4805. L'Unité travaille sur les leptospires, bactéries pathogènes pour l'homme et de nombreuses espèces animales. La leptospirose est une zoonose de répartition mondiale où l'homme se retrouve être un hôte occasionnel dans un cycle impliquant les animaux sauvages et domestiques. La leptospirose est une maladie négligée et émergente du fait du réchauffement climatique et de l'urbanisation croissante et incontrôlée dans les pays en voie de développement. On estime à plus de d'un million de cas sévères de

leptospiroses humaines par an dans le monde. L'infection aiguë et la colonisation chronique représentent les deux pôles d'un large spectre de signes cliniques observés chez l'homme et les animaux infectés par les leptospires pathogènes.

Dans le cadre des activités de notre laboratoire, nous utilisons les animaux sensibles à la leptospirose (gerbilles, cobayes et hamsters) pour l'étude de la virulence de souches de leptospires. Pour cela, nous inoculons par voie intra-péritonéale des souches de leptospires dans des jeunes animaux femelles (4-6 semaines). Un maximum de 880 animaux seront utilisés sur les 5 ans. Trois types de procédures expérimentales (une pour chacune des espèces de rongeurs) seront utilisés.

Ce projet devrait contribuer à une meilleure connaissance de la biologie des leptospires afin de développer de nouvelles stratégies pour le traitement et la prévention de cette maladie émergente négligée.

Les animaux infectés avec des souches virulentes développeront une leptospirose proche de celle observée chez l'homme avec perte de poids, atteintes hépatique et rénale pouvant entraîner la mort. Le niveau de sévérité attendu est modéré. Nous avons établi des points limites visant à identifier les animaux qui sont sérieusement malades et minimiser leur souffrance. Les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude.

Le recours à l'animal est nécessaire pour étudier le caractère multifactoriel de la virulence. Il n'existe pas de modèles alternatifs.

Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur notre expérience de la conception de ce type d'études. Nous nous assurons d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé.

4806. Le but de ces séances de travaux pratiques est l'apprentissage de techniques peu invasives sur le modèle murin destiné aux futurs concepteurs de procédures et de projets.

Devant la grande variété de techniques mises en œuvre et la nécessité pour les stagiaires d'appréhender leur premier contact avec un animal de laboratoire dans un contexte bien cadré et sécurisé tant pour les utilisateurs que pour les animaux, il est indispensable que cet apprentissage s'acquière sur des rongeurs vivants.

Afin de limiter la quantité d'animaux utilisés, le nombre d'animaux par stagiaire est porté à 1 rat et 1 souris soit un total de 160 rats et 160 souris pour les 5 années que couvre ce projet.

Pour éviter toute situation de détresse ou de souffrance des animaux, ceux-ci seront anesthésiés dès le début de la séance juste après l'apprentissage du gavage qui ne peut être fait que sur animal vigile.

A l'issue de la séance de travaux pratiques des prélèvements post mortem seront réalisés afin de fournir des tissus à un laboratoire de culture cellulaire pour la réalisation de recherche in-vitro.

Pendant la période d'acclimatation, les animaux seront placés dans des hébergements enrichis (litière foisonnante, roue d'activité, tube carton, fond sonore).

4807. L'établissement de modèles animaux de la maladie d'Alzheimer, conditionnant la mise au point de traitements thérapeutiques, est une étape critique dans la lutte contre cette maladie neurodégénérative qui frappe 10% de la population âgée de notre société actuelle. Les gènes humain de l'APP et PS1, deux des causes génétiques de la maladie d'Alzheimer, ont pu être insérés dans le génome de la souris. Ces lignées de souris sont en effet l'objet de troubles mnésiques et comportementaux et modifications histologiques caractéristiques de cette pathologie.

Notre projet, en renouvellement, consiste à caractériser l'altération des réseaux neuronaux chez ces souris transgéniques qui ont subi les dépôts anormaux de l'amyloïde beta, caractéristique de la maladie d'Alzheimer afin de : (1) décrire le dysfonctionnement au niveau cellulaire et de réseaux permettant de rendre compte des déficits mnésiques et comportementaux, (2) proposer un outil permettant de suivre l'évolution temporelle de la pathologie, (3) confirmer la pertinence du modèle, et (4) mettre en évidence l'efficacité des traitements pharmacologiques au niveau cellulaire/réseau, puis au niveau intégré (comportement).

Le Modèle animal de la maladie neurodégénérative présente un outil indispensable comme dit plus haut afin de mettre au point des thérapies médicamenteuses destinées à ralentir la maladie ou aider les patients par l'amélioration de la qualité de la vie après dépistage précoce, par exemple. Dans cette quête, l'étude des animaux (souris transgéniques reproduisant la même mutation et les symptômes associés) libre de mouvement est indispensable, et ne peut être remplacée par celle de la préparation subcellulaire. Les études comportementales, immunocytochimique et électrophysiologiques in vivo nécessitent minimum 15 animaux par groupe (génotype, âge, condition expérimentale ou sexe) étudié afin de garantir la solidité des données par utilisation des tests statistiques paramétriques (i.e. analyse de variance par exemple). De ce fait, ce projet nécessite 380 animaux soumis à deux procédures expérimentales. Lors de l'application des procédures, la souffrance et le inconfort de l'animal seront réduits au minimum si nécessaire par utilisation des anesthésiques ou antalgiques (lors de la chirurgie) etc.

4808. Le but de ce projet est de développer des approches thérapeutiques pionnières pour restaurer la vision chez les patients atteints d'une dégénérescence des cellules ganglionnaires, l'une des causes majeures de cécité dans les pays occidentaux (glaucome, rétinopathie diabétique, occlusions des veines/artères rétiniennes centrales, neuropathies optiques, tumeurs ou lésions traumatiques)

Les cellules ganglionnaires de la rétine sont des neurones qui reçoivent les informations visuelles des photorécepteurs de l'œil et qui les transmettent au cerveau via leurs axones qui forment le nerf optique.

En effet, si certaines maladies causant la cécité prennent leur origine au niveau de la rétine, d'autres résultent de la rupture de communication entre la rétine et le cortex cérébral et il n'existe à ce jour aucun traitement à ces atteintes du nerf optique.

Ainsi ce projet vise à restaurer la perception visuelle en réintroduisant de l'information visuelle directement dans les zones des centres visuels supérieurs du cerveau, le thalamus et le cortex visuel primaire.

Les approches thérapeutiques testées ici se basent sur l'optogénétique. Cette technique permet de rendre des neurones sensibles à la lumière en combinant le génie génétique et l'optique. Elle permet en particulier de stimuler spécifiquement un type cellulaire en laissant les cellules voisines intactes.

Règle des 3 R : 1) Remplacement. Des résultats prometteurs de ces approches ont été obtenus sur le modèle murin et in vitro sur des structures visuelles humaines. Il reste néanmoins nécessaire de valider l'efficacité de ces techniques in vivo sur des modèles pertinents. Le modèle primate reste essentiel à ce jour pour avancer sur ces questions en ophtalmologie du fait de l'homologie avec l'Homme de ces structures visuelles (fovéa, type de vision trichromatique), structures dont les autres mammifères sont dépourvus. 2) Réduction. Le nombre d'animaux est réduit au maximum tout en permettant d'obtenir les réponses scientifiques escomptées, les effectifs sont basés sur le nombre de vecteurs viraux à tester, plusieurs vecteurs peuvent être testés chez un même sujet. 3) Raffinement. Afin de limiter les contraintes pour les animaux, toutes les expériences seront réalisées sous anesthésie générale et les animaux recevront un antalgique. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans un environnement enrichi et seront soumis à un programme d'entraînement à coopérer basé sur la distribution de récompenses.

Pour ce projet, 84 singes seront utilisés sur 5 ans pour, (i) identifier des vecteurs ayant une transduction efficace dans les cellules neurales d'intérêt, (ii) mesurer l'activité des neurones via des outils d'optogénétique

4809. L'obésité et le diabète de type 2 se développent à la vitesse d'une épidémie en France. Ils provoquent à long terme des altérations marquées de la fonction cardiaque qui aboutit de plus en plus souvent à la mort des patients et qui pourrait être en partie prévenues par la qualité de l'alimentation. En effet, les acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3 et les extraits de thé vert pourraient être protecteurs. L'objectif du travail consiste à évaluer l'influence croisée des AGPI n-3 et des extraits de thé vert sur la fonction cardiaque (activité mécanique, réactivité coronaire et métabolisme mitochondrial) dans le diabète de type avéré. Le travail sera réalisé sur 90 rats mâles de souche Wistar utilisés en trois salves d'expérimentations. La première salve (10 animaux nourris avec un régime croquette) sera utilisée pour la mise au point de la technique d'évaluation de la réactivité coronaire. Les deuxième et troisième salves (2 x 4 groupes de 10 animaux) seront identiques du point de vue de l'alimentation des animaux. Dans chacune de ces phases, nous nourrirons chacun des 4 groupes de rats (n=10 par groupe) avec un régime différent. Les 4 régimes seront de type occidental avec un contenu hypercalorique (32% de beurre + 12% de saccharose). Le premier régime ne contiendra ni AGPI n-3, ni extrait de thé vert; le second régime contiendra de l'acide éicosapentaénoïque (C20:5 n-3 ou EPA, 1,5% à la place d'une quantité équivalente de beurre), mais pas d'extraits de thé vert; le troisième groupe contiendra des extraits de thé vert (0,5% à la place d'une quantité équivalente de maltodextrine), mais pas d'EPA; le quatrième groupe contiendra de l'EPA (1,5%) et des extraits de thé vert (0,5%). Les régimes seront initiés une semaine après la réception des animaux et, après la première semaine de régime, une injection intrapéritonéale de streptozotocine à dose modérée (35 mg/kg) sera effectuée pour augmenter modestement la glycémie. Les régimes seront maintenus pendant une période de 3 mois. Dans la première salve d'expérimentations, au 80^{ème} jour de régime, un test de tolérance au glucose sera réalisé sur l'animal vigile à jeun. Une semaine plus tard, un test de sensibilité à l'insuline sera effectué sur les mêmes animaux. Au 90^{ème} jour de régime, la fonction cardiaque sera mesurée in vivo chez l'animal anesthésié grâce à une sonde de pression Millar introduite dans le ventricule gauche via la carotide droite. Les animaux seront ensuite sacrifiés et leur cœur sera immédiatement prélevé pour être perfusé dans les conditions standards. Par rapport aux mesures in vivo, les mesures ex vivo de la fonction cardiaque permettent d'accéder à des données précieuses que sont la contractilité et la relaxation. La réactivité coronaire sera ensuite estimée dans le cœur isolé. Dans la seconde salve de mesure, la fonction cardiaque sera également mesurée in vivo à l'aide de la sonde Millar et les cœurs seront ensuite immédiatement prélevés pour isoler les mitochondries cardiaques. Le fonctionnement de ces organites (consommation d'oxygène, production d'ATP et libération de radicaux libres de l'oxygène) sera ensuite immédiatement évalué. En plus de son grand intérêt vis-à-vis de la santé humaine, le travail envisagé respecte la règle des 3 R (réduire, raffiner, remplacer). En effet, le nombre d'animaux par groupe est limité à 10, ce qui permettra d'effectuer des statistiques fiables avec une puissance suffisante. Des points-limites précis sont proposés de façon à réduire la souffrance des animaux les plus atteints. En revanche, la complexité de la pathologie du diabète de type 2 faisant intervenir plusieurs organes rend impossible l'utilisation in vitro d'un modèle cellulaire.

4810. Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les anticorps polyclonaux (AcP) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de

molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants :

- 1) la quantité nécessaire d'anticorps (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps);
- 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps;
- 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps;
- 4) l'utilisation prévue des anticorps.

La poule est notamment utile pour la production d'AcP contre des protéines de mammifères, car elle est éloignée phylogénétiquement de la classe des Mammalia. L'emploi de poule peut être considéré comme un raffinement de la production d'AcP, car ces derniers peuvent être extraits du jaune d'œuf sans avoir forcément à prélever du sang sur l'animal. De plus, l'utilisation de poules contribue également à la réduction du nombre d'animaux utilisés, ces dernières produisant de plus grandes quantités d'anticorps que les rongeurs de laboratoire. De manière générale, les poules sont d'excellentes productrices d'anticorps et leur réponse immunologique est comparable à celle des mammifères. Il faut cependant souligner que les poules ne conviennent pas à toutes les applications.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 30 protocoles, représentant 60 poules.

Le temps minimum d'immunisation est de 63 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 14 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de classe sans réveil. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les poules sont hébergées dans des installations appropriées et elles disposent d'enrichissement (grattoir, coquille d'huitre, pommes).

4811. Au cours des 20 dernières années, la résistance aux antibiotiques a considérablement évolué alors que parallèlement la recherche de nouveaux antibiotiques s'est essouffée. L'émergence de bactéries dites toto-résistantes est devenu une préoccupation des pouvoirs publics.

Plusieurs équipes se sont intéressées à l'association entre la colistine et des antibiotiques à spectre habituellement limité aux bactéries à Gram positif comme les glycopeptides (vancomycine, téicoplanine) pour le traitement des infections à *Acinetobacter baumannii* résistants aux carbapénèmes. Le principe de cette association atypique repose sur la déstabilisation de la membrane externe de la bactérie et l'augmentation de sa perméabilité par la colistine, permettant le passage d'antibiotiques habituellement inefficaces comme les glycopeptides. Des résultats prometteurs sur l'efficacité de ces associations ont été obtenus au cours d'études in vitro et in vivo chez un modèle animal de larves de chenilles de l'espèce *Galleria mellonella*. Les rares données chez l'homme sont discordantes. Des études complémentaires sur un modèle animal plus élaboré sont donc nécessaires. De plus, l'étude de l'association de la colistine avec d'autres antibiotiques comme le linézolide serait intéressante, car cet antibiotique présente une bonne diffusion pulmonaire et une néphrotoxicité limitée.

Ce projet sera réalisé dans le cadre d'un modèle expérimental de pneumopathie murine à *Acinetobacter baumannii* souche SAN et RCH, validé et publié antérieurement pour les essais thérapeutiques. Il s'agit d'un modèle aigu compartimentalisé de pneumonie qui garantit l'efficacité clinique des combinaisons d'antibiotiques testées et donne des informations sur la pharmacocinétique sanguine et pulmonaire des produits testés. La justification du modèle de pneumonie est liée à l'importance de cette pathologie en milieu hospitalier particulièrement avec des bactéries résistantes aux antibiotiques. Le choix des souches d'*Acinetobacter* est en lien avec cette multi résistance et le tropisme pulmonaire. S'agissant d'une pathologie infectieuse aigue, il y a une mortalité importante. Comme dans le cadre des pathologies infectieuses, ces animaux survivants ne peuvent resservir à d'autres expérimentations en raison du développement de défenses immunitaires au cours de cette maladie

Nous utilisons 40 souris par lot (20 souris pour l'étude de la mortalité et 20 souris pour l'étude microbiologique et pharmacocinétique, 1 lot par traitement à tester sur un total de 10 traitements par souche bactérienne, 2 souches bactériennes, soit 800 souris au total, ce nombre correspondant aux règles préalablement établies des 3R :

-Remplacer : le recours aux animaux est limité à la souris

-Réduire : le modèle choisi est destiné à limiter le nombre d'animaux : afin de justifier de la validité et la reproductibilité des résultats obtenus, et pour les analyses statistiques ultérieures, un minimum de 20 souris par lot est nécessaire-Raffiner : Le bien-être de l'animal est pris en compte de manière à lui éviter toute souffrance ou stress inutile : le comportement général de l'animal sera surveillé (aspects du pelage, vivacité, bonne alimentation ...) 3 fois par jour afin d'évaluer la gêne ou la douleur qu'il ressent. Son poids sera contrôlé journalièrement. Le score clinique sera également évalué à chaque visite. Tout animal sera euthanasié s'il

obtient un score clinique de 3 points. Pour la gestion de la douleur, du paracétamol sera administré toutes les 6 heures à raison de 15 mg/kg.

4812. Modèle d'insuffisance cardiaque chronique aux anthracyclines, rôle des hormones sexuelles sur la cardiosensibilité des chimiothérapies.

Le cancer du sein est un problème de santé publique, qui a conduit à un programme de dépistage à l'échelle nationale (réalisation d'une mammographie vers 50 ans). Les thérapies utilisées, dont les chimiothérapies, ont allongé l'espérance de vie des patientes et même permis des rémissions complètes. Cependant, ces chimiothérapies (anthracyclines et thérapie ciblée) ont des effets secondaires. Le principal est le développement d'une insuffisance cardiaque pouvant grever le pronostic de ces patientes.

La physiopathologie de la cardiotoxicité des chimiothérapies n'est pas encore établie.

Pour identifier les voies de signalisation cellulaire impliquées dans cette toxicité cardiaque et définir les facteurs protecteurs et/ou aggravant cette cardiotoxicité, le développement de modèle préclinique chez la souris est indispensable et ne peut être remplacé par des modèles *in vitro* incapables de mimer la complexité des processus mis en jeu.

Les schémas d'administration des chimiothérapies ont révélé une cardiotoxicité chronique des anthracyclines et du trastuzumab, de mécanismes inconnus et pour lesquels il n'existe pas à ce jour en France de modèle animal. De plus, certaines études précliniques suggèrent que les oestrogènes protègent le muscle cardiaque dans ce contexte mais cela n'a jamais été vraiment prouvé. Notre objectif est d'établir un modèle murin mimant l'insuffisance cardiaque chronique induite par les thérapies ciblées actuelles du cancer du sein et définir l'importance des hormones sexuelles dans ce cas. Le projet implique 420 souris (male, femelle, et femelle ovariectomisée) qui recevront les protocoles de chimiothérapies selon les schémas actuels. La réduction du nombre d'animaux est obtenu par un suivi longitudinal par échocardiographie, et par la conception de groupes contrôles communs aux différents protocoles de chimiothérapie. Chacune des procédures (mesure de la pression artérielle, injection sous cutanée, échocardiographie, glycémie) a été raffinée, ainsi le confort des animaux dont la stabulation (3/cages) acclimatation aux protocoles est maximal, la prévention de douleur lors et après la chirurgie d'ovariectomie est pris en charge par une surveillance étroite et administration d'antidouleurs.

Ce projet pourrait permettre d'identifier une population particulièrement à risque de développer une cardiotoxicité post chimiothérapie et donc d'établir un traitement préventif cardioprotecteur selon le statut hormonal des femmes et hommes bénéficiant de ces chimiothérapies..

4813. La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative entraînant notamment d'importants troubles moteurs, et qui touche près de 6,5 millions de personnes dans le monde. Aujourd'hui 1 Français sur 5, de 60 ans ou plus, est atteint par cette maladie chronique, qui affecte le système dopaminergique. En 2050 ce sera 1 Français sur 3. Les traitements pharmacologiques actuels permettent d'atténuer les symptômes, mais n'ont aucun effet curatif, ne permettent pas de ralentir le développement de la pathologie, entraînent des effets secondaires très gênants et leurs effets s'amenuisent au cours de l'évolution de la maladie. La stimulation cérébrale profonde, intervenant essentiellement à un stade avancé de la maladie de Parkinson, a également une action uniquement symptomatique. En conséquence, la neuroprotection dans la maladie de Parkinson est une piste importante de recherche, afin d'enrayer ou de ralentir la dégénérescence des neurones dopaminergiques.

De récentes études ont démontré l'effet neuroprotecteur de l'illumination proche infra-rouge (NIR) sur des cultures cellulaires ainsi que sur des modèles précliniques exposés à une neurotoxine (induisant la mort des neurones dopaminergiques et donc conduisant au développement de symptômes similaires à ceux de la maladie de Parkinson idiopathique). Notamment, les résultats démontrent que l'illumination NIR atténue les symptômes en améliorant les performances motrices, mais aussi préserve les neurones dopaminergiques. L'objectif de cette étude est d'évaluer à long terme, la durabilité et la fonctionnalité d'un nouvel implant permettant l'illumination NIR, afin de soutenir une application clinique imminente. Un modèle alternatif *ex vivo*, n'existant pas, le projet prévoit le recours à un maximum nécessaire de 5 primates, provenant d'élevages reconnus, afin d'assurer la validité des résultats. Le modèle primate sera utilisé en raison de ses similitudes anatomiques fortes avec l'Homme, permettant une extrapolation aux conditions d'utilisation de l'implant en pratique clinique. Les protocoles d'anesthésie ont été définis et validés par le vétérinaire de l'installation et les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance ou douleur lors des interventions sur les animaux. L'application de critère d'arrêts et le suivi quotidien des animaux assurent leur bien-être. Les études menées précédemment au laboratoire, nous laissent penser que le comportement et le bien-être des primates ne seront pas affectés par la mise en place de l'implant NIR. Cependant, en cas d'effets inattendus, telle que la perte de poids importante ou le rejet de l'implant, le vétérinaire en charge du bien-être des animaux sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie anticipée.

4814. L'indométacine est un médicament anti-inflammatoire non-stéroïdien (AINS). Il lutte contre l'inflammation et la douleur. Il est utilisé notamment dans le traitement symptomatique des rhumatismes inflammatoires (notamment polyarthrite rhumatoïde et spondylarthrite ankylosante). Il s'agit d'une molécule active peu soluble dans l'eau, limitant son absorption par voie orale.

Après un traitement chronique, des effets indésirables potentiellement graves (gastrite, ulcère de l'estomac ou du duodénum, hémorragie du tube digestif) sont fréquemment rapportés. L'application cutanée d'indométacine permettrait de prévenir ces effets indésirables tout en améliorant la biodisponibilité au site d'action. Cependant, le stratum corneum (SC) limite le passage de l'indométacine. Pour franchir cette barrière, la nanovectorisation peut être intéressante. L'intérêt de ce protocole est de développer une forme cutanée d'indométacine qui n'existe pas sur le marché actuellement. Cette formulation de nanoparticules vise à démunir

ou même éviter les effets indésirables au niveau de tube digestif, apportant un intérêt par rapport aux formes déjà commercialisées. De plus, une forme cutanée permettra de diminuer la dose administrée d'indométacine

L'objectif du projet est d'étudier l'efficacité anti-inflammatoire de l'indométacine seule ou associée à une huile végétale, encapsulée dans des nanoparticules polymériques sur un œdème créé au niveau des oreilles de souris.

Cette étude in vivo est nécessaire, car dans une étude in vitro, les données qui seraient récoltées ne permettraient pas de saisir l'ensemble de l'impact de cette formulation sur la multitude et la complexité des cascades réactionnelles entrant en jeu dans l'inflammation. En effet, il serait bien difficile de pouvoir en apprécier le potentiel clinique en ne dosant que des cytokines ou autres marqueurs de l'inflammation. L'utilisation d'un modèle animal apparaît indispensable à un tel stade de développement de cette formulation galénique. Un tel modèle permettra de pouvoir observer directement la réponse de l'animal chez lequel un œdème local aura été provoqué. Aucune technique actuellement disponible ne permet d'aller aussi loin.

La littérature est riche d'exemples faisant état de l'usage notamment de la souris comme modèle animal adapté pour l'étude de l'efficacité de l'indométacine. Il s'agit d'un animal dont l'usage est répandu, bien connu et maîtrisé. Une attention particulière sera portée au bien-être des animaux et des mesures de raffinement seront mises en place pour limiter au maximum le stress et la douleur : maintien des animaux en groupe pendant l'étude, anesthésie générale pour la mesure de l'œdème et l'application des molécules, raccourcissement des ongles pour éviter les griffures et grattages excessifs aux oreilles, mise en place d'un gel anesthésiant sur les oreilles pour limiter la douleur. Les souris seront observées régulièrement pendant l'étude et la mise en place de points limites adaptés permettront d'anticiper toute douleur inutile pour l'animal. Le nombre total de souris requis pour cette étude a été fixé à 28, ce qui garantira une bonne robustesse statistique tout en limitant au maximum l'utilisation des animaux, en tenant compte de la variabilité inter-individu pour la réaction au xylène.

4815. Le but du laboratoire est de comprendre les mécanismes à l'origine des conséquences délétères de l'hypoxie intermittente chronique (HIC), un modèle du syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAS). Cette pathologie touche 5 à 20% de la population et est associée à de nombreuses autres pathologies parmi lesquelles, les pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension ou l'infarctus du myocarde.

Le SAS est le trouble respiratoire nocturne le plus fréquent dans la population et est un facteur de risque indépendant de la survenue d'évènements cardiovasculaires fatals et non fatals. Si le traitement actuel de référence du SAOS semble fonctionner lorsqu'il est bien toléré, il apparaît essentiel de comprendre les mécanismes à l'origine de ces pathologies associées dans le but de proposer des compléments ou des alternatives thérapeutiques à ce traitement. Le SAS est caractérisé par plusieurs composantes dont l'hypoxie intermittente (HI) chronique connue pour avoir le plus fort impact en termes de conséquences délétères cardiovasculaires. Ainsi, d'un point de vue scientifique, dans le but d'étudier de nombreux mécanismes susceptibles d'expliquer la mort cellulaire induite par l'HI chronique, l'utilisation de l'expérimentation animale est indispensable.

Particulièrement, nous nous intéressons à divers acteurs connus pour être impliqués dans les phénomènes de survie ou de mort des cardiomyocytes suite à des protocoles d'ischémie-reperfusion (I/R), mimant l'infarctus du myocarde. Pour réaliser ce projet, nous avons donc besoin d'exposer des souris à la normoxie (N) ou à l'HI, de réaliser la technique d'I/R myocardique, in vivo, et enfin d'avoir recours à des techniques de prélèvements d'organes suivies de biologie cellulaire et moléculaire. Après avoir montré au laboratoire, en HI, le rôle majeur de HIF-1 dans les mécanismes cellulaires induisant une augmentation de la taille d'infarctus.

Le projet a pour but de traiter les conséquences de l'HI en modifiant l'activité de HIF-1, avec différentes molécules inhibant HIF-1, dont la curcumine. Toutes les molécules utilisées seront déjà testées sur un modèle cellulaire, et seront utilisées chez l'animal si la molécule ne présente aucune toxicité. La molécule la plus efficace pour inhiber HIF-1 pourra être à terme, testée chez des patients atteints du SAS.

Réduire: Nous avons choisi de travailler avec des souris (600) exposées à la N ou à l'HI pour plusieurs raisons. L'utilisation d'un modèle murin est encouragée par nos travaux précédents dans lesquels nous avons reproduit les conséquences délétères du SAS. Le nombre de souris utilisées est adapté pour réaliser les tests statistiques.

Remplacer: Les lignées de cellules cardiaques de souris adultes n'existent pas et il est donc nécessaire de travailler avec des cellules cardiaques provenant d'une isolation de cœurs de souris adultes, pour explorer certains mécanismes cellulaires.

Raffiner : tous les échantillons seront conservés de façon optimale dans le but de pérenniser notre matériel de travail. Le choix des techniques est varié et nous sommes dans l'obligation d'utiliser diverses techniques (in vivo et ex vivo) pour tester nos hypothèses très mécanistiques. Enfin, concernant le bien-être des animaux, ils seront hébergés selon les règles de bien-être des animaux dans une animalerie adaptée et autorisée. Les animaux ne seront jamais manipulés dès leur arrivée dans l'animalerie mais uniquement après 8 jours de stabulation. Les animaux seront observés quotidiennement dans leur cage d'hébergement pour s'assurer qu'ils ne sont pas stressés et qu'ils ont accès à l'eau et à la nourriture à volonté. Les animaux sont anesthésiés pour la technique d'I/R par injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (60 mg/kg) ou d'un mélange de kétamine/xylazine (100/10 mg/kg). En cas d'apparition de signes de souffrance ou blessure, saignement, irritation importante, agressivité non naturelle envers ses congénères, perte de poids supérieure à 20% de la masse corporelle au cours du protocole, l'animal concerné sera retiré du protocole et euthanasié par injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique.

4816. Les personnes accueillies à l'hôpital suite à un traumatisme crânien développent très fréquemment des pneumonies (infections nosocomiales) suite à une baisse transitoire des défenses de l'organisme (système immunitaire). Il est connu que le système nerveux module et influence les capacités de défense de l'organisme mais le(s) mécanisme(s) est (sont) inconnu(s).

Les cellules dendritiques (CDs) sont des cellules de l'immunité ayant un rôle primordial dans le contrôle de l'état d'activation du système immunitaire. Afin d'éviter un emballement de notre système de défense et éviter ainsi l'apparition de maladies inflammatoires chroniques, les CDs ont la capacité d'éteindre l'activation des cellules de l'immunité (rôle anti-inflammatoire).

Suite à un traumatisme crânien, la réponse inflammatoire systémique est suspectée d'induire une modification de l'activité des CDs vers une fonction anti-inflammatoire excessive. Cette réponse anti-inflammatoire excessive pourrait être à l'origine de l'incapacité des malades dans les services de réanimation, à réagir contre une contamination bactérienne expliquant ainsi l'augmentation de leur susceptibilité à l'infection.

De nombreuses recherches portent sur les extraits d'algues tant dans le domaine de la phytothérapie que dans le domaine pharmaceutique. Les extraits d'algues auraient une influence favorable sur notre écosystème digestif, sur le microbiote, sur notre système nerveux entérique. Ils pourraient également agir sur la croissance de bactéries pathogènes et stimuler la production de médiateurs de l'immunité.

L'objectif principal de notre étude est d'évaluer les effets immunomodulateurs d'extraits d'algues vertes sur la susceptibilité des souris à réagir (d'un point de vue bactériologique, immunitaire et histologique) face à une infection bactérienne induite par une pneumopathie suite à un traumatisme crânien. L'objectif secondaire est de comparer cet effet avec celui de deux antibiotiques actifs contre les souches de *S. aureus* (linézolide et vancomycine). En effet, il est intéressant d'étudier en parallèle l'action d'agents antibactériens présentant des mécanismes d'action différents, qui vont pouvoir également moduler la réponse de l'hôte en agissant conjointement sur la charge bactérienne et la libération de PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern).

Deux souches de *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (présentant des profils de virulence différents) seront évaluées dans ce projet.

Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons 1824 souris Swiss mâle et 1050 souris C57BL/6.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduite, Raffiner). L'étude de l'influence du système nerveux ne peut se faire que dans un organisme entier. Le nombre de souris a été réduit au minimum possible tout en permettant une analyse statistique fiable. Enfin, le bien-être des souris sera surveillé tout au long de l'étude.

4817. Le but de ce projet est de tester l'effet d'un médicament sur l'évolution des pathologies rénale et hépatique développées chez les patients atteints de la glycogénose de type 1a. La glycogénose de type 1a est une maladie rare due à l'absence de production de sucre (glucose) par le foie, les reins et l'intestin, entraînant des hypoglycémies sévères. De plus, ces patients ont un gros foie qui stocke des sucres et du gras et développent à l'âge adulte des tumeurs hépatiques ; ils présentent aussi une perte de la fonction des reins qui progresse lentement, mais irréversiblement, vers une insuffisance rénale.

Nous disposons de modèles de souris uniques reproduisant la glycogénose de type 1a avec soit uniquement dans le foie, soit dans les reins. Ces souris régulent leur glycémie grâce à une production de glucose compensée par les organes non malades. L'accumulation de graisses dans le foie et les reins étant néfastes pour le bon fonctionnement de ces organes, nous proposons de traiter ces souris avec un médicament (fénofibrate). Ce médicament est déjà utilisé chez l'homme dans le traitement de l'excès de cholestérol et de triglycérides (graisses) dans le sang. Des résultats préliminaires chez l'animal ont montré un effet protecteur de cette molécule sur les reins en empêchant l'accumulation de graisses.

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

Remplacement :

Bien que les patients atteints de glycogénose de type 1 soient traités avec ce médicament dans le cas de taux importants de triglycérides dans le sang, il semble intéressant de proposer un traitement pour limiter le développement de la pathologie hépatique et rénale. L'étude ne peut être réalisée que chez l'animal pour apporter les preuves moléculaires de l'efficacité du traitement au niveau du foie et des reins, organes non accessibles chez l'homme.

Réduction: Le nombre de souris a été calculé au plus juste pour valider cette preuve de concept. Trois lots de 10 souris atteintes de glycogénose hépatique et un lot de 10 souris atteintes de glycogénose rénale seront traités avec le médicament pendant 3 mois. Le début du traitement se fera à un stade précoce du développement de la pathologie, c'est à dire à 6 mois après son induction. En référence, un lot de 10 souris atteintes de glycogénose dans le foie et un lot de 10 souris atteintes de glycogénose rénale ne seront pas traités. Tous les animaux seront mis à mort 9 mois après l'induction de la maladie. A ce stade, aucune souffrance animale n'a été observée.

Dans un souci de raffinement des méthodes, les animaux seront élevés par groupe de 5 dans un environnement enrichi pour favoriser la nidation, avec accès libre à la nourriture et l'eau de boisson, et seront suivis quotidiennement. Afin d'éviter le gavage quotidien des souris, le fénofibrate sera incorporé dans la nourriture standard. L'évolution de la pathologie sera étudiée à partir d'une analyse de sang et d'urine à la fin du traitement. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever le foie et les reins pour analyser le métabolisme et la structure histologique.

Les expériences réalisées in vivo chez la souris permettront de mieux adapter le traitement des patients atteints de glycogénose de type 1a.

Le nombre total d'animaux a été calculé au plus juste à partir de nos connaissances sur l'évolution de la pathologie dans ce modèle animal et sera limité à 60 souris sur une période de 3 ans.

4818. L'hémophilie est une maladie génétique, grave et invalidante, caractérisée par d'importantes hémorragies, conséquence d'un retard de la coagulation sanguine. Elle est causée par la déficience constitutionnelle en facteurs dit « anti-hémophiliques », sans lesquels la coagulation est impossible.

Actuellement, le traitement consiste en l'injection répétée du facteur de la coagulation manquant au malade. Deux principales stratégies sont alors menées pour améliorer le traitement : (1) l'augmentation des caractéristiques intrinsèques aux facteurs anti-hémophiliques injectés (demi-vie, activité spécifique) et (2) la thérapie génique visant à restaurer l'activité de production protéique. Parallèlement, de nouveaux concepts visent à influencer, à l'aide de séquences d'acides nucléiques, sur l'équilibre entre les facteurs initiateurs et inhibiteurs de la coagulation sanguine.

L'objectif de ce projet est d'étudier sur un modèle de souris hémophile, la durée et l'efficacité de matériels nucléiques codant pour des protéines d'intérêt thérapeutique pour la coagulation ou visant à modifier son équilibre.

Habituellement, ces acides nucléiques sont apportés à la cellule par le biais de vecteurs (viraux pour la plupart) mais peuvent être, dans des conditions d'injection strictes, intégrés dans les cellules sous la forme de molécules nues.

Le protocole, basé sur une littérature riche, visera à comparer l'injection, en une seule fois, du matériel génétique nu, par voie intraveineuse et la mesure des conséquences sur la coagulation sanguine chez un modèle de souris hémophiles et chez des souris non-hémophiles. À raison d'une fois par semaine voire tous les quinze jours, des échantillons de sang seront ensuite prélevés sur chacune des souris de façon à suivre l'évolution de l'effet de chaque type d'acide nucléique et ce sur une période allant de 1,5 à 3 mois.

S'il n'y a pas, d'après la littérature, de signes de douleurs chez l'animal, nous effectuerons une phase pilote, afin d'optimiser l'efficacité de la technique tout en protégeant l'animal de tout effet indésirable.

Cette étape de mise au point technique nous permettra de (1) s'assurer de la capacité des souris hémophiles à supporter la technique en les comparant aux souris « normales, non-hémophiles », et (2) d'évaluer la bénéfice et/ou la nécessité d'associer un traitement prophylactique des effets secondaires et indésirables.

En effet, la technique est à l'origine de troubles cardiorespiratoires d'installation rapide mais tout aussi rapidement et spontanément résolutifs. Pourtant, si elle ne préconise aucun traitement antalgique ni de prise en charge de l'arythmie cardiaque et de ses conséquences sur les fonctions respiratoires, nous proposons d'évaluer le bénéfice de traitements antalgiques et analeptiques sur le bien-être de l'animal et sur l'efficacité de la technique.

Il est important de préciser que la souris hémophile, paradoxalement à la forme humaine de cette altération génétique, ne présente aucun phénotype dommageable. Elle n'est donc pas victime de saignement spontané et tout saignement provoqué sur la souris hémophile est résolutif et ce sans prise en charge. Si la souris hémophile, A ou B, a des résultats biologiques comparables concernant les taux de facteurs de la coagulation, elle n'est donc pas frappée de la même sévérité phénotypique et toutes les manipulations effectuées sur les souris normales peuvent l'être sur la souris hémophile sans complication.

Afin d'obtenir des résultats les plus fiables possibles, ce projet répond aux mieux aux critères de remplacement, de réduction et de raffinement :

- 1) Remplacement : la souris est un modèle éprouvé, fiable et de nombreuses lignées hémophiles A et B sont disponibles
- 2) Réduction : le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit à son minimum sans compromettre la significativité statistique de l'expérimentation
- 3) Raffinement : toutes les mesures seront prises pour préserver le bien-être de l'animal. Les conditions de l'élevage, de l'hébergement, des soins et des méthodes utilisées pour chaque étape de l'expérimentation se feront sous condition de minimiser douleurs, souffrance, angoisse et dommages durables que pourraient ressentir l'animal.

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

Le matériel nucléique utilisé au cours de la phase pilote sera un plasmide comprenant le gène humain du facteur VIII de la coagulation, utilisé dans le laboratoire depuis plus de 15 ans. Ce matériel nucléique nu ne comprendra donc pas de séquence capable d'être intégrée au génome de l'animal. Ce type d'insert n'induit donc ni pathologie, ni caractéristiques génétiques nouvelles chez les modèles, qu'elles soient transmissibles à la descendance ou non. L'injection de matériel nucléique nu chez le rongeur ne doit donc pas être considérée comme génératrice d'individus génétiquement modifiés puisque l'expression de ces séquences ne sera que transitoire.

La technique d'injection proposée ci-après cible majoritairement le foie (~40%) pour une durée d'expression estimée à une dizaine de semaines.

Le reste du matériel se dissémine dans la circulation mais sera rapidement dégradé par les nucléases sanguines. Le matériel génétique utilisé dans ce projet est donc du groupe I. Suite au traitement, il ne sera donc pas nécessaire de prévoir de conditions de confinement particulières pour les souris.

Nombres de nos collaborations sur ce projet, françaises comme étrangères, appliquent déjà cette technique dont nous soumettons le projet.

Selon les données antérieures de l'équipe, nous estimons le nombre d'individus à 25 par modèle donc 50 souris pour une durée totale de 1 an.

4819. Avec plus de 40 000 nouveaux cas et 17.000 victimes par an, le cancer colorectal (CCR) est la plus fréquente des tumeurs malignes et la deuxième cause de décès par cancer en France. Si la survie relative à 5 ans est de 57 %, le pronostic est étroitement lié au stade auquel le cancer est diagnostiqué. Notamment, elle n'est que de 5 % en cas de cancer métastatiques malgré l'amélioration de la chirurgie, des chimiothérapies et des thérapies ciblées. A ce jour, la chirurgie et des cocktails de chimiothérapies systémiques (5-fluorouracile, l'irinotécan, et l'oxaliplatine) visant uniquement les cellules tumorales en prolifération demeurent la pierre angulaire du traitement des CCR métastatiques. Cependant, l'efficacité de ces traitements est fortement entravée par l'apparition fréquente de la résistance aux médicaments et la récurrence tumorale. La compréhension des

mécanismes biologiques impliqués dans la récurrence tumorale a connu un essor important avec la découverte de l'existence des cellules souches cancéreuses (CSC) dans de nombreux cancers, incluant le cancer du côlon. Des données récentes montrent que ces CSC résisteraient aux thérapies conventionnelles et seraient à l'origine de l'apparition de métastases et de la récurrence tumorale. Nous avons préalablement montré que le récepteur nucléaire PXR conférerait aux cellules tumorales humaines une augmentation de la résistance aux chimiothérapies. Nos derniers travaux montrent que cette voie de régulation est exacerbée dans les cellules souches cancéreuses, suggérant que PXR pourrait être un «interrupteur moléculaire» anormalement activé au sein de cette population cellulaire, ce qui potentialiserait leur résistance source de récurrence tumorale. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous voulons évaluer l'effet d'un inhibiteur pharmacologique de PXR sur le potentiel d'échappement aux chimiothérapies et d'initiation tumorale des cellules cancéreuses métastatiques. Pour mener à bien notre projet, nous réaliserons des injections de cellules tumorales obtenues à partir de biopsies de patients dans des souris immunodéprimées afin de déterminer les effets d'un inhibiteur pharmacologique de PXR comme stratégie néoadjuvante, en association avec une chimiothérapie classique (Foliri).

La prolifération tumorale sera suivie par mesure directe du volume tumoral à l'aide d'un caliper pour les tumeurs sous-cutanées ou grâce à une approche d'imagerie de bioluminescence pour les tumeurs internes (métastases hépatiques). Ces approches non invasives permettent de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les protocoles expérimentaux car chaque animal est son propre contrôle, puisqu'il n'y a pas de sacrifices à chaque temps. En outre, l'imagerie permet de raffiner le projet puisqu'elle fournit des informations complémentaires aux techniques classiques ex-vivo. Pour l'ensemble de ce projet, nous avons prévu un nombre de 70 souris sur une durée de 5 ans.

4820. Depuis longtemps, diverses études mettent en avant le rôle du sommeil sur la consolidation des informations en mémoire. Des études ont montré chez l'homme une diminution des performances mnésiques chez les sujets éveillés par rapport aux sujets ayant pu dormir ce qui suggère que le sommeil joue un rôle favorable sur la mémorisation. La formation de la mémoire est un processus qui fait intervenir des phénomènes de consolidation ou de dépression dans les connexions entre neurones aussi appelés plasticité synaptique ceci afin de favoriser la redistribution et la réorganisation des représentations en mémoire à long terme et engendrer la persistance ou l'oubli des informations.

La présente étude cherche à déterminer les processus de plasticité synaptique dans le cerveau et de déterminer quelle est l'évolution de cette plasticité au cours des différents stades du sommeil dans différentes formes de mémoire. Nous pouvons ainsi opposer deux formes de mémoires : la mémoire à long terme (altérée par l'oubli d'information) et la mémoire à court terme (nécessitant celui-ci). En effet, cette mémoire à court terme, permettant le stockage d'information sur une courte durée et indispensable à notre vie quotidienne (elle nous permet de nous remémorer une place de parking ou un numéro de téléphone le temps de le noter sur un bout de papier), est particulièrement sensible aux interférences, informations préalablement stockées mais non-indispensables qu'il est nécessaire d'effacer une fois une tâche accomplie. Cette étude cherche donc à comprendre les mécanismes permettant aux phases de sommeil d'induire un effacement bénéfique des informations non pertinentes qui peuvent devenir problématiques par saturation de la mémoire.

Le protocole expérimental consiste à pratiquer une implantation chronique stéréotaxique d'électrodes corticales, intracérébrales et musculaires. Les enregistrements polygraphiques continus ne peuvent être effectués qu'avec des électrodes implantées chirurgicalement.

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

1) Remplacement :

Le sommeil et la mémoire ne peuvent s'étudier que dans les conditions in vivo chez l'animal entier. Les mammifères sont les seuls animaux possédant un cycle veille/sommeil semblable à celui de l'homme. L'utilisation des animaux est donc indispensable à une meilleure compréhension des mécanismes neurophysiologiques régulant la mémorisation et son maintien/oubli durant les états de vigilance.

2) Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre l'objectif du projet qui est de caractériser la plasticité synaptique au cours des états de vigilance au cours de plusieurs tâches d'apprentissage et de la comparer à celui de rats impliqués dans des tâches contrôle.

Nous prévoyons d'utiliser 60 rats. Ce nombre d'animaux est nécessaire car nous allons étudier plusieurs apprentissages comportementaux et leur contrôle respectif. Ce nombre se justifie aussi par le fait que chaque rat ne pourra pas être soumise aux différents apprentissages (phénomènes de sur-apprentissage biaisant les performances des animaux).

3) Raffinement :

Les études sur le sommeil et la mémoire nécessitent des observations sur des animaux non anesthésiés vivants dans de bonnes conditions psychophysiologiques.

Le bien-être des animaux est donc une condition sine qua non de chaque étape de l'expérimentation. 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.

Durant les enregistrements l'animal est libre de ses mouvements. L'implantation des électrodes se fait sous anesthésie générale par du personnel compétent. Après la chirurgie les animaux sont laissés au repos une dizaine de jours, pendant lequel leur bien-être est surveillé quotidiennement. Enfin la privation de nourriture nécessaire à l'induction de la motivation et ses conséquences sont drastiquement contrôlées et la perte de poids reste modérée (10-15%).

4821. Le projet vise à étudier le devenir des antibiotiques après administration par voie orale ou par voie intraveineuse à des agneaux sevrés. Ce projet permettra de fournir des résultats préliminaires dans le cadre d'un contrat de recherche qui a pour objectif de mieux utiliser les antibiotiques en élevage d'engraissement où sont regroupés plusieurs centaines à plusieurs milliers d'agneaux. La connaissance du devenir de l'antibiotique dans l'animal permettra de mieux ajuster les doses en élevage et de contribuer à réduire l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire.

Pour chaque antibiotique testé, 10 agneaux seront inclus. Ces agneaux recevront un antibiotique autorisé en France et des prises de sang seront réalisées. Ils seront hébergés en bergerie par lot de 10 afin d'éviter tout stress de séparation, les agneaux ayant besoin pour leur bien-être de rester en groupe. Lors des prises de sang qui seront réalisées après administration des antibiotiques par voie orale ou par voie intraveineuse, ils seront le plus possible gardés en lot. Ils ne seront séparés du groupe que le jour des administrations dans des petits boîtes côte-à-côte et seront placés deux par deux.

Les agneaux repartiront en élevage à la fin du projet seulement après que le temps d'attente dans les viandes et abats de chaque antibiotique testé ait été respecté (par exemple, il faut attendre 12 jours après l'administration de Trisulmix pour pouvoir consommer la viande d'un agneau ayant été traité avec la molécule. Même si les agneaux ne seront normalement pas abattus directement après leur retour en élevage car trop jeunes, nous respecterons tout de même ce temps d'attente avant le retour à l'éleveur).

Le projet initial prévoit de tester 4 antibiotiques, soit 40 agneaux répartis en 4 lots de 10 agneaux. Huit des agneaux de chaque lot (2 agneaux par lot sont prévus en plus au cas où il faudrait traiter un ou des agneaux avec un antibiotique ou un traitement pouvant interférer avec la cinétique) recevront une administration par voie orale d'un des antibiotiques testés la première semaine, une administration par voie intraveineuse du même antibiotique la semaine suivante, et une nouvelle administration par voie orale du même antibiotique la troisième semaine.

Après chaque administration, 13 prises de sang de 2 ml seront effectuées dans les 3 jours suivants chaque administration tout en ne dépassant pas 10% de la volémie totale sur le total des prises de sang réalisées sur les trois semaines. Si un hématome se forme lors d'un prélèvement, il sera possible de poser une boule de glace sur le cou des agneaux pour le réduire et soulager la douleur.

L'administration par voie orale est l'administration privilégiée en élevage pour traiter un grand groupe d'animaux, d'où son utilisation ici. Le fait d'en faire une, juste après la phase d'acclimatation et l'autre, deux semaines après permettra de déterminer s'il y a un effet du statut pré-ruminant/ruminant sur les concentrations plasmatiques en antibiotiques et sur les paramètres pharmacocinétiques de la molécule. L'administration par voie intraveineuse est quant à elle une voie d'administration de référence pour déterminer certains paramètres pharmacocinétiques d'une molécule comme sa biodisponibilité par voie orale.

Les animaux ne seront manipulés que par du personnel habitué au travail avec des animaux de rente et on réduira au minimum le nombre de personnes manipulant les animaux, ces personnes ayant obligatoirement côtoyé les agneaux pendant leur phase d'acclimatation. Ils seront surveillés quotidiennement, y compris les week-ends et les jours fériés. Une attention plus particulière sera apportée aux premiers jours suivant l'arrivée des agneaux, période critique du sevrage lors du passage des ateliers laitiers aux ateliers d'engraissement. Pour essayer au maximum d'éviter toute diarrhée, un traitement anticoccidien sera administré systématiquement à l'arrivée des agneaux.

4822. Le vaccin contre la Fièvre Jaune (due au virus amaril) est l'un des plus efficaces, si ce n'est le plus efficace, de toute l'histoire de la vaccination. En effet, 95% des individus vaccinés sont protégés pendant 30 à 35 ans, voire toute la vie, par une seule injection. Le but principal de ce projet est d'identifier les raisons de cette efficacité, afin d'en tirer les enseignements nécessaires au développement de nouveaux vaccins contre d'autres maladies infectieuses. Les avancées technologiques des dernières années ont permis d'étudier un très grand nombre de paramètres de la réponse immune chez les individus vaccinés par le vaccin anti-amaril, néanmoins, ces études n'ont pas fourni les renseignements attendus car elles manquent de comparaisons avec des individus exposés au virus pathogène de la Fièvre Jaune (YFV) avec ou sans vaccination préalable. Pour cela, nous aurons recours aux primates non humains (PNH) seul modèle pertinent de l'infection de l'homme par le YFV.

Le projet se déroulera en deux étapes principales. L'une s'attachera à identifier un très grand nombre de paramètres caractérisant la réponse immunitaire induite par le vaccin anti-amaril. L'autre sera focalisée sur l'étude des paramètres caractéristiques de la réponse contre le YFV avec ou sans vaccination préalable.

Le projet prévoit au maximum 100 PNH nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : immunisations, inoculation virale et prélèvements de sang et biopsies sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet.

Des échantillons biologiques produits dans ce projet seront partagés avec d'autres laboratoires afin de limiter le recours au modèle PNH. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés par paires avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales et ils bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule de l'établissement en charge du bien-être animal.

4823. Les tests décrits dans ce projet permettent d'évaluer l'effet de produits pharmaceutiques sur l'activité cérébrale sur des tranches d'une structure cérébrale spécifique (ex-vivo) ou sur l'animal vigile (in-vivo). La mesure du potentiel de champ est une technique largement utilisée pour évaluer la transmission synaptique au niveau de certaines structures cérébrales et notamment au

niveau de l'hippocampe. Le profil pharmacologique de produits peut être déterminé grâce à la mesure de l'EEG chez l'animal vigile. L'effet de substances sur le rythme circadien peut également être évalué par la mesure de l'EEG chez l'animal vigile. Ces tests sont également utilisés pour évaluer de potentiels effets adverses de nouveaux produits pharmaceutiques sur l'activité cérébrale.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et est mis en œuvre à grande échelle au sein des laboratoires de pharmacologie. Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs (souris ou rat) ou de chiens, dans certains cas, et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substances pharmacologiques sur l'activité cérébrale de façon à prédire leur efficacité clinique ou leur innocuité sur le système nerveux central. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque test a été optimisé pour interpréter les résultats de façon à pouvoir interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons pour les 5 prochaines années, que nous utiliserons environ 2650 rongeurs et 30 chiens. Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'anxiété.

4824. Environ 10% des décès dans le monde sont d'origine traumatique et 30 à 40% d'entre eux sont liés à une hémorragie. L'état de choc hémorragique est caractérisé 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, un substitut d'hémoglobine peut être un excellent candidat. Le substitut utilisé pour ce projet a démontré sa grande capacité de fixation de l'oxygène (156 molécules d'O₂ à saturation). Si son innocuité a été montrée (pas de mortalité après injection chez la souris), l'effet hyper- ou hypotenseur de la molécule doit être testé. Ce projet a pour objectif d'évaluer l'effet de quatre formulations du même substitut d'hémoglobine sur la pression artérielle. In fine, l'objectif est de réaliser des travaux précliniques permettant d'évaluer l'intérêt et l'innocuité de quatre nouvelles formulations d'un substitut de l'hémoglobine (comparativement à la formulation actuelle) de proposer, en fonction des résultats, des essais cliniques.

Ce projet a une durée de 12 mois. Il impliquera l'utilisation de 80 rats Sprague Dawley.

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

- il s'agit d'une étude des effets au niveau de l'organisme pour laquelle le remplacement n'est pas possible
- le nombre d'animaux utilisés est limité au minimum permettant une étude statistique cohérente, et en accord avec le principe de réduction.
- le raffinement est respecté au niveau des conditions d'hébergement des animaux et au niveau des procédures d'anesthésie/Analgésie.

4825. Le cancer du col de l'utérus est le deuxième cancer féminin dans le monde et est responsable de près de 200 000 décès annuel. L'origine de ce cancer provient d'une infection par le papillomavirus humain (HPV), un virus à ADN bicaténaire ayant un tropisme pour les kératinocytes des épithéliums malpighiens. La plupart du temps, les HPV sont associés à des infections asymptomatiques, mais ils sont également à l'origine de verrues, de condylomes et de cancers tels le cancer du col de l'utérus. Les facteurs de l'hôte impliqués dans la diversité de devenir de l'infection par HPV restent encore largement méconnus.

Des observations faites dans le contexte du WHIM, un syndrome d'immunodéficience rare présentant une étonnante susceptibilité sélective aux infections par HPV (i.e. dysplasies génitales et verrues abondantes et persistantes), nous ont permis de suspecter un rôle de l'axe de signalisation impliquant la chimiokine CXCL12 et ses récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans la pathogénie virale. Cet axe est connu pour réguler de nombreux processus physiologiques et pathologiques tels que l'homéostasie des leucocytes, la prolifération et la survie cellulaire ainsi que la tumorigénèse. Le syndrome WHIM est dû à des dysfonctions de l'axe CXCL12, qui résultent de mutations gain de fonction du gène codant pour CXCR4. Nous avons montré que de telles dysfonctions de l'axe CXCL12 contribuaient de manière critique à la dysplasie induite par HPV. De plus, nous avons identifié l'existence d'une interaction plus générale, au-delà du syndrome WHIM, entre l'axe CXCL12 et le cycle de réplication d'HPV. L'ensemble de ces résultats repose notamment sur l'utilisation d'antagonistes de l'axe CXCL12/CXCR4/CXCR7.

Afin de mieux comprendre le rôle de l'axe de signalisation impliquant CXCL12 et ses deux récepteurs dans la pathogénie d'HPV (dysplasie et verrues cutanées), nous évaluerons l'impact d'antagonistes de l'axe CXCL12 sur des souris transgéniques pour HPV (K14-HPV16). De plus nous étudierons l'impact du gain de fonction de CXCR4 sur la pathogénie HPV en croisant des souris présentant la mutation associée au syndrome WHIM et des souris K14-HPV16. Notre projet respecte la règle d'éthique des trois R (Remplacement, Réduction, Raffinement) :

- Nous avons choisi le modèle murin comme méthode alternative au modèle primate non humain,
- Nous avons réduit au maximum le nombre de souris (362) permettant une mise au point du protocole et une analyse statistique significative. En plus notre projet est basé sur les résultats d'une analyse in vitro (i.e. 3D organotypic cell cultures), permettant ainsi de diminuer le nombre de procédures expérimentales.

- Notre projet respecte également le « bien-être animal » - nos animaux étant hébergés dans une animalerie agréée qui prend en compte le bien-être animal. Nos procédures expérimentales sont optimisées et les points limites sont clairement définis, ce qui nous permet d'identifier le moment où nous devons arrêter l'expérience pour éviter la souffrance et / ou la détresse de l'animal, sachant que nous avons choisi des procédures de classe légère de sévérité. À terme, nos travaux pourraient nous permettre de décrypter les mécanismes conduisant au développement de la pathogénie d'HPV et de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques.

4826. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques présentant potentiellement des propriétés anti-inflammatoires. L'évaluation de ces substances se fait par l'intermédiaire de tests validés nous permettant ainsi d'écarter des molécules présentant des effets indésirables et de garder des molécules qui pourraient faire preuve d'efficacité dans certaines pathologies.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et est mise en œuvre à grande échelle au sein de laboratoires travaillant sur des modèles d'inflammation. Ces tests nécessitent l'utilisation principalement de rongeurs et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que la plupart des modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substances pharmacologiques sur une inflammation induite chez l'animal de façon à prédire leur efficacité clinique. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque test a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre de rongeurs et furets qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 2250. Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

4827. De brèves séquences d'ischémie-reperfusion imposées par le gonflage répété d'un brassard à tension au niveau d'un membre peut induire une résistance contre les lésions provoquées par une ischémie-reperfusion au niveau d'un organe situé à distance. Alors que les mécanismes précis de conditionnement ischémique à distance sont inconnus, nous avons identifié la voie de la kynurénine et plus particulièrement la kynurénine comme l'un des médiateurs impliqués (brevet déposé). Cette voie aboutit à la formation de deux métabolites importants : l'acide quinolinique (réaction catalysée par l'enzyme KMO) et l'acide kynurénique (réaction catalysée par l'enzyme KAT). Ce projet a pour objectifs 1) d'étudier in vivo les potentiels effets cardioprotecteurs de la voie de la kynurénine dans un modèle d'ischémie-reperfusion myocardique chez le rat en évaluant la dose efficace de kynurénine et en déterminant le métabolite responsable de la cardioprotection à l'aide d'inhibiteurs des enzymes de la voie de la kynurénine; 2) d'examiner in vitro l'effet protecteur de la kynurénine et de ses métabolites sur la viabilité cellulaire après hypoxie-réoxygénation dans un modèle de cardiomyocytes isolés de cœur de rat; et 3) d'analyser in vitro l'influence de la kynurénine et de ses métabolites sur la respiration des mitochondries et la dynamique mitochondriale dans les cardiomyocytes isolés. Enfin, nous étudierons les voies de signalisation activées dans le cœur après ischémie reperfusion myocardique avec ou sans kynurénine (par western blot) comme les voies de survie (Voie RISK et safe) qui sont activés très tôt et d'autres voies activées plus tard comme la voie des sirtuines.

Tous les animaux bénéficieront d'une analgésie et d'une anesthésie au cours des procédures chirurgicales, ainsi que d'une analgésie dans les suites opératoires. Cette étude sera réalisée chez le rat qui est un modèle de choix pour l'infarctus du myocarde aigu. Ce modèle est validé et est parfaitement maîtrisé au laboratoire. 474 rats au total seront utilisés pour ce projet. Conformément à la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés a été minutieusement établi de sorte qu'il y ait une utilisation optimale des animaux (Réduire). Seules les expériences indispensables seront réalisées et il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience. La souffrance de l'animal sera réduite au maximum ou supprimée par l'utilisation d'anesthésique (pentobarbital sodique 80mg/Kg) et d'analgésique (buprénorphine 0.1mg/Kg) aux doses appropriées (Raffiner). De plus, il n'existe pas de méthode alternative, ni de modélisation possible de l'infarctus du myocarde aigu (Remplacer).

4828. La lignée de souris immunodéficientes NOD-SCID-IL2R gamma-/- (NSG) est une lignée utilisée comme modèle préclinique dans de nombreux domaines de recherche (cancérologie, virologie, transplantation, etc...). Ces souris ne possèdent pas de système immunitaire propre car elles n'ont pas de lymphocytes T, ni B matures, ni de cellules NK fonctionnelles. Cette lignée permet la greffe de cellules hématopoïétiques humaines périphériques ou souches.

Nous utilisons cette lignée de souris dans différents projets pour l'étude des mécanismes impliqués dans la réponse immune à la transplantation. Le point limitant dans l'humanisation de ces souris NSG est le peu des cellules myéloïdes humaines retrouvées dans le sang périphérique murin, ce qui limite les études portant sur cette population cellulaire notamment.

Des souris NSG (NSG-SGM3) exprimant des cytokines humaines permettent une prise de greffe de cellules humaines supérieure à celle observée dans la lignée NSG notamment des cellules myéloïdes humaines.

Le projet, présenté ici, consiste à réaliser une étude comparative de l'humanisation des souris NSG et NSG-SGM3 par des cellules hématopoïétiques humaines et disposer à terme d'un modèle performant, utilisé en fonction des études ciblant telle ou telle population cellulaire immune notamment dans l'étude de la fonction des cellules myéloïdes humaines immatures dans l'immunosuppression.

Dans cette saisine, la règle des 3R sera suivie de la façon suivante :

-Remplacer : Le modèle de souris humanisée représente une alternative solide à l'utilisation préclinique des primates.

-Réduire : Cette saisine est une étude comparative et les résultats devront être suffisamment solides pour nous permettre de choisir entre l'une des deux lignées afin d'élargir le champ d'investigation de nos recherches. Le nombre d'animaux et la taille des groupes ont été réfléchis afin d'obtenir des résultats robustes permettant notre choix. Nombre de souris utilisées : 55 .

-Raffiner : Les animaux seront suivis sur un plan clinique (observation et suivi du poids) et seront euthanasiés dès les premiers signes physiques caractéristiques du mal-être de l'animal. Post-mortem, les études histologiques seront faites sur les différents organes permettant la caractérisation de la réponse immunitaire.

4829. Le projet a pour objectif d'assurer la fourniture des produits biologiques d'origine animale nécessaires à la réalisation des projets de Recherche et Développement (R&D) et/ou de services à façon. Les projets de R&D ou les prestations de services à façon visent au développement de nouveaux vaccins de haute qualité et répondant à des besoins médicaux non satisfaits. Les produits biologiques (Anticorps polyclonaux, sang, sécrétions ou tissus d'animaux) sont nécessaires pour la mise en œuvre de tests in vitro. A ce jour, ils ne peuvent pas toujours être produits sans le recours de l'animal de laboratoire.

Le projet pourra conduire à l'utilisation d'au maximum 3000 souris, 400 rats, 400 hamsters, 400 cobayes, 400 lapins sur une période de 5 ans.

Les procédures qui génèrent la collecte de sang, de sécrétions, d'organes ou l'immunisation d'animaux avec des mélanges d'antigènes et d'adjuvants n'entraînant pas de réactions locales ou générales ne présentent pas de risque pour les animaux. Dans le cas où les animaux présenteraient des lésions cutanées des soins locaux appropriés seront mis en œuvre. Bien qu'en général non attendu, tout animal qui présenterait une dégradation de l'état général ou les signes cliniques d'une maladie sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée. La prise en charge d'un animal ayant des signes de maladie est assurée par un vétérinaire.

Le degré de sévérité est considéré comme léger et pouvant aller jusqu'à modéré pour la production de certains anticorps polyclonaux avec des adjuvants induisant une réaction inflammatoire connue.

L'ensemble des animaux est euthanasié selon des méthodes recommandées par la réglementation et approuvées par le Comité d'éthique et la Structure de Bien-être Animal (SBEA) dont relève l'établissement utilisateur.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Les produits d'origines animales sont utilisés uniquement lorsque les produits fabriqués in vitro (anticorps monoclonaux par exemple) ne sont pas disponibles ou adaptés à l'utilisation visée.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés est calculé au plus juste de façon à répondre aux besoins de tests sur la période (quantité de réactifs). Ce calcul tient compte des durées de péremption des produits mais aussi des évolutions technologiques pour les tests considérés.

Raffinement :

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires. Le recours à l'Adjuvant Complet de Freund (ACF) nécessite d'être préalablement autorisé par le comité d'éthique CEPAL.

4830. Les stéatohépatites ou NAFLDs (non alcoholic fatty liver diseases) sont en constante augmentation et constituent un problème de santé majeur. La stéatose hépatique (>5% de lipides dans le foie) d'origine non alcoolique atteint déjà 20 à 30 % des individus des pays occidentaux. Elle est considérée comme bénigne, car réversible avec un régime alimentaire pauvre en graisses et en sucres, mais elle est la cause la plus commune de maladies chroniques du foie car elle est la première étape vers des complications graves comme la stéato-hépatite qui s'accompagne d'atteintes hépatiques (inflammation, fibrose), puis la cirrhose et enfin le carcinome hépatocellulaire. L'évolution vers la fibrose est grave et irréversible et il n'existe aucun traitement actuellement.

Les protéines KLF10 et KLF11 sont induites par un facteur de croissance impliqué dans les phénomènes de fibrose, et régulent le métabolisme hépatique des lipides. Notre hypothèse est que KLF10 et KLF11 sont impliqués dans la progression des NAFLDs. L'objectif général du projet est donc de mettre en évidence et de comprendre leur rôle dans le développement de la stéatose et de la stéatohépatite. Pour cela, nous comparerons le développement des NAFLD chez des souris nourries avec un régime déficient en méthionine et en choline (régime MCD) et invalidées ou non pour les gènes Klf10 ou Klf11. Le bénéfice attendu de ce projet est une meilleure compréhension de ces pathologies et l'identification de nouvelles pistes thérapeutiques. L'utilisation de la souris est justifiée par le fait que développement des NAFLDs implique des interactions entre plusieurs types cellulaires du foie (hépatocytes, macrophages, cellules stellaires) et plusieurs organes extrahépatiques. Les approches sur cellules isolées ne permettent pas d'avoir les interactions physiopathologie de ces maladies retrouvées chez l'homme. Les souris déficientes en KLF10 et en KLF11 n'ont pas de phénotype dommageable avec un régime standard. Le régime MCD provoque un amaigrissement important et rapide. L'évolution de la pathologie sera donc évaluée par mesure du poids et mesure des transaminases sanguines. Toutes les analyses seront pratiquées après mise à mort dans un délai de 8 semaines maximum. 300 souris seront utilisées dont 150 souris contrôles soumises à un régime standard, donc sans dommages. Le remplacement et réduction seront mis en œuvre par l'utilisation de la culture cellulaire pour les expériences ne nécessitant pas d'interactions entre organes. Les méthodes utilisées permettent d'utiliser différents échantillons à partir des mêmes animaux et sont très sensibles de sorte que le nombre total d'animaux sera réduit au minimum. Le raffinement des expérimentations reposera sur (1) l'utilisation des souris de plus de 30 g pour que l'amaigrissement provoqué par le régime soit le moins dommageable possible et (2) des durées

courtes de régime (2, 4 et 8 semaines). Pour la durée la plus longue (8 semaines) seules 50 souris sur 300 seront soumises au régime MCD.

4831. Le paludisme est la 3ème cause de mortalité par maladie infectieuse après le VIH et la tuberculose. Cette maladie a causé plus de 400.000 décès en 2015 selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Le paludisme est dû à un parasite appelé Plasmodium qui est transmis à l'homme par un moustique infecté. Chez l'homme, le parasite infecte les globules rouges (cellules du sang) et induit des symptômes de type fièvre, sueurs, frissons, anémie qui peuvent mener au décès de l'individu. Cette infection du sang peut être recréée en culture artificielle en boîte de Petri (appelé in vitro) et également chez la souris ou le singe (appelé in vivo). L'émergence de parasites résistants aux traitements actuellement disponibles complique la prise en charge de la maladie, c'est pourquoi il est important de développer de nouveaux médicaments.

Ce projet porte sur l'évaluation de nouveaux médicaments qui tuent le parasite in vitro, et dont l'efficacité doit être évaluée in vivo chez la souris malade atteinte de paludisme. Plusieurs des nouveaux médicaments que nous développons présentent une forte activité sur le parasite sans présenter de toxicité sur des cellules de souris et de rat en culture in vitro. Ces nouveaux médicaments présentent une alternative prometteuse aux médicaments actuels, c'est pourquoi nous souhaiterions évaluer leur activité chez l'animal afin de confirmer leur potentiel thérapeutique. Seuls les composés les plus actifs in vitro sur le parasite et non toxiques sur cellules de mammifères seront évalués in vivo. Au maximum 10 nouveaux médicaments seront sélectionnés pour être évalués chez la souris. Pour cela, nous projetons de suivre un modèle communément utilisé pour évaluer l'activité in vivo de nouveaux antipaludiques (modèle de Peters) qui consiste à contaminer les souris avec le parasite pour induire une crise de paludisme et les traiter le jour même puis les 3 jours suivants à dose fixe par voie intrapéritonéale. Deux groupes contrôles sont traités en parallèle : un groupe non traité et un groupe traité par un médicament de référence (Artémether, 25 mg/kg). Nous évaluerons l'efficacité des traitements en regardant le nombre de parasites présents dans le sang par rapport au groupe contrôle non traité. Pour cela nous aurons besoin de prélever une goutte de sang au niveau de la queue par une légère incision avec une aiguille (point de piqûre). Nous effectuerons ce prélèvement de façon quotidienne entre J4 (1er jour après l'arrêt du traitement) et J10 puis de façon bihebdomadaire entre J11 et J30 ou jusqu'à l'apparition des premiers signes de souffrance. Les animaux seront suivis quotidiennement voire 2 à 3 fois par jour avant la phase aigüe de l'infection (5 à 7 jours après avoir injecté le parasite). Le nombre d'animaux concernés par cette procédure sera de 250 au maximum. Nous souhaiterions également évaluer l'activité du composé le plus prometteur sur un modèle de paludisme non sévère (espèce *Plasmodium chabaudi*), selon le même protocole (30 souris au maximum). Dans l'hypothèse où nous obtenons un composé très actif in vivo, nous souhaiterions déterminer sa "dose efficace 50", paramètre demandé lors d'études précliniques (dose permettant de tuer 50% des parasites). Pour cela, nous administrerons 6 doses différentes, selon le modèle de Peters, afin de déterminer la dose permettant de tuer 50% des parasites. Pour cette procédure, au maximum 315 animaux seront concernés. Au total, au maximum 595 animaux seront concernés par cette étude. Malgré le remplacement des études préliminaires d'activité par des techniques in vitro, qui ont déjà permis de réduire le nombre d'animaux utilisés, les expérimentations animales restent nécessaires pour s'assurer de l'efficacité de nouveaux médicaments. Par l'optimisation des protocoles de ces expériences et le calcul du nombre de souris nécessaires par une méthode statistique pour obtenir un résultat suffisamment prédictif, le nombre de souris utilisées a pu être baissé au strict minimum. De plus nous essayerons de réduire encore ce nombre en regroupant certaines manipulations, dans la mesure du possible, afin de limiter le nombre d'animaux utilisés dans les groupes témoins. La souffrance des animaux a été également prise en compte et sera réduite par l'utilisation d'un anesthésique local lors des prélèvements, l'observation des animaux plusieurs fois par jour et la mise en place de points limites bien définis afin de terminer l'expérience le plus tôt possible.

4832. La toxoplasmose est une maladie largement distribuée à travers le monde, étant une des zoonoses parasitaires les plus fréquentes avec un tiers de la population humaine mondiale virtuellement infecté. Elle est due à un protozoaire, *Toxoplasma gondii*, découvert dans les tissus d'un rongeur (*Ctenodactylus gundi*), en Tunisie, par Nicolle et Manceaux en 1908 et simultanément au Brésil chez un lapin de laboratoire par Splendore. *Toxoplasma gondii* est un protozoaire ayant les félinés comme hôte définitif (le chat) et les vertébrés homéothermes comme hôtes intermédiaires. Chez l'homme, la toxoplasmose acquise est le plus souvent silencieuse et se traduit essentiellement par une sérologie positive et la persistance de parasites enkystés dans le cerveau et les muscles. La toxoplasmose est grave chez les personnes dont le système immunitaire est immature ou déficient, en particulier chez les fœtus (toxoplasmose congénitale) et les patients immunodéprimés (SIDA, greffes d'organes, thérapie anticancéreuse). *Toxoplasma* a été découvert il y a maintenant plus de 100 ans et depuis les mécanismes qui lui permettent de s'établir et de persister dans l'organisme qui l'héberge sont activement étudiés.

L'objectif de ce projet est de comprendre les mécanismes d'interférence du parasite *Toxoplasma gondii* avec son hôte. Afin de réduire et de remplacer l'expérimentation animale, des études préliminaires réalisées in silico et in vitro en culture cellulaire nous ont permis d'identifier spécifiquement des gènes du parasite codant pour des protéines effectrices directement sécrétées dans la cellule infectée et ayant donc un rôle potentiel dans le contrôle de la virulence chez l'animal. De même, que des études de biochimie ont permis de montrer que ces protéines s'associent et forment des complexes de haut poids moléculaire avec des protéines de la cellule hôte confirmant leur rôle potentiel dans la régulation des interactions hôte-parasite. Le but des expériences chez la souris est donc de déterminer l'importance de ces gènes dans le contrôle de la virulence (toxoplasmose aiguë), ainsi que dans la capacité des parasites à persister chez l'animal sous forme de kystes (toxoplasmose chronique). Aucune autre approche alternative in vitro ou de culture cellulaire ne permet de répondre à ces questions. Le modèle murin d'étude de la toxoplasmose est communément utilisé par la communauté scientifique travaillant sur *Toxoplasma gondii*. En effet, la souris constitue un hôte intermédiaire naturel et privilégié du toxoplasme étant donné que le cycle sexué du parasite s'effectue exclusivement chez les

félidés en tant qu'hôte définitif, après ingestion de proies infectées. Contrairement aux études in vitro de culture cellulaire, la souris permet l'étude de la toxoplasmose aiguë et chronique avec la formation de kystes dans les tissus. Les souris NMRI, BALB/c et C57BL/6 présentent différents niveaux de sensibilités vis-à-vis du toxoplasme. Par conséquent, il est pertinent de pouvoir rechercher un rôle potentiel des effecteurs parasitaires dans la virulence des différents types de parasites (Type I virulent et type II avirulent), mais également chez des souris présentant différents niveaux de sensibilité à cette infection (les souris C57BL/6 sont significativement plus sensibles aux toxoplasmes que les souris BALB/c ou NMRI). Raffinement : Les souris seront hébergées dans un environnement contrôlé dépourvu de germes pathogènes évitant ainsi toute surinfection qui pourrait venir biaiser l'interprétation des résultats obtenus. L'injection des toxoplasmes par voie intrapéritonéale permet un contrôle précis de l'inoculum et présente l'avantage d'être bien supportée par l'animal. Quelques jours après l'injection, les souris développent une infection aiguë légère à modérée en fonction du type de parasites qui se manifeste par un poil légèrement hérissé, le dos voussé ainsi qu'une diminution de la mobilité ; ces critères permettent de définir un point limite de l'expérience de manière à ne pas dépasser des niveaux modérés de souffrance endurés par les animaux. Les parasites de type II avirulents provoquent chez l'animal une infection aiguë transitoire et après 2 à 3 jours les souris récupèrent un état normal asymptomatique n'entraînant aucun inconfort, c'est la toxoplasmose chronique. Seul un examen sur animaux euthanasié permet de détecter la présence de kystes attestant de la présence de parasites.

Dans ce projet nous utiliserons un maximum de 1800 souris:

Partie 1 : étude des effecteurs candidats dans l'établissement de la toxoplasmose aiguë (un score d'infection aiguë est déterminé en fonction des manifestations cliniques de l'animal),

Partie 2 : étude des effecteurs candidats dans l'établissement de la toxoplasmose chronique (le nombre de kystes chez la souris est déterminé).

(3 groupes de 4 souris, nombre nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables).

4833. L'ostéoporose est une maladie généralisée du squelette pouvant survenir après la ménopause chez la femme. Elle se caractérise par une perte de la masse osseuse et des altérations de la structure des os pouvant entraîner des fractures par fragilité. Des modifications de la qualité osseuse de l'échelle macroscopique à l'échelle de la molécule ont été décrites au cours de l'ostéoporose. D'autre part, une accumulation de la graisse intra-osseuse accompagnant la perte osseuse a également été constatée au sein des vertèbres et des os du bassin. De nombreux arguments conduisent à penser que cette augmentation du contenu graisseux est impliquée dans la perte osseuse observée au cours de l'ostéoporose. Ces altérations squelettiques, aussi bien quantitatives que qualitatives, sont peu documentées et controversées au niveau des os des mâchoires. Le but de notre étude est d'évaluer, dans un modèle d'ostéoporose chez le rat, les relations entre les variations du contenu graisseux et de la structure osseuse en site mandibulaire. Les modèles animaux sont largement utilisés pour étudier les effets de la perte osseuse survenant au cours de la carence hormonale en œstrogène, en particulier la ratte ovariectomisée. Ainsi, 69 rattes âgées de 6 mois au début du protocole seront divisées aléatoirement en 3 groupes distincts (groupe ovariectomisé nourri ad libitum, groupe ovariectomisé avec accès contrôlé à l'alimentation, groupe contrôle) soit 69 animaux. La chirurgie d'ovariectomie et le premier suivi post-opératoire seront réalisés par le fournisseur des animaux. Dans un souci de réduire le stress des animaux (en hébergement conventionnel) nous serons particulièrement attentif au nombre d'animaux par cage, à la survenue de signes de stress ou de mauvaise intégration (perte de pelage, prostration, automutilation...). Nous utiliserons également des éléments afin d'enrichir le milieu des animaux. Pour éviter les potentiels points limites (perte de poids > 20%), les rattes seront suivies quotidiennement par la mesure de la prise alimentaire et de manière hebdomadaire par la mesure du poids corporel. 2 périodes après l'ovariectomie ont été choisies (4 mois et 9 mois) pour étudier les modifications ostéo-médullaires à court et long terme. Nous pourrions ainsi déterminer les modifications de la microarchitecture osseuse et des éléments constitutifs minéraux, organiques et adipeux par des approches expérimentales complémentaires et originales au cours de l'ostéoporose. Notamment, la microstructure osseuse et la répartition du contenu graisseux intra-osseux seront analysées par microtomographie à rayons X après marquage de la graisse médullaire à l'osmium. L'analyse de la composition à l'échelle de la molécule du tissu osseux sera effectuée par spectroscopie Raman. Ainsi, notre étude permettra d'apporter des informations nouvelles sur la spécificité des os des mâchoires et de leurs atteintes au cours de l'ostéoporose.

4834. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'accumulation à long terme de gadolinium dans l'organisme suite à des administrations répétées de produits de contraste (chélates de gadolinium), lors d'examen par imagerie par résonance magnétique (IRM), et l'éventuelle neurotoxicité associée.

Plusieurs publications mettent en évidence chez l'Homme des zones d'hypersignal T1 lors d'IRM non-injectées, dans certaines régions du cerveau, suite à des injections multiples de produits de contraste gadolinés. En effet, chez des patients régulièrement suivis pour une pathologie par IRM injectées, le métal gadolinium contenu dans les produits de contraste s'accumule progressivement dans des structures cérébrales. Les conséquences cliniques de l'accumulation cérébrale de gadolinium chez l'Homme sont inconnues à ce jour.

Afin de répondre aux interrogations que soulèvent ces publications et aux questions posées par les autorités de santé, nous proposons un projet préclinique pour :

-Démontrer le lien entre les zones d'hypersignal observées en IRM et l'accumulation de gadolinium, issu d'un chélate linéaire, dans ces mêmes structures.

-Etudier le mécanisme impliqué.

-Rechercher une éventuelle toxicité.

Cette étude, financée par un laboratoire privé, implique un nombre maximal de 20 rongeurs, espèce de référence pour toutes les études de toxicologie exploratoire. Aucun milieu de culture ou système synthétique ne peut reproduire la complexité des interactions structurelles et fonctionnelles au sein d'un organisme entier. Les procédures expérimentales mises en œuvre au cours de ce projet seront d'une part des procédures non invasives pour l'animal (spectroscopie par résonance magnétique, tests comportementaux) et d'autre part des interventions réalisées sous analgésie et anesthésie pour limiter la douleur (injection intraveineuse, chirurgie). Elles seront menées dans le strict respect des textes de références sur les volumes et les conditions d'injection et sont validées par un vétérinaire. Les mêmes animaux serviront pour répondre à plusieurs questions scientifiques (imagerie, comportement, dosages) afin de limiter leur nombre au total.

Les animaux sont hébergés selon les règles en vigueur dans l'animalerie et les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors de leur mise en œuvre.

L'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance en application des points limite préalablement définis.

4835. La toxoplasmose est une zoonose cosmopolite, pouvant évoluer sous une forme latente (infection chronique, présence de kystes tissulaires) ou sous une forme aiguë (toxoplasmose disséminée). Chez l'homme, l'infection est généralement bénigne, les formes sévères sont rencontrées lors des infections congénitales et lors de réactivation d'infections latentes chez les patients immunodéprimés. De plus, une augmentation de la séroprévalence est observée chez les patients atteints de troubles psychiatriques tels que la schizophrénie suggérant que la toxoplasmose et plus particulièrement la formation des kystes intracérébraux puisse être un facteur favorisant la survenue de ces pathologies. Le projet consiste à étudier le rôle de différentes protéines GRA dans la formation des kystes intracérébraux chez la souris. Des parasites déficients (KO) pour ces protéines GRA (en particulier GRA5) seront injectés dans 2 souches de souris, CBA (résistantes) et C57BL/6 (sensibles). La dissémination parasitaire et le développement de kystes intracérébraux seront analysés. Les protocoles d'enkystement in vitro qui ont été précédemment décrits sont très peu reproductibles et les kystes formés sont très différents de ceux retrouvés in vivo. De plus, dans ces expériences in vitro, nous ne pouvons pas aborder le rôle des protéines GRA dans la dissémination parasitaire, l'activation et l'acquisition de capacité migratoire par les cellules telles que les monocytes, macrophages et cellules dendritiques. Pour l'ensemble de ces raisons, nous souhaitons analyser le rôle de ces protéines GRA dans l'enkystement in vivo, puisqu'il n'existe pas de méthodes alternatives satisfaisantes à l'heure actuelle. Les souris seront hébergées dans un environnement dépourvu de pathogènes, l'eau et la nourriture continuellement présents. Les protocoles d'infection n'induisent normalement aucune douleur significative mais en cas de souffrance anormale l'animal sera euthanasié après avoir été anesthésié.

Dans un premier temps, différentes doses d'infection parasitaires seront testées pour conserver uniquement la dose optimale pour les expériences suivantes.

Par la suite, notre étude vise à comparer 2 souches de souris, la souche CBA dite et la souche C57BL/6 dite sensible. Si aucune différence observée entre ces 2 souches, nous choisirons une seule des 2 souches afin de réduire le nombre d'animaux.

Ce projet permettra de mieux comprendre le rôle des protéines GRA dans la formation des kystes parasitaires et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Dans ce projet nous utiliserons deux types de souris : C57BL/6 (sensibles) et CBA (résistantes).

Procédure 1 préliminaire : Evaluer la dose de parasites à utiliser chez les souris C57BL/6 (3 doses de parasites avec 6 souris par groupe, 18 souris C57/BL6).

Procédure 2 : Comparer, chez les souris C57BL/6 et CBA, le nombre de kystes à 3 semaines et 5 semaines après infection, formés par 3 différentes souches parasitaires (3 souches parasitaires et 6 souris par groupe, 36 souris CBA et 36 souris C57/BL6).

Procédure 3 : Etudier la cinétique de propagation parasitaire chez les 2 types de souris en fonction des différentes souches parasitaires (5 temps, 2 à 3 souches parasitaires et 6 souris par groupe, donc au maximum 90 souris CBA et 90 C57/BL6).

4836. La grippe est une maladie aiguë des voies respiratoires, due à une infection par le virus influenza. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les virus influenza sont responsables, chaque année, de 3 à 5 millions de cas graves d'infections dans le monde, entraînant 200 000 à 500 000 décès. La grippe constitue donc un problème majeur de santé publique.

Outre la vaccination (préventive), il est possible de traiter les patients infectés par des molécules antivirales spécifiques (curatives). Ces dernières, dirigées contre des protéines virales, visent à diminuer le pouvoir répliatif du virus. Malheureusement, de nombreux virus sont devenus résistants aux antiviraux actuels. Il est donc urgent de trouver de nouvelles stratégies contre la grippe, n'entraînant pas de résistance virale. Pour cela, une stratégie prometteuse est de cibler la réponse de l'hôte plutôt que le virus.

C'est dans cet objectif que notre étude s'est portée sur le rôle du formyl peptide receptor like 1 (FPRL1) dans la pathogénicité des virus de la grippe. Nos premiers résultats semblent indiquer que le FPRL1 est nécessaire à la répliation du virus influenza. Ainsi, dans l'objectif d'inhiber le FPRL1, le présent projet s'insère dans un programme de recherche soutenu par l'ANR dont le but est entre autre de développer une nouvelle stratégie de lutte contre les infections grippales.

Dans le but de développer une nouvelle cible thérapeutique contre la grippe, aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation des animaux. La souris est le modèle animal qui sera utilisé dans cette étude, en tenant compte de l'expérience des membres du projet utilisant cette espèce pour les infections virales ainsi que les données de la littérature scientifique. Les manipulations se font dans une animalerie A2 et dans un laboratoire P2.

Pour chaque expérience, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en ayant le maximum de chance d'obtenir des résultats satisfaisants, statistiquement significatifs.

Afin de limiter la douleur, les souris seront surveillées et pesées chaque jour, y compris les weekends et les jours fériés, et au premier signe de douleur les souris seront mises à mort immédiatement. Par ailleurs, afin de limiter et de prévenir toute souffrance et angoisse des animaux, nous mettrons en œuvre des mesures d'acclimatation des souris en zone d'hébergement pendant 7 jours après leur arrivée. Les cages seront également enrichies, notamment avec du coton.

Nombre total d'animaux inclus dans ce projet : 312

4837. La douleur est un enjeu majeur de santé publique, mais de nombreuses lacunes restent encore à combler pour sa prise en charge. De plus, les analgésiques utilisés pour la traiter sont à l'origine de nombreuses intoxications souvent mortelles, qu'ils soient pris seuls ou en association. C'est pourquoi ce projet s'attache à étudier les trois principaux analgésiques opioïdes actuellement prescrits en clinique (tramadol, codéine et opium), afin de permettre une meilleure prescription et une meilleure prise en charge en cas d'intoxication.

Pour cela, nous envisageons de mener à bien les objectifs suivants :

1-Etudier de façon comparative la toxicité neuro-respiratoire des trois analgésiques opioïdes les plus utilisés et leur variabilité de réponse lorsqu'ils sont utilisés seuls ou en association ;

2-Préciser les mécanismes exacts de cette toxicité ;

3-Mettre au point un traitement antidotique optimal en cas d'intoxication par surdosage ;

4-Analyser les avantages présentés par un nouvel hybride opioïde en cours de développement.

Ce projet a été élaboré afin de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés et de limiter au mieux le mal-être possible des animaux pendant l'expérimentation. En effet, l'ensemble des procédures décrites ci-après ne sont pas remplaçables par des expériences *in silico* ou *in vitro*, en raison d'une approche intégrée sur animal entier (non-reproductible *in vitro*, intégrant de nombreux compartiments biologiques interagissant entre eux). De plus, à la suite d'une veille bibliographique, les études envisagées ne reproduisent pas des études déjà publiées (afin d'éviter tout doublon et une utilisation excessive d'animaux) et le nombre d'animaux utilisés par groupe sera réduit au minimum grâce à des tests statistiques (afin d'avoir des résultats interprétables avec un nombre minimum d'animaux utilisés). Par ailleurs, le bien-être des animaux sera vérifié quotidiennement par un personnel qualifié et une prise en charge optimale sera effectuée en cas de mal-être. Enfin, ce projet sera mené chez le rat afin d'être cohérent avec la bibliographie déjà présente sur le sujet et dont les expériences sont effectuées principalement sur cette espèce.

Ce projet nécessitera 990 rats mâles Sprague- Dawley. Différentes procédures seront réalisées chez le rat après administration des opioïdes :

Procédure 1: Etude de la pharmacocinétique des différentes molécules étudiées et étude des effets respiratoires périphériques (prélèvements sanguins et gaz du sang) et métaboliques,

Procédure 2: Etude télémétrique des effets respiratoires centraux par pléthysmographie corps-entier,

Procédure 3: Etude télémétrique des effets cardiaques par électrocardiographie (ECG),

Procédure 4: Etude télémétrique des effets neurologiques par électroencéphalographie (EEG),

Procédures 5 et 6: Etude des effets analgésiques dans un modèle de douleur aiguë (plaque chaude) et neuropathique (plaque froide après constriction chronique du nerf sciatique),

Procédure 7: Etude des effets sur le système nerveux central avec mesure des concentrations en monoamines cérébrales.

Cette étude nous permettra ainsi chez l'Homme une meilleure prescription des analgésiques opioïdes de classe 2 afin que le traitement soit mieux toléré, ainsi qu'une meilleure prise en charge en cas d'intoxication.

4838. Les exigences du sport de haut niveau peuvent engendrer de nombreux troubles psychologiques, souvent dissimulés car tabou dans le monde du sport. Ces troubles psychologiques peuvent déclencher une conduite dopante. Une conduite dopante est une consommation de substances pour affronter un obstacle réel ou ressenti par l'utilisateur ou par son entourage, aux fins de performances. Le dopage représente une forme particulière de conduite dopante. C'est une pratique interdite, définie par la réglementation, qui consiste en l'utilisation par des sportifs compétiteurs, de substances ou de méthodes interdites, figurant sur une liste établie chaque année par l'Agence Mondiale Antidopage (AMA). Pour être incluse dans la liste des interdictions, une substance ou une méthode interdite doit remplir au moins deux des trois critères suivants: avoir le potentiel d'améliorer la performance sportive, présenter un risque réel ou potentiel pour la santé de l'athlète, être contraire à l'esprit sportif. Cependant, la santé est compromise par le dopage. Lorsque des sportifs en bonne santé se mettent à prendre des doses substantielles de produits dopants puissants, cela se traduit par une mise en danger de leur santé.

Dans ce cadre, l'utilisation de psychotropes, notamment d'antidépresseurs, phénomène courant mais souvent caché par l'athlète, pourrait alors l'aider à maîtriser ces situations difficiles par le contrôle des dimensions affectives et émotionnelles, corrigeant ainsi les conséquences du stress et renforçant la confiance en soi. Ces molécules antidépresseurs ne sont pas interdites par l'AMA. Autant l'effet psychotrope des antidépresseurs semble bien connu, autant d'autres effets pharmacologiques, périphériques et musculaires en particulier, restent à approfondir. Ainsi les antidépresseurs de type inhibiteurs spécifiques de la recapture de sérotonine (ISRS) pourraient jouer un effet bénéfique sur la performance physique en participant à une réparation musculaire plus rapide. En effet il a été récemment montré que la sérotonine intervient dans la récupération de la force musculaire dans un modèle murin de la myopathie de Duchenne.

Ce projet doit permettre de montrer les conséquences éventuelles d'un traitement chronique par certains psychotropes sur la performance physique chez la souris. Il doit mettre en évidence le ou les mécanismes impliqués ainsi que les modifications de biomarqueurs sanguins, potentiellement utilisables chez l'homme dans le cadre de la lutte contre le dopage. Les retombées de ce projet fondamental permettront d'apporter aux laboratoires anti-dopage de nouvelles cibles biologiques permettant la détection du dopage et des conduites dopantes.

Ce projet entre parfaitement dans des objectifs de santé publique, d'amélioration de la santé au sport et doit améliorer les outils et le cadre juridique de la lutte contre le dopage. En accord avec la règle des 3R, nous réduirons le nombre de souris au maximum. Les modèles basés sur l'analyse du comportement de souris demeurent à l'heure actuelle les plus pertinents et les seuls validés par la communauté scientifique. L'emploi de l'animal est justifié par la nécessité d'avoir des mesures notamment de performance, qui ne peuvent s'obtenir sur cultures cellulaires. Chaque étude est effectuée sur animal vigile. Une surveillance quotidienne sera entreprise pour veiller au bien-être des animaux (quantités de boisson et de nourriture adéquates). Une attention particulière est portée aux modifications du métabolisme énergétique, aux fonctions mitochondriales et aux voies de signalisation énergétiques. Un nombre prévisionnel de 950 souris sera utilisé. Ce nombre d'animaux est nécessaire car nous allons étudier plusieurs voies de métabolisme et de nombreux biomarqueurs sur un grand nombre de mesures pas toutes réalisées sur le même animal. Une étude préliminaire (de faisabilité) est réalisée afin d'optimiser le nombre d'animaux avec un traitement statistique adéquat et d'obtenir les conditions optimales pour les études ultérieures (Réduction et Raffinement des procédures). L'objectif de Raffinement est aussi pris en compte en choisissant des tests comportementaux complémentaires mesurant les performances physiques ainsi que des prélèvements post-mortem. Aucune méthode alternative ne permet de satisfaire l'objectif de Remplacement à notre connaissance.

4839. L'apéline et la vasopressine sont régulées de façon opposée pour le maintien de l'équilibre hydrique de l'organisme. L'hyperactivation du récepteur V2 de la vasopressine joue un rôle dans deux pathologies, l'hyponatrémie et la polykystose rénale. Ainsi, un antagoniste spécifique du récepteur V2 (le Tolvaptan) est utilisé en clinique, chez l'homme, dans ces deux pathologies. Toutefois, l'utilisation de ce produit est limitée par ses effets secondaires, en particulier une correction trop rapide de l'hyponatrémie et une toxicité hépatique. De plus, l'efficacité du Tolvaptan dans la polykystose rénale est démontrée mais faible. Ces deux pathologies sont des problèmes de santé publique ; en effet, l'hyponatrémie est fréquente en particulier en hospitalisation, et la polykystose rénale est la 4^{ème} cause d'insuffisance rénale terminale, nécessitant la mise en dialyse et/ou la transplantation rénale, en France. Il paraît donc nécessaire de rechercher de nouvelles options thérapeutiques pour ces pathologies. Des expérimentations *in vitro* ont permis de mettre en évidence que les agonistes du récepteur de l'apéline activaient le récepteur de l'apéline dans des conditions similaires à l'apéline endogène, mais présentent une demi-vie plasmatique plus importante.

Nécessité du recours à l'animal : ce projet vise à évaluer l'effet de ces agonistes de l'apéline chez l'animal dans deux modèles expérimentaux validés pour l'hyponatrémie et la polykystose, le rat hyponatrémique et le rat PCK (pour la polykystose), avant d'envisager l'utilisation de ces produits chez l'homme.

Pertinence des espèces choisies : La première partie consistera à tester l'efficacité de ces produits sur la ratte adulte. La seconde partie du projet consistera à créer un modèle d'hyponatrémie au sein du laboratoire, à partir de protocoles validés à cet effet. Nous utiliserons donc les espèces utilisées dans la littérature avec un poids similaire, à savoir le rat Sprague-Dawley mâle de 250g. La troisième partie visera à étudier l'efficacité de ces produits dans la polykystose. Le rat PCK a été utilisé auparavant pour les études pré-cliniques de traitements pour la polykystose. Ce rat développe les kystes rénaux et hépatiques à partir de la 4^{ème} semaine et jusqu'à la 11^{ème} semaine, ce qui nécessite la mise en place d'un traitement précoce.

Moyens mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux et pour raffiner les protocoles afin de réduire souffrance et stress : afin de limiter le nombre d'animaux, nous avons calculé le nombre d'animaux nécessaire par l'utilisation d'un test statistique. Les résultats des expériences seront analysés au fur et à mesure afin de modifier si besoin les doses de produit utilisées et ne pas utiliser inutilement des animaux avec des doses inadaptées. La souffrance des animaux sera diminuée en procédant à une anesthésie générale et une analgésie adaptée pour les procédures douloureuses, en limitant au maximum la durée passée en cage métabolique et en vérifiant quotidiennement le bien-être animal. Au total, 150 animaux seront utilisés pour ce projet.

4840. Le projet de recherche proposé ici se situe dans le domaine de la recherche expérimentale sur la maladie d'Alzheimer, la démence la plus fréquente pour laquelle n'existent à ce jour que des traitements symptomatiques d'une efficacité plus que modérée. Les dernières stratégies thérapeutiques développées ont par ailleurs été fortement décevantes. Proposé pour expliquer l'écart entre degré d'altération cérébrale et sévérité des symptômes cliniques observés, le concept de « réserve cognitive » pourrait expliquer la variabilité interindividuelle contribuant, en partie, à l'échec des essais cliniques. Nous envisageons de développer et caractériser au cours de ce projet un modèle animal de maladie d'Alzheimer innovant tenant compte du niveau de réserve cognitive. Les effets d'un challenge amyloïdogénique potentiellement délétère seront évalués chez des rats de souches Wistar et LOU/c/Jall, mimant ainsi une situation représentant respectivement des patients avec une réserve cognitive de niveau moyen et haut. Au cours de ce projet, 180 rats adultes mâles seront utilisés sur 3 ans (105 rats de souche Wistar et 75 rats de souche LOU/c/jall). Les études seront réalisées sur des groupes de n=10 rats, nombre suffisant pour assurer une puissance statistique adaptée aux analyses comportementales et d'imagerie. La mise au point et la caractérisation du nouveau modèle de maladie d'Alzheimer réalisé chez le rat LOU/c/jall, ainsi que sa comparaison par rapport à un autre modèle à réserve cognitive plus faible chez le rat Wistar, seront réalisées au travers de 5 tâches de travail, faisant appel à 7 procédures spécifiques. D'un point de vue éthique et dans le but de satisfaire à la règle des 3R, nous avons choisi de réutiliser les animaux soumis aux procédures comportementales (tests de mémoire de reconnaissance d'objet et d'alternance spontanée) pour les procédures d'analyses d'imagerie réalisées *in vivo* (IRMA, IRMf et microTEP) et les analyses cérébrales réalisées *ex vivo*. L'implication de la voie de

signalisation de mTOR sera également étudiée. Ce modèle, imitant l'hétérogénéité de la situation clinique, pourrait ainsi contribuer à mieux mettre en évidence de nouveaux mécanismes qui sous-tendent la réserve cognitive et potentiellement servir de modèle pertinent pour la recherche de nouveaux traitements. L'objectif final est de pouvoir tester de nouveaux candidat-médicaments ou des interventions comportementales (musicothérapie) dans ce nouveau modèle animal développé. Ainsi, aucun remplacement par des modèles *in vitro* ou "*in silico*" (modèles mathématiques, bio-informatique) ne peut être réalisé.

4841. L'apparition d'une infection bactérienne généralisée ou sepsis est l'une des principales causes de décès chez les patients de moins de 40 ans notamment par l'apparition d'infections secondaires nosocomiales. Cette infection généralisée s'accompagne d'une extinction des capacités de réaction du système immunitaire aussi appelé immunosuppression (IS). Cette IS prépare le terrain à l'apparition d'infections bactériennes secondaires ou nosocomiales. La gestion de ces infections nosocomiales à l'hôpital conduit à une utilisation massive d'antibiotiques générant un surcoût pour la collectivité et favorisant l'émergence préoccupante de souches multi-résistantes.

L'infection stimule un système complexe de défense de l'organisme, stimulation devant être adéquate, spécifique et transitoire de façon à éviter une activation aberrante du système immunitaire. Les lymphocytes T régulateur (Treg) remplissent cette fonction de contrôle du système immunitaire. Au cours de l'IS post-septique, il est observé une extinction du système immunitaire associée à une activation excessive des Treg.

Le but de notre étude est de mieux comprendre le rôle des lymphocytes Treg dans ce phénomène d'immunosuppression induit par le sepsis.

Le TNF alpha est connu comme étant une cytokine produite par l'organisme au cours du sepsis et activant les systèmes de défense de l'organisme. Dernièrement, il a été montré que cette molécule pouvait moduler l'activité des lymphocytes Treg et ainsi jouer un rôle clé au cours de l'apparition tardive du phénomène d'IS. Le TNF joue un rôle central dans l'activation du système immunitaire inné et adaptatif via son récepteur ubiquitaire TNFR1. Il semble aussi responsable lors des phases plus tardives de l'activation et de l'expansion des lymphocytes Treg via son récepteur à leur surface le TNFR2.

L'étude de ces mécanismes a comme objectif la découverte de thérapeutiques innovantes (anticorps anti TNFR2) dans la problématique de la maîtrise du risque infectieux nosocomial, en complément des thérapeutiques anti-infectieuses.

Pour cela, 1185 souris C57BL/6jRj femelles vont être utilisées. Ce protocole se divise en 3 parties :

- 1) Partie 1 : Caractérisation de l'immunosuppression lors d'une infection généralisée.
- 2) Partie 2 : Etude du rôle du récepteur de type 2 TNFR2 exprimé par les lymphocytes T régulateur.
- 3) Partie 3 : Développement d'une stratégie thérapeutique d'inhibition du récepteur TNFR2 par l'utilisation d'anticorps neutralisants.

1- Enfin,

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'évaluation et la comparaison de l'effet immunosuppresseur du sepsis et le rôle correctif d'une biothérapie ciblée contre le TNFR2 ne peuvent pas être simplement réalisées de façon *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*). Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. Enfin le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude.

4842. *S. aureus* est la bactérie la plus fréquemment en cause dans les endocardites infectieuses, et est associé avec les pires pronostics. Les *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) dominant aux USA, mais pas en France, comme dans la plupart des pays européens, où les staphylocoques dorés sensibles à la méticilline (SASM) sont très largement majoritaires. Récemment, il a été rapporté un pronostic aggravé en cas de concentrations minimales inhibitrices de la vancomycine > 1,5 µg/ml y compris sous traitement par β-lactamines chez des souches sensibles à la méticilline. La question de savoir si ce mauvais pronostic est lié à une diminution de l'activité des antibiotiques ou à des modifications de la virulence chez des clones particuliers est encore débattue. La meilleure thérapeutique à mettre en œuvre devant une bactériémie ou une endocardite liée à ce type de souche reste également débattue. Le ceftobiprole, une nouvelle céphalosporine à large spectre qui se lie avec une affinité de haut niveau à la protéine de liaison aux pénicillines de type PLP2a, est extrêmement puissante sur les staphylocoques dorés, qu'ils soient sensibles ou résistants à la méticilline. Dans un précédent travail, le ceftobiprole a montré sa supériorité par rapport à la vancomycine, la daptomycine, et le linézolide, pour le traitement des endocardites expérimentales à *S. aureus* résistant à la méticilline.

Le but de notre étude sera d'évaluer l'efficacité du ceftobiprole dans un modèle expérimental d'endocardite à SASM chez le lapin, selon que la CMI de la vancomycine soit basse ou élevée, en comparaison avec la daptomycine et la céfazoline.

Pour cela, 112 lapins femelles néo-zélandais seront utilisés. Une endocardite bactérienne à SASM avec CMI basse ou CMI élevée à la vancomycine sera induite. Les animaux seront répartis dans 8 groupes : animaux contrôles (sans traitement), 3 groupes d'animaux infectés par SASM avec CMI basse à la vancomycine traités soit par ceftobiprole, soit par daptomycine, soit par céfazoline, et 3 groupes d'animaux infectés par SASM avec CMI élevée à la vancomycine traités soit par ceftobiprole, soit par daptomycine, soit par céfazoline.

Cinq jours après infection, les animaux seront euthanasiés et les végétations et la rate seront prélevées afin de déterminer les charges bactériennes.

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

4843. L'ostéomyélite est une infection bactérienne de l'os et du tissu osseux caractérisé par une réponse inflammatoire aigue ou chronique menant à une perte osseuse. La bactérie responsable isolée en culture est dans 60% des cas un staphylocoque doré avec un taux de résistance à la méticilline en constante augmentation. Ces infections nécessitent des traitements longs et des actes chirurgicaux afin de retirer les tissus nécrosés. Les options pour le traitement de ces infections sont limitées par des facteurs pharmacocinétiques (comme la pénétration des antibiotiques dans les tissus osseux) et la sensibilité de la bactérie en cause au traitement. Il apparaît également illusoire de penser qu'un antibiotique utilisé par voie générale ne pénètre que la zone tissulaire infectée. Le microbiote subit alors une pression de sélection pouvant permettre, à distance du site, l'émergence de mutants résistants.

Parmi les antibiotiques les plus utilisés, la vancomycine et le linézolide sont les plus prescrits en cas d'infection à *Staphylococcus aureus*. Ces molécules induisent des effets secondaires ou indésirables allant de légers (nausées, vomissements...) à graves (réactions anaphylactoïdes, ototoxicité, néphrotoxicité, neutropénie...).

Il apparaît donc nécessaire de trouver de nouvelles alternatives permettant de traiter localement l'infection pour faire face à l'augmentation de la résistance des souches de *Staphylococcus aureus* et ainsi d'améliorer la prise en charge des infections ostéo-articulaires.

Le but de notre étude sera d'évaluer l'efficacité d'un nouveau système de délivrance de daptomycine dans un modèle expérimental d'ostéomyélite à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) chez le lapin et de comparer cette efficacité avec celle de la daptomycine et de la vancomycine administrées par voie systémique.

Pour cela, 108 lapins femelles néo-zélandais seront utilisés. Une infection bactérienne à SARM sera induite par voie intra-articulaire reproduisant ainsi la pathologie. Les animaux seront répartis dans 7 groupes : animaux contrôles (sans traitement), animaux traités avec la forme galénique n°1 (2 concentrations différentes de daptomycine), animaux traités avec la forme galénique n°2 (2 concentrations différentes de daptomycine), animaux traités avec de la daptomycine (voie systémique), et animaux traités avec de la vancomycine (voie systémique). Sept jours après infection, les animaux seront euthanasiés et la moelle osseuse et l'os seront prélevés afin de déterminer les charges bactériennes.

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

4844. Quinze à vingt-cinq pour cent des patients diabétiques développent une ulcération du pied. Cette plaie peut être le lit d'une infection bactérienne, le plus souvent plurimicrobienne, pouvant entraîner jusqu'à l'amputation du membre infecté. *Staphylococcus aureus* est une des bactéries majoritairement impliquées dans les infections de ces plaies de patients atteints de diabète. Ce pathogène se caractérise par des capacités d'adaptation à l'environnement et d'acquisition de résistances aux antibiotiques qui font que les cliniciens se retrouvent régulièrement confrontés à des bactéries multirésistantes vis à vis de l'arsenal antibiotique disponible. Cet arsenal n'est d'ailleurs quasiment plus alimenté depuis plusieurs décennies par l'apport de nouveaux antibiotiques, ce qui peut conduire à des situations d'impasse thérapeutique. Face à cette situation, l'exploration de nouvelles stratégies thérapeutiques est cruciale : optimisations des régimes thérapeutiques avec les antibiotiques disponibles, autres thérapeutiques qui pourraient agir en complément ou en remplacement des antibiotiques, et qui permettraient de limiter la pression de sélection exercée par ceux-ci sur les flores microbiennes des patients, et par conséquent l'apparition de souches résistantes. Dans la perspective d'étudier différentes stratégies thérapeutiques, il est tout d'abord nécessaire de mettre au point un modèle stable et reproductible de plaie diabétique infectée à *S. aureus*.

Nous allons procéder en plusieurs étapes :

1- Déterminer un mode opératoire d'induction de diabète artificiel sur modèle murin. Nous avons choisi de travailler avec la streptozotocine (STZ), molécule pancréatotoxique diabétogène. L'objectif sera de déterminer quelle est la dose de STZ permettant d'induire ce diabète, tout en conservant une espérance de vie compatible avec la suite de l'étude.

2- Mettre au point un modèle de plaie proche des plaies du pied diabétique chez l'Homme, à l'aide de différentes techniques. Déterminer différentes tailles de plaies, ainsi que différentes méthodes permettant de maîtriser les temps de cicatrisation.

3- Infecter les plaies par des souches de *S.aureus* d'origines et de virulences différentes. Nous utiliserons des souches isolées de différents stades d'infection de pied diabétique chez l'Homme, ainsi que des souches de référence.

Le nombre de souris nécessaires à la réalisation de cette étude est de 256 souris Swiss.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Le nombre de souris par groupe a été réduit au minimum (n=8 par groupe) afin de garder une analyse statistique fiable et reproductible. Afin

de limiter les sources d'anxiété ou de souffrance, la réalisation du modèle infectieux ainsi que l'euthanasie sont faites sous anesthésie générale. Les souris sont conservées dans des cages de taille suffisante dont la litière est changée une à deux fois par semaine et avec accès libre à l'eau et à la nourriture. Enfin le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude en évaluant l'état général des souris deux fois par jour avec analyse des signes généraux (poils hérissés, dos bossu, perte de poids, isolement) et des points limites seront mis en place. En cas d'éventuels signes de souffrance avec symptômes non réversibles, l'animal sera euthanasié après pré - anesthésie.

4845. La résistance aux bêta-lactamines parmi les entérobactéries et les *Pseudomonas* spp a considérablement augmenté et pose aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Cette résistance est due à l'émergence d'enzymes capables de les hydrolyser,

les bêta-lactamases et principalement à des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Parmi les bêta-lactamases, les carbapénèmases sont les plus puissants mécanismes de résistance aux carbapénèmes. Ces carbapénèmases conduisent ainsi à une inefficacité partielle ou totale des antibiotiques de la classe des carbapénèmes considérés comme des traitements de dernier recours.

La stratégie la plus efficace pour restaurer l'activité des bêta-lactamines est de les associer à un inhibiteur de bêta-lactamases (IBL).

Le céfépime est une céphalosporine de quatrième génération à large spectre, qui montre une activité bactéricide sur les bactéries à la fois à Gram positif et Gram négatif. En revanche, cette molécule est inactive sur des souches productrices de bêta-lactamases. En association avec le céfépime, un nouvel inhibiteur de bêta-lactamase serait capable de restaurer son activité vis-à-vis des bactéries multirésistantes.

Le but de notre travail est d'évaluer l'activité de l'association céfépime/nouvel IBL dans quatre modèles murins expérimentaux (péritonite, sépticémie, pneumopathie et infection urinaire) et de comparer cette activité au céfépime seul et à un antibiotique de référence.

Six souches bactériennes seront évaluées dans ce projet :

- 1 souche de *K. pneumoniae* productrice de l'enzyme AmpC et d'une BLSE de type SHV
- 1 souche de *K. pneumoniae* productrice de l'enzyme AmpC et d'une BLSE de type CTX-M-15
- 1 souche de *K. pneumoniae* productrice de l'enzyme OXA 48
- 1 souche de *K. pneumoniae* productrice de l'enzyme KPC2
- 1 souche d'*E. cloacae* productrice d'une BLSE
- 1 souche *P. aeruginosa* productrice d'un efflux

Pour cela, 1652 souris Swiss femelles vont être utilisées.

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

Réduction.

Les premiers temps de l'expérimentation consistent à la validation du modèle avec les souches à étudier, ce qui permet d'utiliser le moins d'animaux possible lors de l'évaluation thérapeutique proprement dite.

Pour les évaluations thérapeutiques, le nombre de souris par groupe a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable.

Raffinement.

- Avant l'expérimentation :
 - o Choix des souches et modèles : Les souches choisies correspondent aux souches retrouvées lors des infections de sepsis, de pneumopathies et d'infections urinaires 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 postopératoires : Les souris reçoivent une injection sous cutanée de 50µL de buprénorphine (0,05mg/kg) 30minutes avant l'infection puis 3 fois par jour pendant 48h (soit la durée totale pour les modèles de DL100, sepsis IV et pneumopathie). Après cette phase, pour les protocoles les plus longs (DE 50 et infection urinaire), les animaux sont observés bi quotidiennement, pesés une fois par jour et en cas d'apparition de symptômes de douleurs, le traitement sera prolongé.
 - o Les modèles sont réalisés sous anesthésie générale : inhalation continue d'isoflurane 3% débit de gaz frais 0.8L/min (modèle sepsis IV et pneumopathie) ou injection intrapéritonéale d'une solution de kétamine (150 mg/kg) et de xylazine (5 mg/kg) (modèle infection urinaire).
 - o Application des points limites (cf raffinement avant expérimentation)
 - o Euthanasie par dislocation cervicale après pré-anesthésie par inhalation d'isoflurane (3% débit de gaz frais 0.8L/min).

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

4846. La résistance aux bêta-lactamines parmi les entérobactéries et *Pseudomonas* spp a considérablement augmenté et pose aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Cette résistance est due à l'émergence d'enzymes capables de les hydrolyser, les bêta-lactamases et principalement à des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Parmi les bêta-lactamases, les carbapénèmases sont les plus puissants mécanismes de résistance aux carbapénèmes. Ces carbapénèmases conduisent ainsi à une inefficacité partielle ou totale des antibiotiques de la classe des carbapénèmes considérés comme des traitements de dernier recours.

La stratégie la plus efficace pour restaurer l'activité des bêta-lactamines est de les associer à un inhibiteurs de bêta-lactamases (IBL).

Le céfépime est une céphalosporine de quatrième génération à large spectre, qui montre une activité bactéricide sur les bactéries à la fois à Gram positif et Gram négatif. En revanche, cette molécule est inactive sur des souches productrices de bêta-lactamases. En association avec le céfépime, un nouvel inhibiteur de bêta-lactamase serait capable de restaurer son activité vis-à-vis des bactéries multirésistantes.

Le but de notre travail est d'évaluer l'activité de l'association céfépime/nouvel IBL dans deux modèles murins expérimentaux, péritonite et infection de cuisse, et de comparer cette activité au céfépime seul.

Quatre souches bactériennes de phénotypes de résistance différents seront évaluées dans ce projet.

Pour la première partie de l'étude, pour chaque souche, deux paramètres seront déterminés: la dose létale 100 et la dose efficace 50 (pour chaque souche et pour chaque antibiotique (céfépime et céfépime/IBL)). Pour la dose létale 100, trois inocula par souche seront testés soit 72 souris pour ce paramètre. Pour évaluer la dose efficace 50, les animaux infectés seront répartis en 13 groupes : un groupe témoin, 6 groupes traités avec le céfépime (6 posologies) et 6 groupes traités avec le céfépime en association avec l'IBL (6 posologies) soit 312 souris au total. Afin de mener à bien cette première partie de l'étude, 384 souris Swiss femelles vont donc être utilisées.

Pour la deuxième partie de l'étude, la greffe bactérienne sera dans un premier temps validée. Puis, après avoir induit une infection de la cuisse chez des souris neutropéniques, 3 groupes seront traités avec un antibiotique (1 groupe correspondant à un schéma thérapeutique : céfépime seul ou en association avec l'IBL (2 posologies)) et 2 groupes ne recevront pas de traitement (animaux témoins). Quarante-huit heures après l'infection, les animaux seront euthanasiés et le quadriceps de la cuisse droite et celui de la cuisse gauche seront prélevés afin de déterminer les charges bactériennes. 36 souris Swiss femelles par souche vont ainsi être utilisées soit un total de 144 pour ce modèle.

Au total, pour ce projet, 528 souris SWISS seront utilisées.

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

4847. La thérapie génique est une stratégie innovante de médecine moléculaire consistant à transférer un acide nucléique thérapeutique dans les cellules malades pour améliorer l'état clinique d'un patient. Pour véhiculer ce produit thérapeutique, les vecteurs viraux, et en particulier les vecteurs recombinants dérivés des virus adéno-associés (AAVr) constituent des outils de choix. Il a été montré qu'une seule injection avec un AAVr peut permettre une expression à long terme du gène thérapeutique transféré, aussi bien dans des modèles animaux que chez l'homme. Néanmoins, malgré des succès récents, un des facteurs majeurs limitant l'efficacité du transfert de gène *in vivo* à l'aide d'AAVr dans les essais cliniques provient de la réponse immunitaire dirigée contre la capsid du vecteur. Dans certains cas, celle-ci est responsable de la destruction des cellules transduites, annihilant de fait tout bénéfice de la thérapie génique. L'occurrence de cette réponse immune délétère s'explique par le fait que les hommes sont naturellement infectés au cours de leur vie par des virus AAV sauvages (virus qui ne sont par ailleurs à ce jour associés à aucune pathologie chez l'homme). Les individus ainsi infectés développent un pool de lymphocytes T (LT) CD8+ spécifiques de la capsid de l'AAV. Or, la capsid du vecteur AAVr étant similaire à celle de l'AAV sauvage, les clones mémoires de LT CD8+ spécifiques de la capsid sont susceptibles d'être réactivés lors d'un transfert de gène à l'aide d'AAVr et peuvent potentiellement détruire les cellules transduites qui présentent à leur surface des épitopes dérivés de la capsid de l'AAVr (suite à la dégradation de la capsid par le protéasome cellulaire après entrée du vecteur). Le déclenchement ou non de cette réponse immune cellulaire anti-capsid semble être dépendante de nombreux facteurs (voie d'administration de l'AAVr, dose injectée, tissu ciblé, transgène thérapeutique apporté...) et son impact sur le transfert de gène reste à ce jour difficile à appréhender. En effet, les modèles *in vitro* ne peuvent s'approcher de la complexité des interactions entre le vecteur et le patient humain, et les modèles animaux de transfert de gène disponibles à ce jour ne récapitulent pas toujours les observations faites chez l'homme. L'objectif de ce projet est d'élucider l'impact des LT CD8+ humains spécifiques de la capsid de l'AAV sur le transfert de gène. Dans cette optique, un modèle *in vitro* ne peut pas Remplacer un modèle animal. L'utilisation de la souris est ici justifiée à la fois par l'existence de plusieurs modèles de souris humanisées permettant le transfert adoptif efficace de lymphocytes humains, ainsi que par la possibilité de constituer des groupes d'animaux suffisamment larges pour pouvoir effectuer des calculs statistiques. En comptant les groupes contrôles, nous avons estimé que nous aurons besoin d'au plus 360 souris pour l'expérimentation. Les groupes seront constitués

et analysés séquentiellement, afin de Réduire le nombre d'animaux utilisés. Les protocoles envisagés, à savoir transfert adoptif de lymphocytes humains et administration d'AAVr, sont des procédures ayant déjà été réalisées dans des modèles murins avec une bonne tolérance générale. Une courbe de poids hebdomadaire ainsi qu'une inspection visuelle quotidienne des animaux seront réalisées. Tout signe clinique notable sera suivi par l'expérimentateur afin de Raffiner la méthodologie expérimentale.

4848. Les personnes accueillies à l'hôpital suite à un traumatisme crânien développent très fréquemment des pneumonies (infections nosocomiales) suite à une baisse transitoire des défenses de l'organisme (système immunitaire). Il est connu que le système nerveux module et influence les capacités de défense de l'organisme mais le(s) mécanisme(s) est (sont) inconnu(s).

Les cellules dendritiques (CDs) sont des cellules de l'immunité ayant un rôle primordial dans le contrôle de l'état d'activation du système immunitaire. Afin d'éviter un emballement de notre système de défense et éviter ainsi l'apparition de maladies inflammatoires chroniques, les CDs ont la capacité d'éteindre l'activation des cellules de l'immunité (rôle anti-inflammatoire).

Suite à un traumatisme crânien, la réponse inflammatoire systémique est suspectée d'induire une modification de l'activité des CD4 vers une fonction anti-inflammatoire excessive. Cette réponse anti-inflammatoire excessive pourrait être à l'origine de l'incapacité des malades dans les services de réanimation, à réagir contre une contamination bactérienne expliquant ainsi l'augmentation de leur susceptibilité à l'infection.

Le but de notre étude est de vérifier si la création de lésions cérébrales (retrouvées chez les traumatisés) conduit à l'apparition d'une activité anti-inflammatoire des CD4 expliquant l'augmentation de susceptibilité des patients aux infections nosocomiales. Pour cela, 2614 souris seront utilisées au cours de ce projet qui se divise en 3 parties. La 1ère partie consistera à valider qu'une lésion cérébrale inhibe les fonctions du système immunitaire. Dans la 1ère partie, les poumons, les ganglions lymphatiques, la rate et le sang des souris seront récupérés afin d'étudier le phénotype et les fonctions des NK et des CD4 dans ces différents organes.

La 2ème partie évaluera la susceptibilité des souris traitées à l'induction d'une pneumopathie bactérienne. Dans la 2ème partie du projet, lors de l'induction de la pneumonie, les poumons, les organes lymphoïdes et la rate des souris seront prélevés (analyses bactériologiques et immunologiques).

La 3ème partie évaluera le rôle des médiateurs cytokiniques (IL-6 et IL-10) ou cellulaires (Tregs) dans ce phénomène d'immunodépression post-traumatique. Dans la 3ème partie du projet, des traitements déplétifs (anticorps, toxine diphtérique) seront injectés entre le traumatisme et l'induction de la pneumonie. Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'étude de l'influence du système nerveux ne peut se faire que dans un organisme entier. Le nombre de souris a été réduit au minimum possible tout en permettant une analyse statistique fiable. Enfin, le bien-être des souris est surveillé tout au long de l'étude.

4849. L'aspergillose invasive est une infection due à un champignon appartenant au genre *Aspergillus*. Cette pathologie se caractérise par une altération de l'état général due à la dissémination du champignon dans l'organisme. Sans traitement efficace, elle aboutit au décès du patient. Les traitements actuellement disponibles, bien que souvent efficace, sont peu nombreux. L'émergence de souches résistantes ou les effets indésirables de ces traitements font qu'il est nécessaire de développer toujours et encore de nouveaux antifongiques.

Parmi les modèles murins disponibles, deux modèles complémentaires sont adaptés pour cette étude, le modèle d'aspergillose systémique et le modèle d'aspergillose cérébrale. Afin de réaliser l'ensemble des expériences et d'obtenir des résultats interprétables, 600 animaux (300 par procédure) seront nécessaires pour mener à bien cette étude.

Les souris sont hébergées en groupe, dans un environnement enrichi. Les protocoles expérimentaux ont été établis de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés en choisissant d'évaluer uniquement les nouveaux antifongiques ayant fait la preuve de leur activité *in vitro*. La durée maximale du traitement est de 5 jours. La souffrance animale est évaluée au cours du suivi quotidien de l'évolution clinique des animaux. Tout animal manifestant un signe de gravité est euthanasié.

4850. Les entérobactéries sont de plus en plus résistantes aux antibiotiques. La résistance aux antibiotiques de la famille des β -lactamines est principalement due à des β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Parmi les β -lactamases, les carbapénémases sont les plus puissants mécanismes de résistance aux carbapénèmes. Ces carbapénémases conduisent ainsi à une inefficacité partielle ou totale des antibiotiques de la classe des carbapénèmes (imipénème, méropénème, ertapénème et doripénème) considérés comme des traitements de dernier recours.

Les entérobactéries productrices de carbapénémases sont généralement multirésistantes à d'autres familles d'antibiotiques et peuvent ainsi induire des infections difficiles à traiter et être sources d'impasses thérapeutiques. Il est donc indispensable d'évaluer de nouveaux antibiotiques présentant de nouveaux mécanismes d'action.

Une première étude réalisée en 2015 avait démontré des résultats encourageants avec ce nouvel antibiotique dans le modèle d'infection de cuisse chez la souris neutropénique. La molécule a depuis été optimisée et potentialisée, c'est pourquoi, nous testerons de nouveau son efficacité dans ce même modèle sur des bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *K. pneumoniae*).

Pour cela, 720 souris Swiss femelles vont être utilisées. Après avoir induit une infection de la cuisse chez des souris neutropéniques, 25 groupes seront traités avec l'antibiotique (1 groupe correspond à un schéma thérapeutique) et 2 groupes ne recevront pas de traitement (animaux témoins). Vingt-quatre heures après l'infection, les animaux seront euthanasiés et le quadriceps de la cuisse droite et celui de la cuisse gauche seront prélevés afin de déterminer les charges bactériennes.

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

4851. *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus spp* sont des bactéries de la flore commensale pouvant être responsable d'infections nosocomiales. *Staphylococcus aureus* peut entraîner des maladies telles que l'ostéomyélite, l'endocardite ou bien encore des pneumopathies ou des pyélonéphrites. Les infections dues à cette bactérie sont en générales traitées par β -lactamines. Les *Enterococcus spp* causent également des infections cliniques importantes comme des infections des voies urinaires, des bactériémies et des méningites. Les infections dues à ces bactéries sont généralement traitées par l'association de deux antibiotiques : l'amoxicilline (antibiotique de la famille des β -lactamines) et la teicoplanine.

Cependant, ces bactéries ont tendance à développer des mécanismes de résistances aux antibiotiques. La propagation de cette multi-résistance et l'absence de nouveaux antibiotiques font courir un risque d'impasse thérapeutique de plus en plus fréquent. Il apparaît donc indispensable d'évaluer de nouveaux antibiotiques.

Le but de notre projet est d'étudier *in vivo* l'activité d'un nouvel antibiotique de la classe des β -lactamines. Dans un premier temps, nous déterminerons les paramètres pharmacocinétiques de cet antibiotique, puis nous évaluerons son efficacité *in vivo* à travers plusieurs modèles expérimentaux (infection de cuisse, septicémie (péritonite et intraveineux)) chez la souris. Nous évaluerons ensuite son activité chez le lapin au travers d'un modèle d'endocardite expérimentale.

Pour cela, 1366 souris Swiss femelles et 144 lapins Néo-Zélandais vont être utilisés.

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

4852. La propagation des bactéries multi résistantes et l'absence de nouveaux antibiotiques font courir un risque d'impasse thérapeutique de plus en plus fréquent. Face à cette augmentation continue des résistances bactériennes, de nouvelles approches thérapeutiques sont nécessaires pour combattre les infections, telles que l'utilisation des peptides anti-microbiens, qui ont une action sur les souches bactériennes résistantes voire multi-résistantes.

Les peptides antimicrobiens sont des protéines d'origine naturelle, généralement constituées de 12 à 50 acides aminés, ayant des propriétés antibiotiques. Ces peptides sont synthétisés naturellement pour agir comme défenses contre les maladies (pulmonaires, cutanées ou encore digestives) provoquées par divers microorganismes et sont actifs contre les bactéries, tant à gram positif qu'à gram négatif.

Le but de notre projet est d'étudier *in vivo* l'activité d'un nouveau peptide.

Dans un premier temps, nous étudierons les paramètres pharmacocinétiques du peptide, puis nous évaluerons son efficacité *in vivo* à travers deux modèles expérimentaux (infection urinaire et septicémie (péritonite) chez la souris.

Pour cela, 952 souris Swiss femelles vont être utilisés.

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

4853. Les candidoses profondes sont la quatrième cause d'infection nosocomiale. Elles concernent principalement des patients atteints de pathologies engendrant une immunodépression soit par elles-mêmes soit due à leurs traitements. Le taux de mortalité reste élevé même avec une prise en charge thérapeutique adaptée. De plus, des résistances aux traitements actuels sont décrites. Il est donc nécessaire de développer d'une part de nouveaux traitements mais aussi de mieux comprendre les mécanismes de défenses immunitaire mis en jeu par le patient pour lutter contre ces infections fongiques.

Cette procédure vise donc à évaluer dans un modèle murin l'efficacité de nouveaux composés pour le traitement des candidoses invasives. Elle nécessite l'utilisation de 300 animaux. Les souris sont hébergées en groupe, dans un environnement enrichi. Les protocoles expérimentaux ont été établis de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés ainsi que la souffrance animale par un suivi quotidien de l'évolution clinique des animaux. Tout animal manifestant un signe de gravité est euthanasié.

4854. Les patients atteints de diabète présentent des lésions vasculaires importantes qui touchent les gros mais aussi les petits vaisseaux sanguins et entraînent l'apparition précoce de complications cardiovasculaires. Le développement de nouveaux vaisseaux est considérablement réduit chez ces patients et peut conduire au développement d'une artériopathie périphérique des membres inférieurs. Il en résulte une ischémie (un défaut d'oxygène) des muscles et de la peau qui souffrent et peuvent se nécroser si cette ischémie perdure. Les diabétiques souffrent d'affections de la peau en raison d'une microangiopathie cutanée. Il est alors nécessaire de recourir à une amputation de la partie touchée, souvent les orteils voire le pied. Malgré l'amélioration apportée par les traitements, il est fréquent que des patients ayant atteint un stade avancé de la maladie, en meurent. Il n'existe pas aujourd'hui de traitement efficace pour traiter cette maladie.

Les recherches se sont donc orientées vers différentes stratégies regroupant l'injection de molécules actives sur la formation des vaisseaux, et la thérapie cellulaire basée sur l'injection de cellules souches de la moelle osseuse, pour recréer un réseau vasculaire. Le diabète est une maladie complexe et seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement possible le microenvironnement diabétique, permet d'étudier l'efficacité de ces traitements à revasculariser la jambe ischémisée.

Dans un premier temps, nous évaluerons l'efficacité des molécules bioactives pour former de nouveaux vaisseaux sanguins dans une matrice extracellulaire injectée sous la peau de souris. Puis nous soumettrons les souris adultes à un régime riche en acides gras et en sucre pour les rendre diabétiques. Nous suivrons leur glycémie tous les 15 jours par la mesure du glucose dans une goutte de sang. Nous injecterons ensuite les cellules souches ou les molécules bioactives à tester, par voie intraveineuse, à des souris ayant subi une excision de l'artère fémorale afin d'obtenir un modèle qui mime la pathologie humaine de l'artériopathie périphérique des membres inférieurs. Nous analyserons toutes les semaines, le flux sanguin dans les pattes par ultrasons : doppler artériel et veineux. Après 21 jours, les souris seront euthanasiées pour prélever les muscles afin d'étudier les lésions vasculaires et apprécier la revascularisation du muscle de la patte ischémisée.

Le nombre de souris sera de 285. Nous utiliserons une lignée de souris génétiquement modifiées pour éviter tout rejet des cellules humaines injectées. Dans l'objectif de suivre la règle des 3R, et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques, nous limiterons le nombre d'expérience et de souris nécessaires. Nous souhaitons valider in vivo, l'efficacité des molécules bioactives et des cellules souches préalablement testées in vitro en culture cellulaire. L'utilisation du modèle in vivo d'ischémie de la patte inférieure permet de réduire le nombre d'animal car chaque animal est son propre témoin. L'ischémie en effet n'est réalisée que sur une des 2 pattes.

Une surveillance journalière sera assurée après la chirurgie. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie générale et des antalgiques sont prévues en post-opératoire. Des points-limite ont été établis qui entraînent l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

Ce travail permettra de valider l'efficacité des protocoles proposés dans la revascularisation des muscles de la patte ischémisée de souris diabétiques. Il apportera des informations importantes sur la formation des nouveaux vaisseaux et les moyens d'optimiser la thérapie cellulaire pour traiter ces pathologies ischémiques chez les patients diabétiques.

4855. Un régime alimentaire soutenu, particulièrement riche en gras, provoque de nombreux effets délétères sur la plupart de nos fonctions physiologiques. Les raisons qui permettent de rendre compte de ces effets sont multiples. Parmi elles, l'altération de la qualité de nos membranes cellulaires joue sans doute un rôle important mais dont le mécanisme et l'ampleur n'ont pas été encore aujourd'hui étudiés en détail.

Nous proposons d'évaluer la modification des performances cardiovasculaires et musculaires après un régime alimentaire standardisé riche en matières grasses chez le rat, en parallèle avec une évaluation du contenu qualitatif des membranes cellulaires des organes concernés.

Nous espérons mettre en évidence un certain nombre de modifications des performances fonctionnelles en même temps qu'une perturbation du contenu lipidique membranaire. Des produits potentiellement correcteurs de la structure membranaire seront alors évalués.

Ces objectifs seront poursuivis sur le rat grâce à :

- l'investigation des performances cardiaques mesurées en cœur isolé perfusé par la technique de Langendorff
- l'évaluation des performances physiques lors d'exercices sur tapis roulant.
- l'analyse qualitative du contenu lipidique des membranes d'organes clef parmi lesquels nous retenons le cœur, le poumon, le foie, le pancréas, le cerveau, la peau et le muscle tibial antérieur.

Nous souhaitons par cette étude être capables d'évaluer l'impact fonctionnel de la structure membranaire sur les performances physiologiques de l'organisme et identifier ainsi de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la prise en charge des pathologies liées aux dérèglements lipidiques.

Les animaux (8-10 semaines) seront répartis en différents groupes : un groupe contrôle sera constitué de rats élevés et nourris de façon standard. Un groupe HFD aura lui bénéficié d'un régime « high fat diet » depuis plus de 8 semaines. Enfin, un groupe test aura lui également bénéficié d'un régime « high fat diet » mais accompagné d'un traitement par voie buccale avec des correcteurs potentiels de l'intégrité membranaire.

Une telle étude doit obligatoirement être conduite sur animal entier et organe entier, nous empêchant d'envisager tout type de remplacement de l'expérimentation animale par une méthode alternative (Remplacement impossible). Toutefois, une analyse précise des besoins de notre étude nous amène à limiter le nombre d'animaux testés à son minimum (Réduction optimisée). Afin de mieux organiser nos expériences et ne pas risquer de perdre des animaux en cours de phase de recherche (Raffinement), nous proposons de répartir nos animaux en 3 campagnes expérimentales sur les 2 années de recherche. Ces campagnes sont organisées comme suit :

Campagne 1 : - Deux groupes : 20 rats de chaque groupe (contrôle et HFD)

Campagne 2 : - Trois groupes : 20 rats de chaque groupe (contrôle, HFD, HFD traités)

Campagne 3 : - Idem à 2

Le total d'animaux intégrés à l'étude est donc de $40+60+60 = 160$.

4856. La voie injectable constitue une voie d'administration largement utilisée dans le traitement individuel des pathologies bovines. Dans ce projet, le développement du nouveau médicament injectable s'appuie sur une formulation commerciale existante (=produit de référence) en vue de l'enregistrement d'un médicament équivalent. Au cours du développement de ce nouveau médicament, des études préliminaires comparatives de tolérance locale au point d'injection, de pharmacocinétique plasmatique et de déplétion des résidus dans le lait vont permettre de caractériser et de comparer le comportement dans l'organisme de différentes formulations entre elles et avec la formulation de référence, afin d'optimiser le choix d'une formulation finale en vue de son enregistrement.

Ces études sont réalisées après administration unique ou répétée dans l'espèce de destination des formulations étudiées. Les groupes de bovins comparés doivent être le plus homogènes possible (race, poids, âge). Le nombre d'animaux dans chaque groupe comparé doit être le même. Dans ce projet, les groupes sont étudiés selon un schéma expérimental en "cross-over" : chaque animal utilisé est son propre témoin, recevant successivement les formulations à comparer. Les différentes administrations sont séparées par une période suffisamment longue (« wash-out ») pour s'assurer de l'élimination de la substance active du traitement précédent, période définie en fonction des caractéristiques pharmacocinétiques de la substance étudiée.

Les réactions locales qui pourraient être observées après injection sont suivies et documentées par l'observation régulière du ou des site(s) d'injection et comparées à la formulation de référence.

Les prélèvements sanguins réalisés dans les études de pharmacocinétiques sont faits à intervalle réguliers et selon le même rythme pour toutes les formulations afin d'obtenir des courbes qui puissent être comparées.

La présence de résidus de médicament dans le lait est comparée après administration de chaque formulation en analysant des échantillons de lait prélevés lors des traites successives, le rythme des traites devant s'approcher le plus possible des pratiques rencontrées dans les différents systèmes d'élevage.

Ces études constituent des étapes pour aboutir au choix d'une formulation optimisée bioéquivalente à la formulation commerciale de référence. Elles s'appuient sur les lignes directrices en vigueur afin d'adapter au mieux le schéma expérimental à la finalité des études. Ces études doivent être réalisées dans l'espèce de destination. Le recours au bovin, en tant qu'espèce de destination, ne peut donc être évité. Les procédures expérimentales de ce projet ne nécessitent aucun sacrifice final et les animaux utilisés peuvent être réutilisés. La réutilisation des bovins inclus dans ce projet peut être envisagée en fonction de la durée et de l'espacement des études. Le nombre total de bovins nécessaire à la réalisation de ce projet est variable en fonction du nombre de répétition des procédures expérimentales et de la capacité de réutilisation des animaux, sans toutefois excéder 200 bovins sur 5 ans. Les animaux inclus dans ce projet sont hébergés dans leur cadre de vie habituel et ont accès à des pâtures extérieures chaque fois que les observations et les prélèvements le permettent. Pendant le déroulement des procédures expérimentales, les conditions habituelles d'élevage sont maintenues et notamment la ration (composition et distribution), les conditions de traite et les conditions d'hébergement, afin de ne pas engendrer de stress additionnel.

4857. Dans le cadre de la lutte antinuisible contre les rongeurs sauvages dans le domaine agricole, il est nécessaire de développer des rodenticides efficaces permettant une réduction des populations de rongeurs sauvages sur des exploitations agricoles, sans apparition de résistance ni d'intoxications secondaires (effets indésirables sur les prédateurs naturels de ces espèces), mais le plus appétant possible (très bonne consommation du produit par les rongeurs face à une concurrence alimentaire importante) pour le rongeur et non l'environnement.

Pour cela, les industriels ont mis au point des produits de type anticoagulant car ces produits sont de loin les plus utilisés en Europe. En effet, ils produisent une mort sans douleur excessive et ils peuvent être traités médicalement en cas d'intoxication accidentelle chez l'homme ou l'animal domestique.

Au-delà de l'analyse in vitro des effets moléculaires des substances testées, le recours à des études sur rongeurs vivants est indispensable pour analyser l'aspect comportemental. Les souches de laboratoire des espèces utilisées, rat brun et souris, sont les cibles principales, mais certaines espèces comme les rongeurs champêtres (campagnols et mulots) doivent aussi être envisagés pour la lutte agricole. Les tests envisagés respectent les normes internationales propres à ce domaine d'activité.

Les animaux faisant partie de ce que l'on appelle la « Faune sauvage », ils seront piégés dans leur milieu naturel par un piègeur agréé.

Le projet utilisera un nombre total de 100 campagnols et 100 mulots : ce nombre est calculé sur une prévision de 10 études par an pour le test de produits nouveaux par comparaison aux produits de référence. Chaque étude impliquera des groupes de 10 campagnols et/ou mulots en cages individuels, ce qui est le minimum défini par les normes pour détecter une différence significative.

Afin de rester dans des conditions de bien-être animal (surtout dans le cadre de ces animaux qui devront être en cages individuelles) et ne pas modifier le comportement biologique de l'animal, des procédures d'enrichissement sont mises en place (présence de paille dans les cages pour la nidification, ajout de morceaux de pommes...).

Il existe aujourd'hui 2 approches concernant la vérification de l'efficacité des biocides de types anticoagulants chez le rongeur champêtre.

Le premier, le test d'appétence, concerne l'étude d'appétence d'un produit (avec matière active ou sans matière active). Celui-ci peut s'effectuer sur 10 campagnols (*Microtus arvalis*) ou 10 mulots (*Apodemus sylvaticus*). Il se présente sous la forme de mesures de consommations journalières individuelles (pour chaque espèce) du produit par rapport à de la nourriture standard de laboratoire ou du blé, voire des morceaux de pomme (afin de rester dans le même registre d'alimentation). Un rapport des consommations est ensuite effectué afin de savoir quel est la nourriture la plus consommée. Les dommages dans ces études sont minimes car le produit ne contient pas de matière active, mais ils peuvent être importants quand le produit contient de la matière active qui produit des effets toxiques (nous serons dans une étude couplée à une efficacité comme défini dans le paragraphe ci-dessous).

Le second, le test d'efficacité, met à disposition des animaux le produit contenant la matière active pendant un jour et un suivi clinique quotidien des animaux est effectué sur les 17 jours suivants (les animaux recevant à nouveau l'alimentation normale). L'objectif même des études peut conduire à des dommages, puisque des signes d'intoxication modérée ou sévère pourront apparaître durant cette période : la comparaison des produits se fera sur la base du recueil précoce des observations pertinentes (effets cliniques attendus ou nouveaux). Il convient toutefois de préciser que la mort par intoxication avec un anticoagulant est précédée d'une phase de perte de conscience sans manifestation douloureuse, et que donc la souffrance ressentie par les animaux dans les procédures reste acceptable. Afin de réduire les effectifs utilisés, les tests d'appétence puis d'efficacité pourront être conduits sur les mêmes animaux en prévoyant une phase de récupération (et les produits non concluants en terme d'appétence ne seront pas soumis à un test d'efficacité). Afin de minimiser au maximum les risques sanitaires, les animaux seront piégés et placés en cages individuelles dans une armoire ventilée spécialement mise à disposition par l'animalerie pendant toute la durée de l'essai. Malgré tout, de par leur nature sauvage, les animaux ne seront pas manipulés, les procédures de raffinement ne concerneront que les conditions d'hébergement (amélioration de la nidification, etc..) avec un suivi clinique renforcé lors de phases critiques. Des points limites adaptés seront appliqués dans tous les tests pour mettre à mort un animal par surdosage anesthésique au cas où un produit entraînerait une dégradation excessive de l'état général ou du comportement.

4858. Les thérapies standards contre les cancers dits « solides » ont rarement des effets efficaces à long terme et de nombreuses rechutes sont observées. Par ailleurs, ces thérapies sont extrêmement toxiques car elles ne sont pas spécifiques des cellules tumorales. Notre propre système immunitaire est capable de reconnaître spécifiquement les cellules tumorales avec en théorie, une protection à long terme.

Notre projet a pour objectif d'étudier comment les cellules immunitaires migrent et coopèrent in vivo pour rejeter une tumeur. Il est possible d'induire des régressions tumorales chez la souris et d'étudier quelles sont les coopérations cellulaires qui régissent ces réponses immunitaires efficaces. Seule l'expérimentation in vivo sur les souris, mimant fidèlement le microenvironnement tumoral et intégrant l'ensemble du système immunitaire, nous permettra de répondre à cette proposition.

Les régressions tumorales seront induites par traitement avec un vaccin ou une molécule bloquant spécifiquement la vascularisation de la tumeur. Les souris seront injectées sous la peau avec des cellules tumorales qui proviennent soit d'une lignée cellulaire déjà établie in vitro, soit de tumeurs primaires prélevées à partir de souris génétiquement modifiées développant spontanément des tumeurs mammaires. Après 10 jours, les souris seront injectées par voie sous cutanée ou intra-péritonéale pour induire la régression. La croissance tumorale sera comparée entre les groupes grâce à des mesures réalisées toutes les 3 jours avec un pied à coulisse sur une période totale de 40 jours. Après euthanasie des souris, des prélèvements de tumeurs et de ganglions seront réalisés afin d'étudier la cinétique de recrutement des cellules immunes. Des injections intra-péritonéales d'anticorps éliminant sélectivement certaines cellules ou protéines du système immunitaire nous permettront de révéler l'importance relative de certaines sous-populations immunes. Cette étude nécessitera un total de 2964 souris pour une période totale de 5 ans.

Pour respecter le principe des 3R, des paramètres expérimentaux, tels que le type cellulaire et le nombre de cellules nécessaires à l'implantation, ont déjà été déterminés dans d'autres projets et permettent de réduire le nombre d'animaux utilisés ici, tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants et une bonne reproductibilité. En particulier, le détournement par des souris implantées avec des cellules primaires de tumeurs mammaires nous permettra de réduire le nombre de souris transgéniques. En effet, les cellules isolées des tumeurs spontanées d'une seule souris transgénique permettent de transplanter simultanément 10 souris et ainsi de constituer des lots synchronisés et homogènes afin de comparer les différents traitements mais également de mieux gérer la souffrance car les tumeurs restent localisées au site d'injection et ne sont pas invasives. De plus, l'établissement de points limites avec un suivi quotidien nous permet de réduire au maximum la souffrance des animaux.

Les régressions tumorales induites par stimulation du système immunitaire sont la preuve d'une réponse efficace contre la tumeur. Ces modèles murins nous permettront d'identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents afin de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques.

4859. Le projet vise à étudier les techniques d'alimentation animale permettant de limiter les effets négatifs chez le porc d'une toxine appelée DON (déoxynivalénol) naturellement produite par diverses espèces de champignons appartenant au genre *Fusarium*.

Les mycotoxines sont des métabolites sécrétés par différentes espèces fongiques qui se développent sur les produits végétaux, dont les céréales, au champ ou bien après la récolte lors du stockage. En France, les mycotoxines sont présentes en faibles quantités ne présentant pas de risque pour la santé humaine ou animale, mais les concentrations peuvent être parfois plus élevées, par exemple lorsque l'année est pluvieuse. Les mycotoxines sont des molécules stables dont il est difficile d'éviter les effets lorsqu'elles sont présentes dans l'alimentation des animaux.

Les conséquences de doses moyennes de mycotoxines sont bien caractérisées chez le porc, espèce considérée comme la plus sensible, et correspondent généralement à une réduction de la croissance ou à des problèmes de reproduction. Concernant le DON, les effets sont principalement d'ordre économique et liés à la baisse de la consommation d'aliment observée au-delà d'une teneur de 1 mg/kg d'aliment. Mais des doses modérées de DON peuvent également altérer la réponse immunitaire et diminuer la résistance aux maladies. Le DON est rapidement absorbé et métabolisé et ne pose pas de problème de résidus dans les produits carnés.

En résumé, les effets directs de doses moyennes de DON sont relativement visibles (consommation d'aliment, reproduction) et mesurables par les éleveurs. A doses modérées, les effets chroniques pourraient contribuer à affaiblir l'état sanitaire et faciliter le développement de maladies.

L'incorporation de produits capteurs dans les aliments du bétail est une solution proposée afin de limiter les effets des mycotoxines. Certains ingrédients ont la propriété de capter ou de détoxifier les mycotoxines, limitant ainsi l'absorption et la distribution dans l'organisme. Cependant, peu de recherches portent sur l'efficacité de ces produits capteurs en alimentation porcine. La validation de l'efficacité d'un produit capteur permettra aux éleveurs de préciser les conditions d'emploi et de les intégrer dans les stratégies de lutte vis-à-vis de céréales concernées. Enfin, lutter contre les mycotoxines en ajoutant à l'aliment des antioxydants apparaît comme une voie prometteuse de réduction de l'impact de ces composés.

Le projet comporte deux études sur porcs charcutiers qui permettront de tester l'effet de trois produits capteurs de mycotoxines puis d'un apport d'antioxydants sur les performances d'élevages et les paramètres sanguins des porcs. Des aliments à base de céréales naturellement contaminées par les mycotoxines vont être utilisés. Les résultats vont permettre de déterminer les produits ou stratégies efficaces à la réduction des effets négatifs des mycotoxines sur les performances porcines.

Le projet nécessite le suivi de 220 porcs charcutiers élevés dans les conditions standards d'un élevage de porcs. L'approche éthique du projet est basée sur les solutions de remplacement, de réduction et de raffinement.

Remplacement. L'étude mobilise une équipe pluridisciplinaire. Elle permettra d'obtenir des informations sur l'élevage, la santé, l'immunité des animaux grâce aux biomarqueurs sanguins. Le porc est une espèce domestique et il n'est pas possible d'utiliser une autre espèce pour mesurer l'efficacité des aliments du bétail et leurs interactions avec la santé des animaux. Il n'existe pas

actuellement de modèle pharmacocinétique ou de test in vitro permettant de représenter de tels mécanismes physiologiques complexes ou de prédire les effets de ces composés sur la santé et l'immunité. L'étude est un premier pas vers l'identification de bio-marqueurs de l'exposition des animaux d'élevage.

Réduction. Le nombre d'animaux utilisés a été établi en veillant à limiter l'effectif tout en disposant de suffisamment de données pour répondre aux questions étudiées. Les deux prélèvements sanguins effectués permettront pour chaque animal le dosage de plusieurs biomarqueurs utiles pour apporter des informations différentes. Le nombre d'animaux sujets soumis aux prises de sang a été limité et ne concerne que 60 porcs dans la procédure 1, puis 48 porcs dans la procédure 2. Dans cette dernière, 112 porcs ne sont l'objet que du suivi zootechnique nécessaire pour mesurer d'éventuels effets sur l'appétit et la croissance.

Raffinement. Les porcs sont élevés selon les pratiques agricoles usuelles. Le savoir-faire de la station de recherches et les compétences et l'expérience du personnel et des intervenants en matière d'élevage porcin et de procédures expérimentales garantissent l'absence de douleur animale et de détresse, et la prise en charge optimale du bien-être. Les porcs sont élevés jusqu'au terme de la durée habituelle d'élevage des porcs charcutiers en France.

4860. Dans le système nerveux, l'information se propage le long du neurone par des petits courants électriques dit potentiels d'action pour se transmettre aux autres neurones avec lequel il est connecté. Cette communication se fait au niveau de la synapse où le signal électrique est converti en signal chimique. Cette synapse est donc faite de 3 éléments : la terminaison du neurone présynaptique, la fente synaptique et la terminaison du neurone post-synaptique. Quand le signal électrique arrive au niveau de la pré-synapse, un neurotransmetteur est libéré dans la fente synaptique et comme une clé dans une serrure, va activer des récepteurs spécifiques insérés dans la membrane du neurone post-synaptique. Ces récepteurs codent le signal obtenu en sortie en un signal électrique capable de se propager à son tour. La connexion entre deux neurones n'est pas figée, mais dépend des activités antérieures des neurones et de leur « utilisation » de cette connexion et ceci grâce à la plasticité synaptique qui est la propriété que les synapses ont de changer en force en fonction de l'usage qui en est fait. Elle permet d'expliquer de nombreuses formes de mémoire simple présentes chez tous les individus présentant un système nerveux, même peu développé. La neurotransmission peut donc être excitatrice, inhibitrice ou modulatrice. La transmission excitatrice se fait principalement grâce au glutamate, un acide aminé. Les récepteurs spécifiques qui lui sont associés sont regroupés en 3 familles (AMPA, NMDA, et kainate). Les récepteurs AMPA et NMDA sont particulièrement impliqués dans les phénomènes de plasticité synaptique qui permettent de changer continuellement le niveau de communication entre neurones. Ce phénomène nous permet de modifier nos réponses comportementales lors d'événements déjà rencontrés, et donc l'apprentissage et la mémorisation. En effet, certains de ces phénomènes de plasticité synaptique peuvent durer plusieurs jours voir semaines. D'autres phénomènes de plasticité à plus court terme sont moins bien connus, mais pourraient permettre la mise en place de mémoire plus labiles, telles que les mémoires de travail, ainsi que de permettre d'adapter notre réponse comportementale lors de situations complexes, un phénomène appelé flexibilité cognitive. L'objet de cette étude est donc de tester l'importance de la mobilité latérale des récepteurs AMPA dans la plasticité synaptique sous-tendant la mémoire de travail et la flexibilité cognitive.

Notre groupe travaille sur la plasticité synaptique à la synapse excitatrice, et à son lien avec le comportement. Nous avons déjà montré l'importance des mouvements des récepteurs AMPA dans la membrane au voisinage de la synapse. Notre synapse modèle est celle de la région de l'hippocampe de rongeur, connue pour son implication dans les phénomènes de mémoire et d'apprentissage. En effet en utilisant in vitro des cultures de neurones de la région de l'hippocampe du cerveau de souris et des tranches d'hippocampe en culture, en immobilisant ces récepteurs AMPA avec des molécules spécifiques, nous avons pu modifier la plasticité à court, moyen et long terme (échelles de temps de la milliseconde à une heure). Dans ce projet, nous souhaitons passer à un modèle in vivo, la souris C57BL6/J, pour valider nos résultats obtenus in vitro en explorant les phénomènes cognitifs qui sont liés à ces phénomènes de plasticité.

Ainsi, les temps d'action de ces molécules capables d'immobiliser les récepteurs, étant courts, notre stratégie expérimentale sera d'implanter des canules dans l'hippocampe des souris afin de pouvoir les injecter ces molécules, avant de soumettre les animaux aux tests comportementaux de mémoire et de prise de décision dans un labyrinthe en Y. Des groupes témoins recevront des versions inactives de ces molécules. L'utilisation d'approches comportementales nécessite donc l'utilisation d'animaux.

Ce projet utilisera 71 souris C57BL6/J. Mais dans le respect du R de réduire de la règle des 3R, nos groupes expérimentaux seront dimensionnés pour utiliser le plus petit nombre possible d'animaux pour avoir néanmoins des statistiques solides. Dans le souci du R de raffiner, nous soulagerons les douleurs générées durant les chirurgies par des molécules antalgiques les plus adaptées. Nous réduirons le plus possible le stress lié aux tests comportementaux par des phases d'habituation des animaux par l'expérimentateur. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur vie.

4861. La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie le plus souvent liée au tabagisme. En France, la BPCO concerne 4 millions de personnes et elle sera bientôt la 3ème cause de mortalité. Cette maladie se caractérise notamment par une fibrose bronchique et péri-bronchique, associée à un déclin irréversible de la fonction respiratoire. L'évolution chronique de la BPCO est aggravée par des épisodes d'exacerbations, qui participent au remodelage bronchique. Les mécanismes du remodelage sont mal compris et ce processus n'est pas ciblé par les thérapeutiques actuelles. Le but de notre projet est d'évaluer le rôle de la voie de signalisation Hedgehog et celui de l'axe CXCR4-CXCL12 dans le remodelage des voies aériennes dans un modèle de souris BPCO soumis à des exacerbations. Nous cherchons notamment à comprendre le mécanisme à l'origine du recrutement de cellules inflammatoires et de fibrocytes dans le poumon et le rôle de ces cellules dans le remodelage des tissus. Nous espérons que la réalisation de ce projet permettra d'offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de la BPCO. Pour ce faire, 664 souris seront utilisées sur fond génétique sauvage (procédure n°1 et 4). De plus, afin de déterminer plus

précisément le rôle de l'axe CXCR4-CXCL12 et de la voie de signalisation Hedgehog, 936 souris transgéniques seront utilisées (procédure n°2, 3 et 4).

Afin de respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer), les mesures mises en place sont les suivantes :

1) Réduire : se souciant de réduire le nombre des animaux en expérimentation, nous avons calculé le nombre de souris minimal par groupe pour obtenir des résultats significatifs, et nous réaliserons de multiples études ex vivo sur différents organes et selon différentes techniques.

2) Raffiner : pour diminuer la souffrance et l'angoisse des animaux, des dispositifs sont prévus (anesthésie pour les injections et les prélèvements, raffinement des conditions d'hébergement, vérification par le comité sur le bien-être des animaux) et nous avons soigneusement décrit des points limites en relation avec notre protocole (critères de perte de poids, comportement anormal ou difficulté respiratoire).

3) Remplacer : il n'existe pas de modèle in vitro actuellement permettant d'étudier le rôle des fibrocytes dans la BPCO, maladie complexe touchant plusieurs composants (tels que le muscle lisse bronchique, l'épithélium et les cellules inflammatoires) et mettant en jeu plusieurs organes (moelle osseuse, compartiment vasculaire et poumon). Grâce à un modèle de souris BPCO validé dans la littérature et l'utilisation de souris transgéniques et de souris traitées avec des drogues, nous pouvons envisager une meilleure compréhension des phénomènes.

4862. On dénombre environ 6 000 maladies génétiques dans le monde. Leurs causes sont aussi diverses que les symptômes qui en découlent.

Leur point commun : elles sont toutes causées par une anomalie au niveau d'un gène ou d'un chromosome. Les maladies génétiques ont la particularité de pouvoir concerner non seulement la personne atteinte mais aussi sa famille.

Cette anomalie entraîne un défaut de fonctionnement de certaines cellules de l'organisme. L'activité et la structure de chaque protéine est déterminée par l'information génétique contenue dans un gène. Si le gène est altéré, il entraîne dans la cellule un dysfonctionnement, qui peut se révéler, à tout âge de la vie, par l'expression d'une maladie.

Ici, nous avons pour objectif d'étudier et développer une nouvelle approche innovante, la combinaison de CRISPR/Cas9 (= ciseau à ADN : technique de suppression et d'insertion de gènes sur des sites spécifiques) et d'un vecteur de transport innovant. Ce système de thérapie génique, s'il fonctionne efficacement, pourrait à terme être transféré chez l'Homme pour soigner des maladies génétiques.

Notre but sera d'utiliser le système "ciseau à ADN" pour réparer des mutations génétiques héréditaires et corriger localement le phénotype via différentes voies d'injections. Ce système facilitera la suppression de la partie malade du gène en question et permettra ainsi de corriger des mutations connues.

Pour cela, nous allons tester 4 types de vecteurs différents et 5 voies d'administration différentes sur une lignée de souris reportrice connue afin d'évaluer les meilleures conditions expérimentales et la meilleure biodistribution.

Remplacement : Cette approche a pour objectif d'évaluer un protocole de thérapie génique pour traiter certaines maladies génétiques en diminuant le risque d'effets secondaires par l'utilisation de vecteurs spécifiques; ce qui nécessite l'utilisation d'expériences in vivo et ne peut donc pas être remplacée par des expériences in vitro.

Réduction : L'effectif des animaux est réduit au maximum. Un test statistique adapté sera utilisé pour l'analyse des résultats et tenant compte des risques de mortalité. 170 animaux seront nécessaires à l'étude.

Raffinement : Afin de réduire tout stress ou souffrance, toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale. Ainsi, des points limites éthiques seront établis afin d'arrêter les procédures en cas de douleur difficile à traiter à l'aide d'antidouleurs. Bien qu'aucune souffrance particulière ne soit attendue au cours de ce projet.

Dans ce projet, notre objectif est de trouver les meilleures conditions d'administration pour dans un deuxième temps développer une approche innovante pour l'étude de maladies génétiques humaines et trouver à terme des pistes de soin chez l'Homme.

4863. Depuis 2003, le cancer est la principale cause de décès en France dont l'incidence ne cesse d'augmenter. La plupart des chimiothérapies anticancéreuses actuelles présentent une toxicité systémique importante limitant l'augmentation des doses administrées et donc les résultats thérapeutiques. Les nanomédicaments, qui incorporent des molécules médicamenteuses dans des véhicules de taille nanométrique (milliardième de mètre), représentent un espoir important pour le traitement de cette pathologie car ils permettent d'amener la molécule active dans les tissus ou les cellules malades sans altérer les cellules saines.

Dans ce contexte, il a été récemment démontré que l'on peut construire des nanomédicaments très efficaces, après couplage de la gemcitabine (molécule anticancéreuse) au squalène qui est un lipide proche du cholestérol naturellement présent chez l'Homme.

Des résultats obtenus in vitro ont montré que ces nanomédicaments à base de squalène étaient transportés dans le sang par les protéines en charge du transport du cholestérol : les lipoprotéines à faible densité ou LDL (low density lipoprotein en anglais), plus connu sous le nom de mauvais cholestérol.

Les cellules cancéreuses qui sont en division perpétuelle nécessitent un apport accru en cholestérol. Elles sont capables de capter le cholestérol en grande quantité grâce à des capteurs présents à leur surface appelés récepteurs qui ont une forte affinité pour les LDL transportant le cholestérol. On pourrait ainsi tromper la cellule cancéreuse via ces récepteurs qui captent aussi les nanomédicaments de squalène-gemcitabine transportés par les LDL et ainsi amener le principe actif directement dans les tumeurs.

L'objectif de cette étude est de vérifier in vivo l'interaction entre le nanomédicament à base de gemcitabine-squalène et les lipoprotéines et de montrer le rôle des récepteurs aux LDL dans l'accumulation du nanomédicament dans les cellules cancéreuses et dans l'efficacité thérapeutique

Ce nanomédicament pourrait donc représenter une nouvelle stratégie thérapeutique, transposable aux patients, qui utiliseraient les LDL naturellement présents dans l'organisme comme transporteur du nanomédicament jusqu'aux tumeurs en tirant parti du besoin de celle-ci en cholestérol. Cette étude se fera en comparaison avec la gemcitabine sous forme libre pour démontrer la supériorité thérapeutique du nanomédicament.

L'étude sera réalisée chez la souris.

Dans un premier temps, nous allons tester l'efficacité thérapeutique du traitement sur un modèle de cancer du sein humain. Deux groupes d'animaux seront comparés : un groupe nourri avec un régime standard (taux LDL faible) et un groupe nourri avec un régime riche en cholestérol (taux LDL élevé). Le cancer sera induit par une injection de cellules du cancer du sein humain. Le suivi des tumeurs (progression/régression) permettra de mesurer l'efficacité du traitement en fonction du taux de LDL.

Dans un deuxième temps, pour évaluer la biodistribution du nanomédicaments dans l'organisme entier et dans les cellules tumorales une étude sera effectuée en comparant deux modèles tumoraux de cancer du sein humain. Ces deux modèles seront développés en utilisant 2 types de cellules cancéreuses : un qui exprime les récepteurs aux LDL et l'autre pas.

Malgré l'effort constant de développement de méthodes alternatives pour limiter le recours à l'expérimentation sur les animaux, il existe des questions, notamment concernant la biodistribution des médicaments et l'efficacité antitumorale auxquelles il n'est pas possible de répondre autrement que par des études sur des organismes entiers.

Seule une étude chez l'animal permettra d'évaluer l'interaction des nanomédicaments avec les composants du sang et leur passage de la circulation vers les organes.

Les modèles tumoraux chez l'animal permettent de reconstituer la complexité de la tumeur, notamment la vascularisation, chose qui n'est pas encore possible in vitro.

Afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, des études ont été réalisées en amont sur des cultures cellulaires pour montrer le rôle du récepteur au LDL dans l'accumulation des nano-médicaments à base de squalène dans les cellules cancéreuses.

De plus, les études in vitro ont permis le criblage de différentes lignées cellulaires cancéreuses et nous avons identifié deux lignées cellulaires (cellules de cancer du sein) dont l'expression des récepteurs aux LDL est très forte ou négligeable. Seulement ces deux types de cellules seront utilisés in vivo, ce qui permet une réduction du nombre des animaux.

Le nombre d'animaux/groupe a été réduit au maximum grâce à une planification statistique minutieuse qui permettra une interprétation statistique de nos résultats. Les animaux seront anesthésiés pour éliminer la sensation de douleur pendant toute intervention invasive. Afin de réduire la douleur à son minimum, de points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces, seront déterminés.

Pour la réalisation de cette étude nous prévoyons d'utiliser un nombre total de 360 souris.

4864. L'amélioration qualitative et quantitative des apports protéiques dans l'alimentation correspond à une préoccupation majeure en nutrition humaine et animale. L'établissement de recommandations alimentaires concernant la quantité de protéines et d'acides aminés, en particulier de méthionine, à distribuer aux chèvres productrices de lait doit permettre d'améliorer la sécrétion protéique mammaire et d'obtenir des laits dont la teneur en protéines (en particulier en caséines) sera optimisée. Ces recommandations sont à l'heure actuelle bien établies pour les bovins, ovins et caprins, mais elles restent insuffisamment documentées pour les chèvres laitières, en particulier celles sélectionnées génétiquement pour leur capacité à produire des laits enrichis en caséines.

En conséquence, l'objectif principal de ce projet est de caractériser la production et la composition du lait de chèvres qui seront alimentées avec des rations présentant différents teneurs en protéines. La qualité nutritionnelle des laits obtenus suite à l'ingestion d'aliments contenant différentes doses de méthionine protégée de la dégradation ruminale chez la chèvre de race alpine sera également analysée. Les conséquences potentiellement positives de l'apport de méthionine sur le statut oxydo-réducteur (statut dont l'équilibre influe sur un grand nombre de fonctions cellulaires) des chèvres seront également étudiées.

La durée du projet est de 3 ans et comporte 3 essais successifs d'une durée maximale de 11 semaines chacun, incluant une phase d'alimentation collective et une phase d'alimentation individuelle. Un effectif total de 48 chèvres de race alpine est utilisé à raison de 16 chèvres pour chaque essai annuel.

- Réduction : Les chèvres feront l'objet d'un suivi longitudinal pour chacun des essais, ce qui contribue à réduire les effectifs impliqués. Par ailleurs, le nombre d'animaux par lot a été calculé pour tenir compte de la variabilité inter-chèvre pour la sécrétion protéique et de la réponse attendue au traitement, afin de minimiser ce nombre par lot de traitement. Enfin, les traitements expérimentaux n'étant pas de nature à impacter la santé et le bien-être des chèvres, celles-ci pourront être utilisées pour les trois essais successifs. Ce chiffre de 16 chèvres par essai représente le nombre minimal d'animaux déterminé d'après nos expériences antérieures permettant d'obtenir une puissance statistique satisfaisante.

- Remplacement : le projet concerne des réponses de production laitière et de composition du lait à des variations de composition de régimes alimentaires; il ne peut donc être réalisé que sur des animaux. Aucune méthode alternative ne peut être envisageable.

- Raffinement. Les procédures utilisées sont parfaitement maîtrisées par le personnel expérimenté de notre laboratoire et sont élaborées pour minimiser l'inconfort ou la douleur chez l'animal.

Les procédures utilisées consistent

- 1) à fournir une alimentation individualisée en cage au sol de taille réglementaire. La mesure précise des quantités d'aliments par chèvre permet de caractériser de façon non biaisée l'efficacité du transfert de la méthionine ingérée dans les protéines laitières. La proximité des animaux dans leur case individuelle permet l'expression partielle de comportements sociaux (vue, contact..) avec les autres chèvres. Ces chèvres sortent 2 fois par jour pour la traite, permettant une expression plus complète

de leur comportement. Durant cette phase d'alimentation individuelle, l'observation quotidienne des animaux permet de détecter d'éventuels comportements anormaux, qui nécessiteraient le retrait des chèvres de l'essai. L'observation individuelle quotidienne de l'état des animaux (blessures, problèmes de pattes ...etc.) complète les mesures visant à prévenir toute souffrance. En cas de problème, les chèvres seront sorties de l'essai, mise à l'écart pendant 48 h jusqu'au retour à la normale puis réintroduites dans le troupeau (alimentation collective).

2) A effectuer des prélèvements sanguins sur ces chèvres pour la détermination des paramètres plasmatiques énergétiques et du statut oxydo-réducteur. Les chèvres du troupeau expérimental sont habituées à la contention précédant les prélèvements de sang; ces derniers s'effectuent avec des aiguilles fines et des tubes de prélèvement qui minimisent le temps de prélèvement, limitant ainsi la durée de cette procédure.

4865. Les traitements endodontiques, c'est-à-dire le retrait de la pulpe dentaire dans le cadre de traitement des maladies de la pulpe et du péri-apex, présentent un risque d'inflammation et peuvent être douloureux pour le patient dans certains cas. En effet, plusieurs études ont rapporté des douleurs post-opératoires après un traitement endodontique dans 25 à 40 % des cas. Ainsi, des ciments canalaires contenant et diffusant de l'hydrocortisone au niveau de l'apex de la dent sont indiqués pour soulager le patient et diminuer l'inflammation. L'hydrocortisone est une hormone stéroïdienne (corticostéroïde) sécrétée par la zone fasciculée du cortex de la glande surrénale à partir du cholestérol. Elle permet, entre autres, d'inhiber certaines réponses du système immunitaire tel que les processus inflammatoires. Une étude préliminaire *in vitro* démontre que l'Endométhasone N, un ciment canalair contenant 1% d'hydrocortisone, a un effet anti-inflammatoire sur des cellules endothéliales. De plus, il a aussi été démontré *in vitro* que l'Endométhasone N relargue de l'hydrocortisone. Cependant aucune étude n'a montré cette diffusion à travers l'apex de la dent et les tissus *in vivo*. Ainsi, le but du projet est de quantifier la dose d'hydrocortisone relarguée par l'Endométhasone N, dans un modèle animal *in vivo* représentatif de l'apex de la dent.

La complexité de la diffusion à travers l'apex de la dent et les tissus avoisinant ne peut être mimée *in vitro* ou *in silico*. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives à une étude *in vivo*. L'utilisation du rongeur est justifiée du fait des publications existantes sur ce modèle dans différents champs thérapeutiques dentaires tels que des études de régénération de la pulpe dentaire.

Cette étude sera réalisée chez la souris SWISS par implantation sous-cutanée bilatérale d'une racine dentaire humaine obturée avec de l'Endométhasone N dont l'hydrocortisone sera préalablement radiomarquée avec un isotope de très faible énergie (Tritium) afin de la tracer et la quantifier dans différents tissus d'intérêt. La radioactivité administrée ne présente aucun effet nocif pour la santé de l'animal.

L'évaluation de la diffusion de l'hydrocortisone sera réalisée à 4 différents temps sur une période de 48 heures post-implantation, période similaire à une situation clinique (le relargage du produit doit se produire jusqu'à 48 heures). Ainsi quatre groupes (2h, 8h, 24h et 48h) seront étudiés avec 6 animaux par groupe. L'élimination urinaire de l'hydrocortisone radiomarquée sera également évaluée sur 48 heures.

Un groupe contrôle constitué de 6 animaux sera également intégré à l'étude : il consistera à implanter bilatéralement en sous-cutanée une tubulure en silicone de 1-1.5 cm de long ouverte sur ses 2 extrémités et contenant une quantité de ciment canalair similaire à celle qui sera présente dans les racines dentaires humaines. Ce groupe aura pour objectif de déterminer le niveau maximal de diffusion de l'hydrocortisone radiomarquée et de valider ce modèle *in vivo* d'implantation ectopique sous-cutanée. La diffusion de l'hydrocortisone sera évaluée à 8h après implantation, période au cours de laquelle la diffusion est la plus importante d'après les différentes études menées *in vitro*.

Ainsi le nombre total d'animaux nécessaires à cette étude sera de 30 souris SWISS.

L'ensemble de ces expérimentations *in vivo* respecte la règle des 3R comme mentionnée dans la Directive Européenne 2010/63/EU. En effet les procédures utilisées ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par des méthodes alternatives *in vitro* (la complexité de diffusion à travers l'apex de la dent et les tissus ne peut pas être mimée *in vitro* ou *in silico*). De plus cette étude de diffusion *in vivo* a été demandée par un organisme de certification dans le domaine médicale/santé. Afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, deux racines seront implantées par animal et 6 animaux par groupe seront nécessaires à l'obtention de résultats pertinents et statistiquement exploitables (ainsi pour chaque temps d'analyse, la diffusion de l'hydrocortisone sera évaluée sur 12 racines).

Le respect du bien-être animal passe par des conditions d'hébergement adéquates, un suivi quotidien des animaux, des méthodes utilisées visant à réduire le plus possible toute forme de douleur, de souffrance ou stress de l'animal (mise en place d'un protocole analgésique à base de buprénorphine) ainsi que l'instauration de points limites pertinents et précoces. Enfin les milieux d'hébergement sont enrichis avec des tunnels et du papier accordéon pour faciliter la nidation.

4866. Les éléphants de mer austraux (*Mirounga leonina*) au cours de leur cycle de vie sont soumis à des périodes de recherche alimentaire en mer avec des périodes de jeûne à terre sur leur colonie, où ils viennent se reproduire ou muer. Lors de la mue, une phase coûteuse en énergie, les éléphants de mer sont observés en groupes, les individus étant plus ou moins agrégés densément selon les conditions climatiques locales. Cependant, ce comportement et les bénéfices associés n'ont encore jamais été étudiés chez les éléphants de mer. Nous supposons que les agrégations plus ou moins denses des éléphants de mer au cours de leur mue pourraient être influencées par leur condition corporelle ainsi que les contraintes climatiques. Nos principaux objectifs sont ainsi de déterminer 1) comment se comportent les éléphants de mer pendant la mue et 2) comment ils font face au stress énergétique de la mue en fonction de leurs agrégations. Cette étude nous permettra de mieux comprendre comment et à quel point les organismes sont capables de s'adapter, à travers des réponses comportementales et physiologiques, à leurs contraintes environnementales.

Ce projet regroupe 3 procédures qui seront mises en place lors de 3 années successives, qui nous permettront de capturer et d'équiper des individus en phase de mue, ceux-ci étant laissés en liberté sur leur colonie, libres de leurs mouvements. Les individus suivis seront observés et les appareils enregistreurs dont ils seront équipés nous permettront de recueillir des données physiologiques. Les appareils seront récupérés au bout de 20 jours, à la fin de la mue des individus. Cet échantillon de 120 individus (prévus pour 3 procédures pour 3 ans) nous permettra de mieux comprendre la relation entre les groupements et leur impact énergétique sur les individus en fonction de leur stade de mue et des conditions environnementales. Les individus choisis seront des femelles (adultes ou jeunes), celles-ci ayant été mieux étudiées auparavant et plus facilement manipulables. Ce nombre est indispensable pour corriger les variations entre les animaux et la perte de données. Pour ce genre d'études de la physiologie et du comportement des animaux dans leur milieu naturel, les animaux ne peuvent être remplacés par d'autre matériel d'étude.

Le désagrément provoqué chez les animaux est aussi réduit que possible car le personnel de terrain effectuant les captures et recaptures est formé pour la contention et la manipulation, qui ne posent aucun problème particulier et ne semblent pas provoquer de manifestation d'inconfort chez les animaux. Les individus, après la capture, sont anesthésiés pour une courte durée. Aucun signe de dérangement des animaux n'a été noté au cours des sessions précédentes. Les animaux étant à terre, en mue, l'équipement posé sur la tête ou le haut du dos ne leur pose pas de problème pour se déplacer. En fonction des conditions de terrain (conditions climatiques, personnel disponible, animaux disponibles en début de mue), le nombre d'individus équipés pourra être inférieur. Les données seront analysées au retour de la campagne de terrain, après déséquipement des appareils enregistreurs récupérés sur les animaux.

Cette demande fait suite aux demandes d'autorisation de projet déposées en 2014 et 2015.

4867. Les maladies transmises par les tiques, actuellement en pleine émergence, sont très nombreuses, provoquent une morbidité et une mortalité très importantes à travers le monde, et concernent à la fois les animaux et les hommes. A présent, la lutte contre les tiques est essentiellement basée sur l'utilisation d'acaricides qui, outre le fait d'atteindre la faune non cible, sont polluants pour l'environnement et pour les produits issus de l'élevage, et génèrent des résistances chez les tiques.

Identifier de nouvelles méthodes de lutte contre les tiques représente donc une urgence à l'heure actuelle. L'objectif du présent projet est de valider, chez le mouton, des candidats vaccinaux (au nombre de 5 dans un premier temps) identifiés chez *Ixodes ricinus* comme étant impliqués dans la transmission de bactéries et dont l'innocuité et l'immunogénicité ont d'ores et déjà été validées dans le modèle souris. Trois formulations de ces candidats sont prévues. Les différentes formulations vaccinales seront administrées à l'animal de laboratoire afin d'évaluer 1) les réponses immunitaires, 2) l'impact de la vaccination sur le gorgement de tiques (prise du repas de sang des tiques sur les animaux en expérimentation) maintenues en élevage et 3) la transmission d'agents pathogènes (*Anaplasma sp.*).

Trois moutons seront utilisés par candidat et par formulation -soit 45 moutons au total-, auxquels sont rajoutés 3 moutons contrôle n'ayant reçu que l'adjuvant pour chaque expérimentation. Ainsi, si un candidat est évalué à la fois cela représentera un nombre total et maximum de 60 moutons (5X 12 moutons) pour les 5 années du projet si tous les candidats et formulations sont testés.

La bonne tolérance des substances biologiques administrées (antigènes, vecteur recombinant, adjuvant) est documentée et validée dans le modèle souris. Seule une réaction de type inflammatoire peut survenir localement au site d'injection, le gorgement de tiques n'induit qu'une douleur modérée. Il n'y a donc pas de point limite à définir. Cependant différents événements indésirables peuvent survenir comme : (1) s'il s'avérait qu'un animal se trouve en état de choc anaphylactique due aux piqûres de tiques, ou (2) qu'un animal s'automutile; dans ce cas cet animal serait euthanasié pour pallier à sa souffrance. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet permettront d'une part d'augmenter les connaissances sur les modalités du gorgement des tiques et de la transmission d'agents pathogènes par ces dernières ; et d'autre part d'identifier des candidats vaccinaux permettant de lutter contre *I. ricinus*, qui représente, en Europe, le premier vecteur d'agents pathogènes responsables de maladies à la fois chez l'Homme et l'animal.

4868. La présence de macrophages (Mphs) dans de nombreux cancers est un facteur de mauvais pronostic. L'infiltration tissulaire des macrophages associés aux tumeurs (TAMs) est telle qu'ils peuvent représenter jusqu'à 50% des cellules dans une tumeur. Alors que les lymphocytes associés aux tumeurs jouent un rôle anti-tumoral, les TAMs favorisent la croissance tumorale, la néoangiogénèse et le développement de métastases. Ainsi, le contrôle spécifique de l'infiltration tissulaire des Mphs est devenu une stratégie thérapeutique anti-cancéreuse très prometteuse mais leur mode migratoire in vivo reste très peu connu.

Dans des études précédentes, nous avons montré dans des matrices extracellulaires puis dans des modèles de sphéroïdes de cellules tumorales que les macrophages sont les seuls leucocytes à adopter 2 modes migratoires distincts dans des environnements 3D in vitro: le mode mésenchymateux et le mode amiboïde. En utilisant deux techniques: ex vivo la co-culture de Mphs avec des explants tissulaires, et in vivo une technique de microscopie intravital, nous avons confirmé l'existence de ces deux modes migratoires des Mphs in vivo chez la souris.

Les deux modes de migration sont inhibables par des molécules pharmacologiques différentes. Aussi, pour contrôler efficacement l'infiltration tissulaire des TAM en utilisant des inhibiteurs adaptés, il faut pouvoir au préalable déterminer quel mode migratoire ils utilisent dans une tumeur donnée.

Nous avons démontré dans un modèle de fibrosarcome sous cutané chez la souris, que les TAMs utilisent la migration mésenchymateuse (MM) alors que dans le tissu péri-tumoral ou dans le derme inflammé, les Mphs non tumoraux utilisent la migration amiboïde (MA).

Notre projet propose de poursuivre cette étude et de répondre à 3 questions majeures qui nécessitent l'utilisation d'animaux vivants :

- 1) La MM des TAMs observée dans le fibrosarcome sous-cutané est-elle restreinte à ce modèle ou bien s'applique-t-elle à d'autres types de tumeurs ?
- 2) La déplétion d'effecteurs spécifiques de la MM dans les Mphs, diminue-t-elle l'infiltration des Mphs dans des explants de tumeur ex vivo ?
- 3) Le choix du mode migratoire des Mphs dans les tumeurs est-il corrélé aux propriétés mécaniques des tissus comme cela a été montré in vitro ?

Pour répondre à ces questions, nous avons choisi comme modèle animal la souris pour plusieurs raisons:

-des études antérieures réalisées chez la souris en cancérologie ont abouti à la validation de cibles thérapeutiques utilisées par la suite dans des essais thérapeutiques chez l'homme

-la plupart des lignées tumorales disponibles sont des lignées murines.

Nous utiliserons 2 souches de souris: pour les expériences de microscopie intravitale des souris MacBlue dont les macrophages sont fluorescents (élevage maintenu dans notre laboratoire) et pour les expériences ex vivo, de souris C57/B6 achetées chez des fournisseurs agréés.

Compte tenu de la complexité de nos expériences (risques opératoires, anesthésies répétées sur un même animal pour les expériences in vivo, variabilité dans la "prise" de la tumeur chez l'animal et de la qualité des macrophages humains préparés à partir de « buffy coat » de donneurs sains provenant de l'EFS pour les expériences ex vivo, niveau d'extinction des effecteurs dans les macrophages par SiRNA, ...), de la nécessité de pouvoir appliquer un test statistique pour vérifier la significativité de nos résultats, et des données publiées dans la littérature sur ce type d'expériences, il nous faudra des résultats validés sur un minimum de 6 souris par condition expérimentale. Aussi, nous avons estimé qu'un nombre initial de 10 souris par condition testée est nécessaire. Ce nombre pourra être revu à la baisse si le pourcentage de réussite de nos expériences est supérieur à ce que nous avons anticipé.

Expériences in vivo : pour répondre à la première question: nous devons tester un minimum de 6 lignées tumorales ayant des origines cellulaires différentes (tumeur du poumon, de la prostate, du colon, du pancréas, glioblastome et tumeur mammaire) afin de pouvoir conclure si les TAMs utilisent ou pas toujours le même mode migratoire.

Pour réaliser l'ensemble de ces expériences, nous aurons besoin de 120 souris

Expériences ex vivo : pour compléter notre réponse à la question 1, nous déterminerons ex vivo si les macrophages humains, comme les macrophages murins utilisent la MM pour infiltrer les différents types de tumeurs. Pour cela nous nécessiterons 60 souris.

Pour répondre à la question 2, nous aurons besoins 150 animaux. En effet, sur la base de résultats préliminaires, nous avons sélectionné 15 effecteurs pertinents dont nous souhaitons étudier le rôle dans la migration tissulaire des TAMs. 10 souris par effecteur seront nécessaires pour pouvoir conclure quant à son implication dans la migration des TAMs

Pour répondre à la question 3, nous nécessiterons 70 souris pour mesurer les propriétés mécaniques des tissus tumoraux sur les 6 modèles de tumeurs décrits ci-dessus et le fibrosarcome utilisé dans nos travaux préliminaires et qui nous servira de référence.

Expériences préliminaires:

Nous prévoyons par ailleurs, 20 souris sur lesquelles nous ferons des tests pour optimiser la génération des tumeurs sous-cutanées avec nos différentes lignées avant d'initier nos expériences in vivo et ex vivo.

Nous utiliserons 300 souris C57B6 et 120 souris Mac Blue; un suivi quotidien sera réalisé par le zootechnicien en charge des souris et/ou par la personne en charge de l'expérimentation. Les souris ont de l'eau et de la nourriture à volonté, et un tube de coton par cage comme enrichissement du milieu, les souris C57B16 sont hébergées par groupe alors que les Mac Blue après pose de la chambre sont une par cage, le port de la chambre ne pose aucun problème à la souris pour se nourrir, s'abreuver ou se mouvoir dans sa cage

4869. La chimioréception, capacité de détecter et différencier certains produits chimiques dans l'environnement, est très développée chez le poisson. En effet, les poissons possèdent un système olfactif constitué d'un épithélium olfactif (la rosette) composé de nombreuses cellules réceptrices reliées au bulbe olfactif par le nerf olfactif. Les cellules réceptrices sont des neurones bipolaires qui sont en contact direct avec l'environnement. Ainsi, les comportements d'évitement des prédateurs, de reproduction et de dominance impliquent tous l'olfaction. L'exemple le plus parlant est la capacité des salmonidés à localiser le cours d'eau dans lequel ils ont éclos en utilisant leur odorat.

Les études engagées dans ce projet vont utiliser cette faculté des poissons à détecter à des concentrations infimes, des substances présentes dans le milieu pouvant avoir des effets répulsifs ou attractants.

Le caractère précoce de la réponse, attraction ou évitement, et les conditions d'exposition des poissons visant à limiter au maximum le stress pour être le plus représentatif des conditions naturelles, permet l'utilisation d'un même individu sur plusieurs tests après une phase de repos. Ceci permet de réduire le nombre d'animaux utilisé tout en ayant un jeu de données statistiquement exploitable. Dans le cas de poissons prélevés en milieu naturel et non exposés à des substances xénobiotiques, il est également possible de réintroduire ceux-ci dans le milieu après les tests.

Pour les essais d'évitement, le nombre de poisson utilisé est d'environ 30. Pour les essais d'attraction, le nombre de poissons est au minimum de 60. Le nombre maximal de poisson utilisé dans cette procédure sur une durée de 5 ans est 7800.

Concernant le raffinement, le déroulement même cette procédure vise à réduire la souffrance des organismes testés, le paramètre observé étant un comportement, tout stress ou douleur engendré pourrait impacter les résultats.

4870. Les fonctions du système nerveux central sont principalement expliquées par le rôle prépondérant que jouent les neurones. Ainsi les états de vigilances sont dus aux changements de l'activité neuronale. Bien que de nombreuses avancées dans le domaine aient été réalisées, la nécessité des changements d'activité neuronale qui se produisent lors des différentes phases du sommeil reste peu comprise. Il ressort pourtant que le besoin vital de dormir met en jeu des mécanismes permettant au système de se « réinitialisé ». Il est probable qu'outre les neurones, les cellules de soutien des neurones, les cellules gliales, participent à la remise à zéro du système. La contribution des cellules gliales est pourtant peu étudiée. Le but de ce projet est de déterminer le rôle des cellules gliales dans les différents états de vigilance. Nous étudierons ces cellules sur un modèle de souris transgénique. Les mouvements des prolongements de certaines cellules gliales seront étudiés par microscopie sur des animaux vigiles habitués à la contention. L'étude des mouvements des cellules gliales nous permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires qui se produisent durant les phases de sommeil et ainsi de mieux comprendre la nécessité du sommeil dans les mécanismes de mémorisation.

Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R. Nous veillerons à limiter le mal être des animaux en raffinant notre procédé de contention et en réalisant des habituations de nos souris à la manipulation. Le nombre d'animaux utilisés sera restreint au maximum (55 souris).

Ce type d'étude se faisait jusqu'à présent essentiellement sur des modèles primate non-humains. Avec cette approche nous voulons tirer parti des avantages qu'apporte la souris (les modèles génétiques) pour améliorer notre compréhension des mécanismes de mémorisations mis en jeu durant les cycles veille/sommeil et des interactions cellulaires qui les sous-tendent. Les résultats obtenus dans cette étude permettront d'identifier de nouvelles cibles cellulaires et moléculaires impliquées dans les pathologies du sommeil et de la mémoire.

4871. La qualité des écosystèmes et leur préservation est en lien directe avec la santé. Dans ce cadre, il est important d'établir des diagnostics de l'état de ces écosystèmes et également de prédire l'impact potentiel des activités anthropiques sur ces écosystèmes. La toxicité des effluents, des produits chimiques, des phytosanitaires et biocides ou des substances sur les écosystèmes aquatiques est évaluée en utilisant différents modèles biologiques comme des bactéries, des végétaux, des invertébrés et des poissons. Les effets recherchés peuvent être aigus (mort) ou chroniques (croissance, développement larvaire). Ces essais rentrent dans le cadre de nombreuses réglementations (CLP, REACH, directive biocide, directive phytosanitaire) et permettent d'évaluer les risques pour l'environnement. Cette étude correspond à l'évaluation de la toxicité aiguë sur une durée de 96h sur les poissons en suivant la ligne directrice OCDE 203 ou une méthode équivalente. Dans le cadre de ces essais, un test complet nécessite 57 poissons. Dans le cadre de cette procédure, le nombre maximal de poissons utilisés sera de 20000 sur 5 ans.

Dans un but de réduction du nombre d'animaux utilisés, l'approche par seuil préconisée par l'OCDE (Series on Testing and Assessment No. 126 : SHORT GUIDANCE ON THE THRESHOLD APPROACH FOR ACUTE FISH TOXICITY) sera utilisée quand cette étude est groupée avec des essais sur invertébrés permettant de limiter le nombre de poisson à 20 par étude. Si cette étude n'est pas imposée par une réglementation, l'essai OCDE 203 sera substitué par l'essai OCDE 236 sur les œufs.

Dans un contexte de raffinement, le stress infligé aux poissons sera limité au maximum par des conditions environnementales optimales (volume d'eau, température, luminosité, alimentation) pour chaque espèce. Les poissons seront également utilisés à la fin des essais, après euthanasie, en biologie moléculaire pour la recherche de biomarqueurs ou en imagerie MALDI pour déterminer la localisation et les mécanismes d'actions des substances testées.

4872. Nous développons des dispositifs chirurgicaux permettant de prélever du tissu sans dommages pour mieux comprendre les pathologies cérébrales. La technique repose sur l'utilisation de surfaces innovantes qui sont exposées au contact du tissu nerveux et y captent du tissu. Le principe est équivalent à celui d'une biopsie mais le geste est moins lésionnel puisque le tissu est prélevé par contact et non par section, comme c'est le cas pour une biopsie conventionnelle. Ceci rend possible la réalisation de prélèvements dans des régions cérébrales où une biopsie ne pourrait être envisagée.

Un essai clinique multicentrique est en cours et permet de démontrer la sécurité du dispositif chirurgical chez des patients atteints de tumeurs cérébrales. L'étape suivante est de confirmer l'efficacité du dispositif au travers de sa capacité à donner une information de valeur diagnostique/pronostique. Nous avons développé pour cela des systèmes dédiés de recueil et d'analyse qui permettront de bénéficier de kits contenant le dispositif chirurgical associé aux périphériques d'analyse moléculaire permettant d'établir un diagnostic. Ce projet concerne la validation des systèmes de recueil et d'analyse qui viennent compléter le dispositif chirurgical.

Dans ce contexte, il est nécessaire de valider la performance des systèmes de recueil & d'analyse avant de les déployer dans des conditions d'évaluation clinique. Il s'agit de pouvoir réaliser des empreintes tissulaires sur tissus frais et de simuler l'ensemble de la procédure en réalisant 4 types d'analyses différents: extraction d'ADN, D'ARN, de protéines et analyse directe par immunohistochimie. Ceci permettra de vérifier le bon fonctionnement des systèmes de recueil et d'établir des statistiques sur la quantité d'ARN, d'ADN ou de protéines collectée par cette méthode. Cette validation technique est un pré requis indispensable pour valider l'utilisation de notre système dans le contexte clinique.

Pour mener à bien cette étude, nous avons besoin de collecter 120 échantillons à l'aide du dispositif chirurgical, ce qui correspond à l'utilisation de 60 rats. Aucun modèle alternatif ne permet à ce jour de ne pas recourir à l'utilisation d'animaux dans la mesure où les analyses doivent être conduites sur des cerveaux frais. Chaque animal est utilisé pour obtenir deux prélèvements dans le but de réduire le nombre d'animaux impliqués. Tout est fait pour garantir le bien être de l'animal au long de l'expérience, notamment par le choix de critères objectifs d'évaluation ce dernier.

4873. Notre projet a pour objectif la réalisation d'un modèle de dépigmentation cutanée secondaire à une inflammation induite par des messagers inflammatoires appelés cytokines. Le processus de dépigmentation (perte de couleur de la peau) peut être dû à une anomalie de la fonction ou la disparition de cellules de la peau responsables de la pigmentation : les mélanocytes.

Dans ce modèle d'étude, nous tenterons de reproduire une dépigmentation survenant dans un contexte inflammatoire par l'injection dans la peau de la queue des souris de cytokines responsables d'inflammation cutanée afin d'étudier leur rôle dans le processus de dépigmentation. Nous étudierons quel est le mécanisme de la dépigmentation : altération de la fonction et/ou disparition des mélanocytes de la peau et testerons des traitements (utilisés à des doses non nocives) pouvant bloquer cet effet afin de restaurer la pigmentation.

Nous utiliserons le minimum d'animaux nécessaire pour réaliser notre projet. Toutes les démonstrations ne nécessitant pas impérativement une expérimentation animale seront réalisées *in vitro*. 210 souris seront nécessaires pour la réalisation de l'ensemble de ce projet. Dans le respect de la règle des 3R, nous utiliserons le nombre minimal d'animaux afin d'obtenir des analyses comparatives et statistiques suffisantes à la démonstration de l'effet dépigmentant des cytokines étudiées. Des mesures de surveillance seront réalisées par les intervenants et le personnel de l'animalerie afin de s'assurer que tout au long du projet, les animaux sont en bonne santé, sans comportement anormal ni signe de souffrance. Les animaux seront évalués quotidiennement par le personnel qualifié et compétent qui sera en charge de leur soin et leur hébergement. Tout problème concernant l'état de santé des animaux sera communiqué à l'expérimentateur qui prendra la décision de mettre à mort sur des critères objectifs en cas de souffrance (selon points limites sont décrits dans l'item approprié). Les souris seront hébergées à raison de 5 souris / cage dans un environnement propice à leur bien-être (litière en copeaux de peuplier, tunnels en polycarbonate).

4874. *Candida albicans* est une levure commensale digestive. En cas de rupture de l'équilibre hôte-levure-microbiote, *Candida* envahit la muqueuse digestive, la traverse provoquant candidémies (« infections du sang ») et candidoses disséminées (touchant plusieurs organes tels le rein, le foie et le cerveau).

Candida existe sous différentes formes (levure, filament, pseudohyphes, biofilm) lui permettant d'échapper aux défenses de son hôte et des facteurs de virulence influençant l'invasion et la toxicité fongiques. Lors des différentes étapes de la colonisation puis au cours de l'infection, ses formes et facteurs s'expriment différemment. Des modèles cellulaires ont permis d'améliorer nos connaissances sur ces mécanismes. Celles-ci restent cependant parcellaires omettant les interactions *Candida* – cellules de l'hôte – microbiote et environnement physico-chimique impossible à reproduire *in vitro*. Le présent projet a, pour objectif original, l'étude des gènes de *Candida* (transcriptome) entrant en jeu au cours des différentes étapes de la septicémie, c'est à dire lors de la colonisation du tube digestif, de son envahissement induit par antibiothérapie et puis lors d'une dissémination provoquée par immunodépression. La finalité est de trouver des cibles thérapeutiques pouvant prévenir ou traiter les candidoses profondes à fort taux de mortalité.

Seize souris Crl:CD1 femelles seront utilisées ; espèce couramment utilisée comme modèle de colonisation digestive fongique, obtenue par supplémentation de la nourriture. Ce modèle est utilisé au laboratoire confirmant l'innocuité du traitement. Post antibiothérapie, la colonisation fongique digestive n'entraîne pas de souffrance. L'immunodépression induite entraîne un passage des levures du tube digestif dans la circulation sanguine. Les souris font l'objet d'une surveillance biquotidienne et tout animal présentant un état clinique altéré est euthanasié et autopsié.

L'expérience sera réalisée en deux fois (deux fois huit souris); ainsi, la compilation des résultats générés permettra une analyse statistique robuste.

Les observations des études d'interactions de *Candida* et environnement complexe digestif (avec toute la flore) ne peuvent être conduites que dans un modèle *in vivo*.

4875. Le recours à des mammifères modèles, souris ou rats de laboratoire, a permis de générer de nombreuses données sur les processus complexes qui sous-tendent la production et le renouvellement des cellules sanguines quels que soient les lignages étudiés : globules rouges, granulocytes, monocytes, plaquettes ou lymphocytes.

Pour la majorité des lignages, avant et après la naissance, c'est respectivement au niveau du foie fœtal puis de la moelle osseuse que des cellules souches hématopoïétiques, se différencient en cellules pro-génitrices de lignage contribuant progressivement au renouvellement de la descendance des différents lignages des cellules sanguines circulantes.

La prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques sont sous le contrôle de mécanismes de régulation qui sont probablement différents entre le foie fœtal et la moelle osseuse et sont encore mal connus. L'objectif de ce projet est d'identifier les facteurs de régulation dans ces deux tissus et de les comparer.

Ces mécanismes mettent en jeu des interactions complexes entre différents types cellulaires et leur environnement qui ne peuvent pas être entièrement étudiés *in vitro*. Le recours à un organisme vivant est donc indispensable. La souris est, dans ce cas, une bonne espèce modèle en raison de sa grande proximité avec l'homme pour ces mécanismes et en raison de l'existence de lignées génétiquement modifiées pour certains gènes qui jouent très probablement un rôle dans la production des cellules sanguines.

Ce projet comporte une seule procédure expérimentale qui consiste à purifier des cellules progénitrices des lignages hématopoïétiques provenant de foie fœtal ou de moelle osseuse de souris jeunes provenant de différentes lignées, et à les injecter dans des souris réceptrices adultes préalablement irradiées, pour étudier la capacité de ces cellules à reconstituer une moelle osseuse. Cette procédure induira des dommages modérés aux animaux en raison des conséquences délétères possibles lors de la période d'aplasie transitoire. Les animaux seront contrôlés au minimum 3 fois par semaine pour détecter tout signe d'inconfort (posture indicatrice de souffrance; texture de poil non soignée; activité réduite; perte de poids). Au cas où est noté un inconfort

progressif pour un animal (par exemple : perte progressive d'activité ; posture anormale ; perte de poids >15%), il sera mis à mort de façon anticipée.

Au total, 200 souris seront utilisées au cours des 5 années du projet. Ce nombre a été estimé au plus juste pour assurer la validité des expériences

4876. Le but de notre équipe est de créer et/ou de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines (myopathies) et de tester l'éventuelle amélioration du phénotype grâce à différentes approches thérapeutiques. Notre travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles. Pour comprendre comment les mutations génétiques sont responsables de ces pathologies, nous avons dans un premier temps utilisé des modèles cellulaires. Nous planifions maintenant d'utiliser des souris pour comprendre à la fois la physiologie et la pathophysiologie *in vivo*. Dans le but de mieux comprendre les fonctions des protéines impliquées dans ces pathologies et leurs interactions, nous prévoyons d'utiliser 9 modèles murins pour les myopathies congénitales (et 1 lignée de souris WT). L'utilisation de souris est indispensable pour comprendre la physiopathologie *in vivo*.

Ainsi, les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines chez les souris, et de mieux comprendre leur développement. Les souris seront analysées *in vivo* / *in situ* / *in vitro* et les tissus seront prélevés pour des expériences *in vitro* ultérieures (REPLACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum une /jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 15 souris / groupe seront utilisées pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité scientifique de l'étude. Afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, les souris seront surveillées quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront retirés de l'étude, prématurément si nécessaire) (RAFFINEMENT).

Un maximum de 4800 souris sera utilisé.

4877. A partir d'une approche complètement novatrice dans le domaine de l'aquaculture (Ethnobotanique), ce projet se propose les objectifs suivants :

- Promouvoir l'usage raisonné de la biodiversité végétale pour une pharmacopée aquacole durable.
- Valoriser et valider scientifiquement les connaissances traditionnelles des pisciculteurs d'Asie du Sud-Est qui peuvent être une alternative aux antibiotiques.
- Régionaliser les recherches pour la phytothérapie en aquaculture en Europe avec la création d'un réseau scientifique élargis aux autres pays de la région (Italie, Lituanie...).

Pour le projet actuel, des expérimentations seront conduites en France, avec pour objectifs de favoriser la mise au point méthodologique et de confirmer les résultats obtenus au Sud.

Une dizaine de plantes et associations de plantes seront testées pendant ce projet pour leur effet sur les paramètres de l'immunité des poissons et pour leur effet protecteur lors d'infections expérimentales des animaux. La toxicité éventuelle des plantes pour les poissons sera également testée. Les plantes testées seront dans un premier temps présélectionnées pour leur effet bactéricide ou bactériostatique lors de tests *In vitro* (Remplacement).

Les poissons utilisés (*Oreochromis niloticus*, *Pangasianodon hypophthalmus*) sont nés et habitués à évoluer dans un milieu d'élevage, à fréquenter l'homme. Le comportement social grégaire des juvéniles est favorisé par des densités d'élevage adaptées. Le milieu est enrichi par des dispositifs spécifiques (Raffinement). Les plans d'expérimentation utilisés permettent d'obtenir des résultats exploitables avec un minimum d'individus (Réduction).

Le nombre total d'individus nécessaires sera de 7180 *Oreochromis niloticus* + 7180 *Pangasianodon hypophthalmus*

4878. Nous développons des approches de médecine régénérative pour traiter les maladies sévères du foie avec des hépatocytes.

La greffe de foie est le traitement reconnu pour de nombreuses maladies du foie au stade terminal mais, il y a pénurie de foies donateurs. La transplantation d'hépatocytes isolés de foies donateurs est une alternative prometteuse à la greffe de foie. Cependant, elle est limitée par cette même pénurie croissante d'organes donateurs et par l'incapacité à amplifier les hépatocytes *in vitro*.

Pour pallier ces difficultés, un nouveau concept thérapeutique a émergé visant à utiliser des cellules souches pluripotentes (CSP) induites (hiPS) et embryonnaires (hES) humaines comme une source illimitée de cellules du corps, notamment les hépatocytes. En effet, la multiplication et la transformation des CSPs en hépatocytes peuvent être contrôlées et obtenus en laboratoire. C'est sur ces propriétés que reposent les espoirs en termes d'applications biomédicales : constituer un réservoir renouvelable de cellules pour réparer les organes malades. Les hépatocytes issus des CSPs (pStemHep) sont capables de se greffer dans le foie et de guérir des animaux immunodéficients atteints d'une insuffisance hépatique aigüe (IHA) par un composé hépatotoxique. Le foie a une capacité extraordinaire de régénérer spontanément à partir des hépatocytes matures résidents. Ainsi, dans le cadre du traitement des IHA, l'idée est de soutenir transitoirement le métabolisme hépatique pendant la phase critique de régénération de la masse hépatique minimale vitale. Une fois cette phase franchie, le foie assurera lui-même la survie et le rétablissement de l'animal. Lorsque l'atteinte du foie est trop sévère et notamment lorsque sa capacité régénérative est déficiente, cette approche permettrait aux patients d'attendre une greffe de foie.

L'objectif de ce projet est de développer une approche basée sur les pStemHep pour traiter les IHA. Les objectifs spécifiques seront : (i) développer un protocole de production des pStemHep compatible en BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication ou GMP), (ii) améliorer les fonctionnalités des pStemHep afin d'augmenter leurs performances thérapeutiques pour traiter les IHA et (iii)

développer des stratégies d'immunoprotection des pStemHep pour empêcher leur rejet immunitaire chez les animaux immunocompétents.

Les procédures mises en place nous permettront d'optimiser la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner). Lorsque des données préliminaires sont disponibles, nous les utiliserons pour limiter le nombre de groupes expérimentaux dans les étapes suivantes. Cela permet de réduire le nombre d'animaux impliqués. Nous allons aussi réutiliser dans d'autres protocoles certains animaux non utilisés ou échantillons biologiques prélevés (comme le foie). Nous prendrons en compte tous les éléments nécessaires afin de limiter au maximum la douleur de l'animal.

Nous limiterons au maximum le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans à 1410 souris.

4879. Le muscle, outre sa fonction locomotrice, est également le principal réservoir d'acides aminés mobilisables pour assurer la survie de l'organisme en cas de situations pathologiques. La préservation du capital musculaire contribue à maintenir l'état de bonne santé. La masse musculaire dépend d'un équilibre entre la synthèse des protéines et leur dégradation sous la dépendance directe de l'apport en acides aminés issus de la digestion des protéines alimentaires. Un déséquilibre, lié à une pathologie ou au vieillissement, entre les vitesses de synthèse et de dégradation protéique entraîne une fonte musculaire. Si les causes peuvent être différentes, il a été systématiquement observé une diminution de l'effet anabolique du repas : accrétion protéique musculaire (gain net de protéines dans le muscle) liée à l'ingestion du repas, même si celui-ci contient l'apport protéique conseillé. Ceci s'explique par la mise en place d'une résistance de la synthèse des protéines musculaires à l'effet stimulateur des acides aminés issus de la digestion des protéines alimentaires. En d'autres termes, dans ces situations, il faut amener plus d'acides aminés et donc générer une aminoacidémie plus importante suite à l'absorption d'un repas (phase post-prandiale) pour créer un effet anabolique similaire à celui obtenu chez un individu dont le capital musculaire est normal et non résistant.

Jusqu'à présent, la majeure partie des études se sont focalisées sur l'apport de protéines à digestion rapide générant rapidement d'importantes aminoacidémies et à fortes teneurs en leucine (exemple : les protéines du lactosérum). Ces études ont montré que l'hyperaminoacidémie est un levier important pour restimuler la synthèse des protéines quand celle-ci devient moins sensible à la prise alimentaire et ceci quel que soit la situation physiopathologique étudiée.

Le maintien de la masse protéique musculaire ou la récupération de son capital musculaire suivant un état d'atrophie dépend donc de la capacité des acides aminés alimentaires à stimuler de façon maximale l'anabolisme protéique (hyperaminoacidémie adaptée). Un autre facteur prépondérant dans le gain de masse musculaire est la durée pendant laquelle l'anabolisme va être présent et efficace pour générer de l'accrétion protéique dans les muscles. En d'autres termes, plus la période d'accrétion protéique post-prandiale sera longue plus l'effet des protéines alimentaires sera efficace.

Dans ce projet, nous souhaitons proposer des stratégies innovantes pour palier à la résistance anabolique de l'effet repas en étudiant :

- l'effet cinétique de protéines lentes (caséine) et rapides (lactosérum et protéines végétales (pois et blé)),
- la modification cinétique des apports énergétiques : chrononutrition séquentielle (apport en acides aminés suivi d'un supplément énergétique décalé) qui n'a, à notre connaissance, jamais été étudiée lors de situations de résistance anabolique et de fonte musculaire physiologique ou pathologique.

Le modèle choisi est le rat Wistar âgé (20 mois) connu pour présenter une résistance anabolique post-prandiale.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Le projet prévoit la mise en place d'une intervention nutritionnelle chez le rat (n=180) afin de caractériser les effets de sources protéiques optimisées sur le maintien de la masse musculaire.

In fine, l'étude proposée permettra de fournir des résultats scientifiques sur l'intérêt potentiel de certaines sources protéiques et d'un apport énergétique décalé du repas dans le maintien et la récupération musculaire des personnes malades.

4880. Depuis les premières descriptions des lésions d'ischémie-Reperfusion (I/R) en 1960 (2-3), de nombreuses études ont opté pour l'analyse des mécanismes moléculaires à l'origine de la complexité physiopathologique de ces lésions. Aujourd'hui, il est bien établi que les lésions d'ischémie-reperfusion s'installent suite à un mécanisme inflammatoire entraîné d'une part par les leucocytes dérivées de la moelle osseuse et d'autre part par l'activation des voies classiques de l'inflammation. Cependant, le peu de stratégies expérimentales ayant évolué vers une thérapie adjuvante en combinaison avec l'angioplastie coronaire primaire, restent à faible potentiel de cardioprotection d'où la nécessité d'explorer une thérapie qui ciblerait une étape précoce du processus inflammatoire à l'origine des lésions d'ischémie-reperfusion. La colchicine connu en tant que puissant anti-inflammatoire exerçant une fonction de poison du fuseau mitotique sur les cellules inflammatoires, représente une molécule candidate pour limiter l'extension de ces lésions au moment de la reperfusion. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous voulons étudier l'effet cardioprotecteur d'un traitement de courte durée à la colchicine sur un modèle d'infarctus du myocarde chez des rats (Au nombre de 249 rats : *Rattus norvegicus*) et de pouvoir expliquer les mécanismes par lesquels cette cardioprotection est assurée. Cette étude est une étape indispensable avant d'envisager une application translationnelle de la colchicine dans le cadre d'un infarctus de myocarde aigu. Nous utiliserons entre 26 à 30 animaux par groupe (soit 10 groupes, le pourcentage de perte lié à la procédure compris), soit au total 249 rats pour répondre aux objectifs de ce projet. Le nombre d'animaux utilisé pour cette étude est justifié par la variabilité importante induite par la modélisation de l'infarctus du myocarde chez le rat. Un nombre suffisant d'animaux est donc requis. Seules les expériences indispensables seront réalisées. Il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience. La procédure chirurgicale sera réalisée sous anesthésie générale au pentobarbital (pentobarbital 60mg/kg) complétée par une analgésie au Buprécare (Buprénorphine vétérinaire 0.01-0.05mg/kg). Afin de respecter la règle des 3R, une analyse statistique des résultats sera réalisée (Analyse de variance ANOVA suivie d'un test post hoc (test de comparaison multiples): Test de Différence Significative

Minimale entre les variances des différents groupes pour déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes) limitant ainsi le risque de résultats finalement non discriminants et permettant de réduire le nombre d'animaux et les expériences inutiles. Le développement des thérapies destinées à l'homme passe impérativement par une étape d'expérimentation animale in-vivo après les études in-vitro et ex-vivo. En effet, le rat est un modèle pertinent pour la modélisation de l'infarctus du myocarde, il n'existe aucune autre méthode alternative. L'étude sur un modèle « intégré » approchant au mieux toute complexité de la maladie chez l'homme est à même de valider l'efficacité de celle-ci avant de la tester chez l'homme. Cette étape in-vivo est donc irremplaçable.

4881. Les études de pharmacocinétique sanguine, de distribution tissulaire et d'élimination de candidats médicaments biologiques représentent une étape essentielle dans le développement d'un médicament. Ces études, demandées par les conseils scientifiques des entreprises clientes, ont pour but la compréhension et l'analyse du devenir du médicament dans l'organisme, d'évaluer une potentielle accumulation de ce dernier dans les organes et/ou tissus et ainsi de pouvoir mieux appréhender d'éventuels effets indésirables. Dans le cadre d'études en oncologie, il est également crucial de vérifier le ciblage spécifique des candidats médicaments pour les cellules cancéreuses que ce soit à but diagnostic ou thérapeutique.

Ces études in vivo s'inscrivent dans un contexte d'études répétitives car elles seront réalisées selon un même schéma directeur expérimental ayant pour unique objectif l'étude pharmacologique de sélection de candidats médicaments biologiques.

Les variations peuvent porter sur la souche de souris sélectionnée pour l'évaluation du candidat, le mode d'administration du candidat, le nombre d'animaux par groupe et le nombre de groupes (différentes doses et/ou différents temps d'euthanasie à analyser).

Ces études in vivo sont menées à partir de l'administration de candidats médicaments préalablement marqués par un isotope radioactif de faible énergie afin de tracer et de quantifier ces candidats dans les différents tissus dont le tissu tumoral et fluides biologiques d'intérêt. La radioactivité est administrée à des doses ne présentant aucun effet nocif pour la santé de l'animal.

L'évaluation de la distribution tissulaire et sanguine de 4 à 5 molécules médicaments sera réalisée annuellement, nécessitant un nombre d'animaux total pouvant varier de 64 à 160 souris. Ainsi sur 5 ans, le nombre total d'animaux nécessaires pour l'évaluation de 4 à 5 molécules est de 320 à 800 souris.

L'ensemble de ces expérimentations in vivo respecte la règle des 3R, comme mentionnée dans la directive européenne 2010/63/UE. En effet, les procédures utilisées ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par des méthodes alternatives in vitro n'impliquant pas des animaux vivants. La précision et la reproductibilité de la méthode de détection radioactive permettent de réduire le nombre d'animaux par groupe tout en prenant en compte la variabilité interindividuelle.

Le respect du bien-être animal passe par des conditions d'hébergement adéquates, un suivi quotidien des animaux, des méthodes utilisées visant à réduire le plus possible toute forme de douleur, souffrance ou stress de l'animal ainsi que l'instauration de points limites pertinents et précoces.

Enfin, les milieux d'hébergement sont enrichis avec du papier accordéon pour faciliter la nidation et des tunnels.

4882. Les études d'innocuité sont requises par la loi. Elles respectent la réglementation relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et celle relative aux médicaments vétérinaires. De plus, elles suivent la ligne directrice et la pharmacopée européenne en vigueur.

Pendant le développement des vaccins, des études d'innocuité sont réalisées sur les espèces cibles. Elles consistent à vacciner les animaux selon le schéma vaccinal recommandé (dose unique, dose répétée) puis de réaliser ensuite un suivi spécifique des animaux afin de déterminer tous risques potentiellement associés à l'administration : réactions générales, réactions locales au site d'injection, augmentation de la température corporelle... Un suivi sérologique est également réalisé afin de s'assurer de la présence d'anticorps après vaccination. A l'issue de ces essais, en fonction des groupes de traitement, certains animaux seront mis à mort afin de respecter le principe de précaution conformément à la législation européenne, les autres pourront être gardés en vie.

Conformément à la ligne directrice et à la pharmacopée européenne, les études d'innocuité de vaccins doivent être réalisées in-vivo sur les espèces cibles. Au minimum 8 mammifères et entre 8 à 10 oiseaux par vaccin et/ou voie d'administration doivent être vaccinés. En moyenne, par étude, 2 voies d'administration et/ou vaccins sont à tester et un groupe contrôle est inclus. De plus, il est réalisé :

- 2 études par an d'innocuité sur les bovins, les ovins et les porcins (d'où l'utilisation de 240 animaux de chaque espèce sur 5 ans)
- 1 étude tous les 2 ans (soit 3 études sur 5 ans) sur les caprins, les équins et les lapins (d'où l'utilisation de 72 animaux de chaque espèce sur 5 ans)
- 1 étude par an d'innocuité sur les volailles (d'où l'utilisation de 150 volailles sur 5 ans).

Afin de permettre aux animaux de s'adapter à leur environnement et de s'assurer de leur bon état de santé, une période d'acclimatation d'au minimum 7 jours sera dispensée avant vaccination. Tout au long de leur hébergement, les animaux auront des conditions d'hébergement adaptées et optimales (logement, environnement, alimentation, apport en eau, soins). Afin de les maintenir, les paramètres d'ambiance, l'aliment, l'abreuvement seront vérifiés quotidiennement. Par ailleurs, afin d'augmenter leur bien-être, les animaux seront hébergés collectivement et disposeront d'un environnement enrichi.

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

4883. La toxoplasmose est une maladie bénigne et passe le plus souvent inaperçue chez l'Homme immunocompétent. Cependant, depuis environ 10 ans, des épidémies de toxoplasmose virulentes ont été recensées en Guyane française. Elles ont été causées par des souches de toxoplasmes dites atypiques, différentes de celles retrouvées habituellement au cours des infections humaines. Contrairement aux souches classiques, les souches de toxoplasmes isolées en Guyane française sont donc hyper-virulentes pour l'Homme immunocompétent aboutissant parfois à la mort des individus. Ceci est la résultante à la fois de la variabilité génétique du parasite (les souches atypiques ont un génotype qui leur est propre) et du fait que le système immunitaire de l'hôte est sûrement incapable de lutter efficacement contre l'infection et de la résorber. Il est important de comprendre pourquoi ces souches parasitaires sont hypervirulentes et occasionnent des toxoplasmoses disséminées voire mortelles, afin de pouvoir lutter contre ces épidémies.

Le rat est le meilleur modèle pour étudier l'infection toxoplasmique puisque tout comme l'Homme, il ne meurt pas de l'infection par des souches classiques mais entre en phase chronique. Par ailleurs, les réponses immunes ainsi que la dissémination parasitaire ne peuvent être analysés qu'*in vivo*.

Afin de comprendre le développement de l'infection toxoplasmique par les souches guyanaises, nous prévoyons d'analyser l'issue de l'infection par des souches atypiques chez le rat. Plusieurs expériences seront mises en œuvre et 126 à 198 rats seront étudiés.

Les rats seront hébergés dans un environnement dépourvu de pathogènes, l'eau et la nourriture continuellement présents. En cas de souffrance de l'animal suite à son inoculation par les parasites, il sera euthanasié après avoir été endormi.

Dans un premier temps, l'infection par 7 souches atypiques sera analysée dans des rats sensibles. Cela permettra de choisir la souche atypique la plus virulente.

Par la suite, notre étude se centrera sur cette souche et nous déterminerons si un locus génétique, connu pour son implication dans le contrôle de l'infection par les souches classiques, contrôle aussi l'issue de l'infection par cette souche atypique hypervirulente. Si c'est le cas, des rats résistants ou sensibles seront infectés et la dissémination parasitaire ainsi que la réponse immune (cytokines circulantes, populations immunes des organes lymphoïdes secondaires) seront analysés.

4884. La photoacoustique est une technique non invasive qui permet de visualiser des molécules physiologiques ainsi que des composés permettant de mettre en évidence la présence de certaines pathologies, notamment le cancer.

Cette technologie est utilisée aussi bien en recherche préclinique qu'en diagnostic clinique et permet de dépasser les limites imposées par les techniques d'imagerie conventionnelles.

En recherche préclinique, ce système permet une meilleure compréhension des phénomènes impliqués dans le développement des tumeurs, de plus, la superposition de l'image photoacoustique avec l'image ultrasons permet une localisation anatomique précise du signal observé. Cependant, cette technologie récente nécessite des phases de développement et de caractérisation sur des modèles précliniques en oncologie avant d'envisager son utilisation pour le diagnostic des cancers chez l'Homme. Nous aurons besoin pour cela de 216 souris.

Remplacer :

A ce stade du projet, il est indispensable d'intégrer le fait que l'objectif est de travailler sur des organismes vivants. Le modèle murin nous semble le plus approprié, il permet de se rapprocher d'un grand nombre des caractéristiques de la pathologie humaine.

Réduire :

De nombreux tests *in vitro* nous ont permis de réduire un maximum le nombre de possibilités pour se concentrer sur un nombre réduit de test *in vivo*. De plus, l'approche statistique et l'expérience de l'équipe dans ce domaine, nous permet de réduire le nombre d'animaux au minimum afin d'obtenir des résultats exploitables.

Raffiner :

Afin d'employer au mieux les animaux, les protocoles présentés ont été optimisés afin d'obtenir le maximum d'informations sans augmenter la douleur infligée aux animaux. En effet, toutes les procédures possiblement traumatisantes sont effectuées sous anesthésie gazeuse, avec une gestion de la douleur adaptée à chaque situation.

4885. Définition du projet et durée : l'objectif de notre projet, d'une durée de 4 ans, est de montrer qu'il est possible de détecter et de mesurer de manière absolue la concentration de produit de contraste utilisée dans l'espace extra cellulaire myocardique en utilisant un modèle d'infarctus chez le lapin sur le premier prototype de scanner spectral à comptage photonique au cours du temps.

Mots clés : athérosclérose, infarctus du myocarde, scanner spectral à comptage photonique

Objectifs et attentes du projet : l'athérosclérose est une des principales causes mondiales de morbi-mortalité, avec un nombre de décès estimé à plus de 17,3 millions par an, soit plus de 30% du nombre total de décès à travers le monde chaque année. L'une des principales manifestations cliniques de la maladie athéromateuse est représentée par l'événement aigu d'infarctus du myocarde, dont on connaît un critère prédictif important, la zone ischémique, qui a déjà fait l'objet d'étude multimodale par IRM myocardique, imagerie nucléaire dont la scintigraphie myocardique, et la Tomographie par Emission de Positron (TEP). De plus, les études pré-cliniques et cliniques s'intéressent de plus en plus au post-conditionnement de l'infarctus du myocarde (IDM), comme par exemple avec l'utilisation de molécules anti-inflammatoires, mais aussi d'autres facteurs tels que le temps d'ischémie. En effet, il a été démontré que les lésions de reperfusion représentent une part significative (20-40%) des lésions irréversibles myocardiques, et qu'il est possible d'en modifier son impact expérimentalement par des processus chimiques ou interventionnels. Ces résultats ont été montrés par une caractérisation myocardique en IRM permettant d'évaluer l'œdème, la zone hypoperfusée après ischémie et la zone ischémique après reperfusion. Cependant, il n'est pas possible de caractériser de manière quantitative ces

processus en IRM. Or ceci est très important pour la compréhension « quantitative » des phénomènes physiopathologiques survenant au cours du stress myocardique.

Le scanner spectral à comptage photonique (SPCCT) pourrait permettre de quantifier l'espace extra cellulaire myocardique, représenté par l'œdème extracellulaire et les cellules myocardiques lésées au cours du temps précoce de l'ischémie, ainsi que la zone à risque et la zone ischémique après reperfusion en analysant les modifications de volume extracellulaire et en mesurant les concentrations tissulaires en produit de contraste utilisé diffusant dans tout l'espace extracellulaire. Dans l'optique de cette étude, trois produits de contraste sont candidats à l'imagerie myocardique, représentés par les molécules de gadolinium, d'iode et les nanoparticules de gadolinium, ces dernières se différenciant par leur taille et concentration absolue en molécules de gadolinium. Ces agents de contraste présentent l'intérêt commun d'être de bons candidats à l'imagerie spectrale. De plus, le scanner spectral à comptage photonique permettrait de caractériser le myocarde au cours de différents processus pathologiques tout comme l'étude du compartiment extra cellulaire avec la quantification de fibrose tissulaire qui est un paramètre essentiel pronostique de nombreux troubles du rythme parfois mortels et le facteur principal du remodelage ventriculaire responsable de l'insuffisance cardiaque. Enfin, ce scanner peut permettre une caractérisation étalée dans le temps de manière reproductible avec des temps de manipulation courts comme en témoigne la résolution temporelle de l'ordre de la seconde.

Règle des 3R et nombre d'animaux : Dans le souci du respect de la règle des 3R, le modèle animal le plus adapté est représenté par le lapin. En effet la taille de cet animal est très intéressante par rapport à la résolution spectrale du scanner. De plus, il n'existe pas d'autres modèles substituables d'ischémie-reperfusion myocardique et nous avons l'expérience reproductible de ce modèle d'étude. Nous réaliserons une étude pilote constituée de 5 lapins dans le but d'adapter ensuite le nombre de lapins nécessaires afin de bénéficier d'une puissance statistique satisfaisante. La phase expérimentale sera constituée de 20 lapins maximum pour chaque produit de contraste utilisé, successivement l'iode, le gadolinium et les nanoparticules de gadolinium. Soit un nombre total maximum de 65 lapins sur 4 ans hébergés dans des portoirs aux normes réglementaires, enrichit de repositoires rabattables, de balles et bâtons à ronger.

4886. Pour approfondir et mieux connaître les mécanismes de la production des cellules sanguines (l'hématopoïèse) et certaines maladies de sang très rares et les mécanismes conduisant à ces maladies, nous avons créé des modèles cellulaires soit en utilisant les cellules souches embryonnaires humaines (hES – cellules non différenciées qui peuvent se différencier et devenir des cellules spécifiques d'un tissu ou d'un organe) soit en reprogrammant des cellules somatiques (cellules différenciées qui appartiennent à un type cellulaire spécifique – par exemple cellules musculaires, cellules immunitaires, cellules dermiques, cellules nerveuses etc...) en cellules souches induites à la pluripotence (la capacité que possède une cellule à se différencier en tous types cellulaires) (iPSC) à partir de différents sujets sains ou de patients. Ces cellules sont ensuite induites vers l'hématopoïèse in vitro pour être étudiées. Avant d'utiliser ces cellules, elles doivent être caractérisées sur le plan moléculaire et fonctionnel. Pour cela, nous devons tester si ces cellules n'ont pas d'anomalies génétiques importantes comme des duplications ou pertes de chromosome, si les mutations qui conduisent aux maladies qu'on étudie sont bien présentes et si ces cellules ont toujours la capacité à se différencier en tous types cellulaires. Pour répondre à cette dernière question, nous analyserons par différentes techniques les marqueurs spécifiques qui correspondent à l'état de pluripotence mais un test fonctionnel est nécessaire pour confirmer ces cellules sont capables de se différencier en tous types cellulaires, i.e. on évalue leur propriété à générer trois feuilletts embryonnaires appelés (endoderme, ectoderme et mésoderme). Ce test est indispensable pour la suite du travail car nous ne pouvons garder ces cellules en culture uniquement si elles sont à l'état non-différencié (pluripotent). Ce test se fait donc par injection de ces cellules dans des souris immunodéficientes et par formation de tératomes (tumeurs développées à partir de cellules embryonnaires). Cette dernière expérience est la technique de référence indispensable pour connaître la pluripotence in vivo de ces cellules souches et fait l'objet de cette demande.

Les cellules IPS et hES peuvent servir à reproduire les mécanismes impliqués dans une pathologie hématopoïétique notamment lorsqu'il est difficile d'obtenir des prélèvements de patients. Par exemple, cela permettrait d'étudier l'embryogénèse humaine sans avoir recours à des embryons humains. A terme, ces techniques pourraient permettre d'obtenir des cellules hématopoïétiques (globules rouges ou plaquettes) en nombres suffisants et immunitairement compatibles avec les patients. Ceci limiterait les risques de rejet (système HLA, rhésus, etc..), pallierait au manque de cellules sanguines pour les transfusions et limiterait les risques de transmission pathologiques entre donneur et receveur.

L'induction de tératome sert à tester in vivo la fonction de pluripotence des cellules souches embryonnaires, c'est-à-dire leur capacité à produire des cellules ou des tissus issus de l'ensemble des trois feuilletts embryonnaires. Parallèlement aux techniques in vitro préalables, l'induction de tératome in vivo permet de confirmer que les cellules reprogrammées ne subiront pas de biais de différenciation une fois en contact avec des tissus déjà différenciés. Par exemple, injectées dans du tissu musculaire, les IPSc pourraient se différencier majoritairement en mésoderme et induire un biais. Le modèle animal, indispensable, permet de valider nos cellules en présence de nombreuses interactions, similaires aux conditions physiologiques humaines.

Le nombre total maximum de souris dépend donc du nombre de lignées cellulaires à tester. Nous estimons à 175 souris au maximum le nombre d'animaux nécessaires pour ce projet, il pourrait être plus faible si nous avons moins de lignées.

Les seules contraintes expérimentales pour les animaux sont l'injection de cellules souches en intramusculaire sous anesthésie générale. Les animaux sont ensuite surveillés quotidiennement, les points limites appliqués strictement, et la contrainte aux animaux est prévue comme minime, car les tératomes sont injectés en un site peu gênant et seront peu développés. Si toutefois des animaux présentent des signes cliniques liés à la contrainte, ils recevront un complément alimentaire plus riche additionné de buprénorphine.

4887. Notre laboratoire de thérapie génique a pour objectif de développer des stratégies thérapeutiques pour traiter la maladie de Pompe (MP). C'est une maladie neuromusculaire rare (prévalence de 1/40000) causée par une insuffisance de l'acide alpha-glucosidase (GAA), qui est localisée au niveau de tous les tissus et qui convertit le glycogène en glucose. Le manque de GAA provoque l'accumulation de glycogène dans plusieurs tissus conduisant à des lésions.

La MP affecte principalement les muscles et les neurones et cause des cardiomyopathies, des faiblesses musculaires et des insuffisances respiratoires.

A ce jour, le seul traitement disponible pour la MP est une enzymothérapie substitutive, qui consiste à perfuser par voie intraveineuse l'enzyme GAA synthétique aux patients toutes les semaines. Ce traitement améliore certains facteurs de la MP (comme la cardiomyopathie), mais elle est inefficace pour cibler les muscles squelettiques, ce qui fait que la maladie progresse. De plus, l'enzymothérapie peut s'avérer totalement inefficace chez de nombreux patients, qui développent des réponses immunitaires contre l'enzyme GAA synthétique.

Sur cette base, l'objectif de ce projet est de développer une stratégie de traitement de la MP par une approche de thérapie génique : nous utiliserons différents virus adéno-associé (AAV) modifiés pour apporter le gène manquant de l'enzyme GAA (AAV-GAA) au niveau des cellules du foie, cible privilégiée de nos virus.

Afin de limiter au maximum l'utilisation d'animaux pour ce projet, tous nos AAV-GAA (60) ont été préalablement testés sur des cellules de foie cultivées en laboratoire. Ceci nous a permis de sélectionner 30 traitements candidats. Cependant la capacité de nos virus à franchir les défenses immunitaires ne peut être démontrée complètement que dans un organisme physiologique "entier". Nous prévoyons donc de les tester chez le modèle animal qui mime la MP, une souche de souris déficiente en GAA : B6;129-Gaatm1Rabn/J (GAA -/-).

Toutefois, la seule utilisation de cette souche pose certains inconvénients : en sachant qu'un animal sur 4 est affecté par la MP à la naissance et compte-tenu du nombre de souris nécessaires pour notre projet, le nombre de souris en élevage serait trop important pour répondre à l'ensemble des questions posées. De plus, en vieillissant, ces animaux développent des symptômes musculaires affaiblissants.

Aussi, dans l'optique de limiter au maximum l'utilisation de ces souris malades, nous testerons dans un premier temps nos AAV-GAA chez une souche de souris saines (C57Bl/6). Ceci nous permettra de sélectionner ceux capables de produire le plus d'enzyme GAA. Puis dans un second temps, les traitements sélectionnés (15) seront testés chez les souris malades, afin de valider leur pouvoir thérapeutique. Cette souche nous permettra également de déterminer la dose la plus efficace pour enfin aboutir à la sélection du meilleur AAV-GAA « médicament » capable de traiter leur pathologie.

Au total, 545 souris (155 C57Bl/6 et 390 B6;129-Gaatm1Rabn/J) seront utilisées. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études et en fonction d'une analyse statistique afin d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible.

Ces chiffres ainsi que la démarche scientifique a été établit afin de respecter la règle des 3R (Réduire, Raffiner, et Remplacer) et d'obtenir des résultats statistique relevant avec le moins de souris possible. Le Raffinage des expériences est assuré par la mise en place des points limites pour éviter l'inconfort et la douleur des souris. Le personnel impliqué dans ce projet est compétent, efficace et maîtrise l'ensemble des gestes des procédures, limitant ainsi souffrance et stress inutiles aux animaux.

4888. Notre projet de recherche a pour objectif de développer un vaccin thérapeutique efficace permettant de traiter les patients atteints de cancer de la peau, rare et agressif. Avec les traitements actuels (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie) seuls 32 % des patients ayant des carcinomes avec métastases ont une durée de vie supérieure à 2 ans.

Nous souhaitons donc faire la preuve de concept d'un nouveau vaccin thérapeutique et pouvoir disposer dans 2 ans de données expérimentales suffisantes et nécessaires à une demande d'autorisation d'essai clinique. Le vaccin thérapeutique que nous souhaitons développer repose sur l'utilisation d'un vecteur bactérien modifié permettant la production d'une protéine d'intérêt thérapeutique. Cette protéine sera délivrée par le vecteur dans les cellules de l'hôte vacciné. La bactérie utilisée ici (*Pseudomonas aeruginosa*) exprime naturellement une seringue moléculaire à sa surface. Cette seringue « embarquée » est capable d'injecter des protéines dans le cytoplasme des cellules de l'hôte. Ce mécanisme a été détournée pour injecter dans des cellules cibles, des protéines d'intérêt telles que des antigènes tumoraux et induire une réponse anti-tumorale par le système immunitaire. Afin de réduire la dangerosité du vecteur bactérien envers l'hôte, nous avons également modifié cette bactérie afin qu'elles n'expriment plus deux toxines clés, responsable de sa virulence. Actuellement, nous avons déjà validé dans des modèles cellulaires in vitro, la capacité du vecteur bactérien à délivrer des protéines d'intérêts à des cellules cibles et à induire une réponse cellulaire. Il donc est à présent nécessaire de vérifier si in vivo, la protéine est délivrée correctement et si le vecteur vaccinal est capable de stimuler une réponse immunitaire spécifique anti-cancer dans un contexte physiologique. Les perspectives finales de ce projet sont :

- De vérifier que les bactéries utilisées dans notre stratégie vaccinales présentent une faible toxicité pour l'organisme vacciné et sont capables d'éduquer le système immunitaire à la reconnaissance et la destruction de cellules tumorales.

- D'établir les conditions vaccinales optimales d'utilisation de ce vecteur.

- D'accroître nos connaissances sur les mécanismes immunologiques mobilisés par ce vaccin thérapeutique pour induire une immunité protectrice

- D'accroître nos connaissances sur l'activation des cellules cytotoxiques par la bactérie

- De disposer de données expérimentales avant de procéder au développement préclinique.

Suite aux données obtenues in vitro, le modèle expérimentale chez la souris est primordiale et ne peut pas être remplacé. En effet, la réponse immunitaire est un phénomène biologique complexe faisant intervenir de multiples types cellulaires et une organisation spatiale qui rend impossible son étude dans des tests in vitro. D'autre part l'utilisation du modèle souris est imposée par son

utilisation dans les tests précliniques des compagnies pharmaceutiques. Nous avons actuellement à notre disposition une grande quantité d'outils d'analyse nous permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. En effet, pour chaque procédure expérimentale, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre réduit d'animaux tout en essayant d'obtenir le maximum de résultats statistiquement interprétables. Les procédures expérimentales ainsi que 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 qui pourrait être ressenti par les animaux. La classe de sévérité maximale décrite dans nos procédures est modérée. Le projet nécessitera l'utilisation de 354 souris au maximum.

4889. Plus de la moitié des patients souffrant d'un cancer reçoivent un traitement par radiothérapie. Cependant certaines tumeurs cérébrales dont les glioblastomes récidivent dans les champs d'irradiation, principalement suite à une faible réponse des cellules tumorales à la radiothérapie. Identifier les voies moléculaires régissant ces mécanismes de résistance à la radiothérapie permettra de synthétiser des inhibiteurs de ces voies utilisables en clinique humaine pour accroître l'efficacité de cette thérapie.

Nous avons identifié dans des cellules de glioblastomes cultivées *in vitro* des protéines impliquées dans les mécanismes de radiorésistance de ces cellules et nous avons fait la preuve de concept *in vitro* que le blocage de ces voies biologiques permet de rendre la radiothérapie plus efficace. Chez le patient les cellules tumorales se développent dans un microenvironnement vascularisé, contenant d'autres types cellulaires, au contact duquel elles se modifient, s'adaptent, migrent. Il est donc indispensable de valider notre preuve de concept dans ce contexte plus global qu'il est impossible de reproduire *in vitro*. Nous envisageons donc d'utiliser un modèle murin très largement utilisé en cancérologie pour valider *in vivo* les études *in vitro*, le modèle de souris immunodéficientes « nude » dans lequel seront implantées (xénogreffes sous-cutanées ou orthotopiques selon les cibles) des cellules tumorales humaines présentant une inactivation des voies d'intérêt. Après irradiation focalisée sur la tumeur, nous nous attendons à observer une diminution ou un blocage de la croissance tumorale beaucoup plus important dans les tumeurs qui seront invalidées pour les cibles d'intérêt. Ces essais pré-cliniques conduiront, au sein de notre équipe spécialisée en recherche translationnelle, à la réalisation d'essais cliniques associant des inhibiteurs de ces voies à la radiothérapie chez des patients porteurs de glioblastome.

Sur la base de nos études antérieures et des données de la littérature, nous avons limité le nombre d'animaux à 8 par groupe de traitement. 5 animaux par groupe est le minimum requis pour avoir une significativité statistique. L'hétérogénéité de la prise tumorale, de la croissance des tumeurs chez les animaux et de la réponse à l'irradiation nous oblige à prévoir un nombre plus important d'animaux au départ. Le fait de prévoir des animaux supplémentaires nous épargnera de renouveler plusieurs fois les mêmes expériences. Après une étude de l'inhibition de la cible dans la xénogreffe, quatre groupes sont nécessaires pour valider chacune des cibles préalablement identifiées *in vitro* : groupe contrôle, groupe irradiation, groupe avec inhibition de la cible et groupe irradiation et inhibition de la cible.

Les animaux sont hébergés dans des conditions qui répondent à la fois à la réglementation nationale et aux directives européennes dans le domaine de l'expérimentation et de l'éthique animale. De plus, une personne est spécifiquement dédiée au bien-être des animaux. Afin de réduire au maximum le stress des animaux, ils seront manipulés avec précautions et calme durant toute la durée de l'expérience. Les animaux seront observés tous les 2 jours afin de repérer précocement les signes neurologiques (xénogreffes orthotopiques) ou de souffrance (xénogreffes sous cutanées). Les animaux seront mis à mort dès l'apparition de signes neurologiques ou de souffrance par surdosage anesthésique. Toutes les manipulations qui pourront être stressantes ou douloureuses pour l'animal seront réalisées après anesthésie (implantation des tumeurs, irradiation des animaux).

Ce projet sera réalisé sur 5 ans, soit un nombre total d'animaux de 700 souris au maximum, afin de valider jusqu'à 10 cibles identifiées et pour obtenir des valeurs d'efficacité statistiques permettant un développement clinique ultérieur. Ce projet a d'ores-et-déjà été appuyé par différents comités scientifiques nationaux (Plan Cancer, ARC et RITC notamment).

4890. Notre groupe de recherche est orienté vers l'étude de la physiopathologie des maladies psychiatriques avec un intérêt particulier pour les troubles du spectre de l'autisme (TSA). Nous étudions le gène CNTNAP2 qui apparaît aujourd'hui comme un gène de susceptibilité majeur pour le développement de ces maladies. L'objectif général de notre travail est de mieux comprendre le rôle de ce gène, et de la protéine pour laquelle il code (Caspr2), dans le développement du cerveau, et d'éclaircir les mécanismes physiopathologiques impliqués dans ces maladies. Pour cela, nous utilisons un modèle de souris transgéniques (Cntnap2 KO).

La protéine Caspr2 est une molécule d'adhésion susceptible de réguler les interactions entre les neurones et leur environnement. Nous tentons de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires régulant les propriétés adhésives de Caspr2 au cours de la migration des neurones et la mise en place de la connectivité neuronale, en combinant des approches de culture cellulaire à partir de cerveaux d'embryons ou de nouveau-nés, des techniques d'électroporation *in utero* permettant l'expression de molécules d'intérêt dans le cerveau, et des méthodes histologiques. Le gène Cntnap2 est spécifiquement exprimé dans le cerveau et est très peu exprimé dans les lignées cellulaires, d'où la nécessité de dériver des cultures primaires de cellules neuronales. Les mécanismes modulant les interactions cellulaires au cours du développement du cerveau sont cependant trop complexes pour être entièrement modélisés *in vitro* par culture cellulaire. L'expression de protéines rapportrices fluorescentes de manière locale chez la souris, *in utero*, permet d'aborder spécifiquement cette problématique. Cette approche est également adaptée pour tester les conséquences des mutations identifiées chez les patients. La caractérisation des anomalies chez les souris Cntnap2 KO nécessite d'être poursuivie afin d'éclaircir la physiopathologie. Pour cela, nous analysons la morphologie du cerveau de ces souris mutantes, par des méthodes d'histologie, d'immunohistochimie et de microscopie, et des croisements avec des souris rapportrices exprimant des protéines fluorescentes dans des populations de neurones spécifiques.

Exigences des 3 R :

Le modèle murin Cntnap2 KO que nous étudions est à ce jour le seul modèle disponible. Il présente l'avantage de mimer assez bien le phénotype humain. Le développement du cerveau est en effet bien conservé chez la souris, surtout pour les étapes de développement du cerveau qui nous intéressent, favorisant l'identification de phénotypes robustes. De plus, chez la souris, la période de gestation est courte et le nombre d'embryons important, ce qui nous permet de générer un nombre d'animaux suffisant pour plusieurs expériences à partir de relativement peu de fondateurs. Dans la plupart des cas, nous pouvons également comparer des souris WT et mutantes issues de la même portée, dans la mesure où la répartition des trois génotypes sauvage, hétérozygote et homozygote Cntnap2 mutants, est mendélienne. La technique d'électroporation dans le cerveau a été mise au point chez la souris, c'est une méthode de choix pour analyser le rôle des gènes pendant le développement du cerveau. Cette procédure d'électroporation d'embryons est simple et rapide, donne un bon rendement, avec une cytotoxicité faible, et présente l'avantage de réduire le nombre de souris nécessaires par comparaison aux méthodes classiques de génération de lignées de souris mutantes. Les cultures de neurones primaires à différents stades de développement constituent quant à eux un modèle de choix pour investiguer des mécanismes cellulaires et moléculaires. Elles offrent la possibilité de réaliser un nombre important d'expériences à partir d'un nombre restreint d'animaux et constituent une approche préliminaire et complémentaire des études in vivo. Pour chacune des approches expérimentales, des travaux antérieurs nous ont permis d'ajuster le nombre d'animaux requis afin de comparer d'une manière statistique et robuste les conditions mutantes à la condition contrôle avec une excellente reproductibilité. L'ensemble de notre projet nécessitera l'utilisation d'un nombre total de 1507 souris (adultes, nouveau-nés et embryons).

Nos activités portent une attention particulière sur le soin et le bien-être de l'animal. Les souris sont hébergées dans un milieu enrichi et des observations du bien-être sont réalisées 1 fois/jour. Les souriceaux et jeunes animaux sont surveillés, afin de s'assurer que la mère s'occupe bien d'eux. Pendant toutes nos expériences, nous prenons toutes les précautions nécessaires afin d'éviter toute douleur, en utilisant des pratiques adaptées. Les interventions chirurgicales, réalisées sous anesthésie et en présence d'analgésiques, soulèvent une attention post-chirurgicale particulière (surveillance et traitement des plaies). En cas de comportements anormaux (manque de toilettage, manque d'intérêt pour la nourriture), l'état des animaux est surveillé plusieurs fois par jour. Afin d'éviter une souffrance de la souris, les animaux sont anesthésiés et euthanasiés par des méthodes de mise à mort adaptées.

4891. La douleur est un système d'alerte physiologique essentiel au maintien de l'intégrité physique des individus. Néanmoins la perception douloureuse peut devenir pathologique et purement délétère. Deux situations cliniques majeures ont pour origine les traitements de chimiothérapie, et les séquelles d'altération traumatique des nerfs périphériques. Ces neuropathies concernent une part très importante de la population (8%) et ont un coût sociétal énorme. Les cliniciens ne disposent cependant pas d'une réponse thérapeutique adaptée; l'arsenal thérapeutique est très limité, et repose sur des médicaments soit inefficaces, soit ayant des effets indésirables importants. Il est donc essentiel de compléter nos connaissances sur les maladies du système de perception de la douleur afin de proposer des alternatives thérapeutiques.

Dans le cas du cancer du côlon, le traitement de référence -chimiothérapie à l'oxaliplatine- a pour effet indésirable majeur d'entraîner chez les patients une hypersensibilité au froid, douloureuse, et des démangeaisons. Cette interférence peut provoquer l'arrêt de la chimiothérapie, au risque de moins bien traiter le cancer. Dans le cas des neuropathies périphériques d'origine traumatique, les patients perçoivent des douleurs amplifiées et/ou perçoivent comme douloureuses des stimulations normalement indolores. Ces douleurs anormales se modélisent chez la souris, respectivement, par l'injection d'oxaliplatine et par traumatisme induit par section de branches du nerf sciatique. Ces modèles murins permettent d'étudier les causes moléculaires et cellulaires de ces douleurs ainsi que de proposer et valider de nouvelles cibles thérapeutiques. Le recours à l'expérimentation animale est indispensable car 1) la douleur est une sensation qui ne peut être quantifiée que chez l'être conscient; 2) il n'existe pas de modèles in vitro ou de modèles mathématiques permettant de progresser dans les traitements des douleurs chroniques.

Notre projet sur 5 ans implique une équipe de recherche et nécessite 1188 souris issues d'une lignée spécifique. Nous travaillons sur la perception et la propagation douloureuse, sous-tendue par l'activité électrique des neurones, elle-même produite par des protéines particulières (codées par des gènes spécifiques). Dans des conditions physiologiques, les communications électriques entre neurones sont équilibrées et correctement organisées. Quand une douleur chronique s'installe et persiste, les niveaux d'expression de nombreux gènes sont modifiés dans les neurones du système nerveux périphérique et central, pour conduire à une perception amplifiée et/ou erronée des stimuli extérieurs. Dans des travaux précédents, l'équipe avec laquelle nous collaborons a montré que le canal calcique Cav3.2, une protéine essentielle à l'activité électrique des neurones, est particulièrement impliqué dans ces processus anormaux au niveau des neurones sensoriels. Par ailleurs, les données préliminaires obtenues par cette même équipe suggèrent que cette protéine est également exprimée dans différentes régions du système nerveux central impliquées dans le traitement des informations douloureuses. Toutefois, la localisation détaillée reste à établir et on ne sait pas dans quelles conditions ces canaux participent à la douleur chronique, et surtout, si (ou comment) ces canaux pourraient constituer des cibles pharmacologiques thérapeutiques. Ces deux grandes questions peuvent être abordées scientifiquement et éthiquement chez la souris. Ce projet est financé par l'Agence Nationale de la Recherche.

Notre démarche est conforme à la règle des 3R et aux recommandations sur l'éthique de l'expérimentation animale de la douleur. En effet, in vivo, nous cherchons des seuils douloureux, et pas plus. 1) Réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides. L'utilisation de souris génétiquement modifiées qui présentent des propriétés bien calibrées, permet d'augmenter la précision des résultats et la portée des conclusions. De plus, nous exploitons au mieux nos élevages puisque nous étudions mâles et femelles. 2) Raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux. 3) Remplacement, les travaux utilisant des lignées cellulaires ou des animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes tels que la douleur; la souris est donc l'espèce la plus appropriée pour notre étude.

4892. Le fonctionnement du cerveau est basé sur l'interaction réciproque entre les neurones, qui traitent l'information, et le réseau sanguin, qui adapte en permanence la disponibilité métabolique suivant la contribution de chaque région cérébrale. Dans les conditions physiologiques cette interaction peut servir de moyen d'exploration des processus cérébraux en utilisant l'imagerie basée sur le débit sanguin pour identifier quels réseaux sont associés à chaque comportement. Réciproquement, des anomalies du couplage neuro-vasculaire provoquent des situations pathologiques. Des déséquilibres brefs sont associés à des convulsions, tandis que des défauts prolongés sont associés à des démences ou des maladies dégénératives.

Le but de cette étude est de mieux comprendre les activités de réseaux de neurones en lien avec le métabolisme qui les soutient en situation fonctionnelle. On combine l'observation du comportement, des enregistrements électriques de l'activité des neurones, et l'imagerie du réseau vasculaire. D'une part, on aborde une situation physiologique, la dynamique des réseaux impliqués dans des tâches cognitives de navigation spatiale, où de aires cérébrales interagissent pour produire le comportement. D'autre part, on explore la transformation des interactions entre neurones et aires cérébrales dans une situation pathologique, l'épilepsie, où des réseaux distribués à travers le cerveau perturbent l'ensemble de l'activité jusqu'à interrompre, de façon transitoire, le comportement.

De façon générale, cette étude explore des questions fondamentales sur le fonctionnement du cerveau et aborde les pathologies épileptiques, pour lesquelles la panoplie thérapeutique est actuellement sévèrement lacunaire.

Des expériences animales sont indispensables à cette étude, à cause de la nature invasive des enregistrements nécessaires, pour lesquelles il n'existe pas d'équivalent non invasif. En outre, cette étude, reliant l'état comportemental d'un animal aux activités de son cerveau, ne peut s'effectuer que *in vivo*. Toutefois, les procédures mises en jeu sont minimalement douloureuses, puisqu'elles se limitent à des chirurgies sous anesthésie, et que l'épilepsie n'est pas une pathologie algique.

Sur la durée du programme de recherche (5 ans) on estime le nombre d'animaux nécessaires à 280 rats (180 Sprague, 80 GAERS, 20 WAG) et 80 souris (C57BL6), afin d'obtenir des données suffisantes pour répondre aux questions scientifiques posées. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'enregistrements visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ; 3) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements et des activités cérébrales comparables aux mammifères ; rats et souris sont les plus appropriés pour ce type d'étude.

4893. *Candida (C) albicans* appartient à la flore digestive. Son commensalisme repose sur l'équilibre entre levure, membres de la flore et défenses immunitaires. En cas de rupture de cet équilibre chez des patients fragilisés, *C. albicans* colonise la muqueuse digestive et la traverse. Ainsi, les septicémies et candidoses profondes ont une origine essentiellement endogène à partir de la propre flore digestive du patient. Ce caractère bivalent, pathogène-commensal, est associé à sa capacité d'excréter différents facteurs de virulence. Parmi ces facteurs, ECE1 a vu sa fonction lysine/toxine récemment caractérisée. Ce projet vise à documenter l'impact de cette protéine fongique, ECE1, dans un modèle de colonisation digestive avec, pour objectif original, l'étude de son impact sur la qualité de la colonisation mais aussi sur le microbiote digestif. La finalité est de proposer des cibles thérapeutiques ou préventives des candidoses disséminées. Soixante-six souris Crl:CD1 femelles seront utilisées ; espèce modèle de colonisation digestive fongique. La colonisation du tube digestif par la levure est obtenue par supplémentation de la nourriture avec différentes souches de levure *Candida* sécrétant ou non la lysine ECE1 de façon partielle ou intégrée. Dans un premier temps, chez seize souris, l'existence *in vivo* de la sécrétion d'ECE1 par la levure et son intensité au cours de la colonisation seront évaluées dans les selles de la litière mais aussi dans contenu digestif après euthanasie des animaux. Les tubes digestifs seront aussi collectés pour analyse histologique. Cinquante souris seront alors réparties en cinq lots de 10 correspondant à l'évaluation de trois souches fongiques mutantes exprimant ou non diverses formes d'ECE1 et deux contrôles. La colonisation est évaluée par quantification des levures dans les selles de la litière et le microbiote digestif dans les selles fraîches de chacune des souris sera suivi au cours du temps. Cette étude est menée dans le respect de la règle des trois R. En effet, le nombre d'animaux a été ajusté afin de permettre une analyse statistique robuste des différences de répartition du microbiote en fonction de la souche de levure apportée. L'utilisation précédente de ce modèle a confirmé la parfaite innocuité du régime alimentaire supplémenté en levures. Cette procédure est donc considérée de classe légère. Néanmoins, les souris font l'objet d'une surveillance biquotidienne de leur bien-être et état clinique. Tout signe éventuel d'altération (apathie, perte de poids, poils hérissés, isolement des autres animaux) justifiera l'identification de l'animal pour suivi. La persistance 24 heures de tout signe motivera l'euthanasie. L'étude de la colonisation digestive de *Candida* ne peut être complète que si elle inclut l'ensemble des acteurs naturellement présents dans un tube digestif, en particulier le microbiote ; justifiant ainsi sa réalisation *in vivo*. Cette étude vient compléter des données obtenues *in vitro* dans des modèles de culture cellulaire.

4894. La cécité est un problème de santé publique qui handicape gravement les personnes atteintes et qui concerne un français sur 1000. Le but de cette étude est de développer et d'optimiser une nouvelle technique d'imagerie ultrasonore (Ultrafast Ultrasound Imaging) permettant de visualiser l'activité du cortex et ainsi de mieux comprendre le traitement de l'information visuelle. Cette nouvelle technique a une très bonne résolution spatiale (~100µm) et est très simple à utiliser comparée à certaines méthodes telles que l'IRMf. A terme, elle aura pour but de mieux comprendre certaines pathologies menant à la cécité mais également de prouver l'efficacité de certains traitements en cours de développement tels que les implants rétiniens ou l'optogénétique.

Pour les différents protocoles nous utiliserons au maximum 760 rats. Nous avons recours à ce modèle animal car il nous est nécessaire de disposer d'un système biologique dans son intégrité : de l'œil jusqu'au cerveau. De plus, nous disposons déjà d'une souche de rats (P23H) sur laquelle une dégénérescence des photorécepteurs est observée au bout de quelques semaines et nous permettra ainsi d'avoir un modèle aveugle et un contrôle (rat sain).

Nous prendrons soin de considérer la règle des 3R pour le bien-être des animaux :

- Réduire : Nous allons utiliser au maximum le principe des fenêtres chroniques afin de pouvoir réutiliser un même animal sur différents jours d'expérimentation. De plus, il nous sera possible de croiser les protocoles de nos animaux afin de limiter une fois de plus le nombre de rats nécessaires.

- Raffiner : Les chirurgies préalables aux expériences étant invasives, nous prendrons grand soin des anesthésies réalisées avec des tests à la douleur réguliers. De plus, une surveillance régulière sera effectuée auprès des animaux afin de s'assurer de leur bien-être constant. Dans le cas contraire on choisira une injection supplémentaire d'anesthésiant ou le sacrifice de l'animal. Les animaux sont hébergés dans des cages sur des portoirs ventilés, avec alimentation et eau illimitée, et avec un enrichissement du type bâton de bois et papier kraft.

- Remplacer : il nous est malheureusement impossible de remplacer l'animal car nous avons besoin d'un système biologique intègre : de l'œil jusqu'au cerveau. Cependant, des premiers essais in-vitro et ex-vivo ont déjà été réalisés pour les méthodes de restauration visuelles qui seront testées sur le rat de façon in-vivo.

4895. Malgré l'existence d'un vaccin pour lutter contre le virus de l'hépatite B cette infection virale reste une priorité de santé publique. Le nombre de personnes atteintes par ce virus est estimé à 240 millions dans le monde. Ces personnes porteuses sont un réservoir potentiel pour sa dissémination et présentent un fort risque de développer une cirrhose hépatique ou un hépatocarcinome. Plus de 780 000 personnes meurent chaque année des suites d'une infection par l'hépatite B.

Chez ces patients, la disparition des antigènes HBs (HBsAg) sériques signe l'élimination complète du virus ce qui permet l'arrêt du traitement, les risques de développement de complications hépatiques étant alors très faibles. Les traitements actuels parviennent à contenir l'infection mais la disparition complète des HBsAg n'est observée que chez 10% des patients. Le virus contenu dans le noyau des cellules sous forme d'ADN super-enroulé peut se réactiver dans le cas d'une immunodépression. C'est pourquoi il est important de développer de nouvelles approches thérapeutiques permettant l'élimination complète du virus.

Les tests in vitro, effectués pour valider l'efficacité de nouvelles molécules, ne permettent pas d'appréhender l'intégralité des mécanismes de l'infection et de l'interaction hôtes/pathogènes. C'est pourquoi, le recours à des modèles expérimentaux in vivo s'avère nécessaire pour tester les cibles et les composés et également anticiper leur éventuelle toxicité dans ces conditions complexes de relation hôte/pathogène.

Afin d'étudier les mécanismes de l'infection et de la persistance du HBV in vivo et l'efficacité des approches thérapeutiques, nous avons choisi de mettre en place des modèles d'infection chez la souris. Ils sont basés sur l'injection du virus HBV couplé à un vecteur permettant le contrôle de son expression et sa localisation au niveau du foie. Ces modèles, sont considérés complémentaires des modèles in vitro pour la recherche de nouvelles molécules anti-HBV.

Le nombre d'animaux utilisés pour ce projet est de 12500 rongeurs pour 5 ans, avec des impacts de gravité légers à modérés sans réutilisation. Une observation quotidienne est réalisée pour tous les modèles, la fréquence de cette observation est adaptée selon la durée et la sévérité du modèle.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Les tests in-vitro sont développés pour répondre aux questions sur l'activité ou la toxicité des produits avant d'être évalués dans un modèle in vivo. En effet, à ce jour, il n'existe aucune méthode évitant totalement le recours à l'animal selon les exigences réglementaires de tous les pays de destination des produits.

Réduction :

Le schéma expérimental des procédures de ce projet s'appuie sur des données bibliographiques. Ces expériences feront l'objet d'une revue par des biostatisticiens afin de calculer au plus juste le nombre d'animaux à utiliser tout en permettant un support au dossier réglementaire «Common Technical Document».

Raffinement Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement, dans des locaux conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé. Dès que possible, une anesthésie générale ou locale est pratiquée et des points limites sont mis en place dans les études pour limiter la souffrance des rongeurs.

4896. Au cours des 2 dernières décennies, l'importance du goût dans le choix des aliments et le comportement alimentaire de l'homme, dans des conditions normales et pathologiques a été démontrée. Un lien quasi direct a été établi entre la formation et la fonction des organes sensoriels du goût et le comportement alimentaire. En effet, la perte ou le dysfonctionnement du sens du goût est dû dans plusieurs cas (chimiothérapie, dépression, tabac etc.) à la perte des organes sensoriels gustatifs et peut avoir des conséquences négatives sur l'alimentation et la santé des patients. Comprendre comment ces organes se forment au cours du développement des vertébrés mais aussi comment ils régénèrent pourraient nous aider à cibler des traitements pharmacologiques qui permettent de rétablir le sens du goût chez les patients.

L'objectif de ce projet est d'analyser les mécanismes moléculaires et cellulaires de la formation des organes sensoriels du goût qui sont localisés dans la bouche et le pharynx.

Plus généralement, d'analyser le développement du système gustatif dans son entité afin d'examiner de façon compréhensible la mise en place de sa fonction au cours du développement.

Nous avons choisi comme modèle le poisson zèbre, un excellent modèle génétique. Cette analyse sera faite au cours de l'embryogenèse principalement avant le moment que les embryons poisson zèbre commencent être autonomes (0-5j) et chez les alevins de 5.5-45 jours après fécondation.

Un avantage supplémentaire de ces stades est que l'oropharynx, les neurones sensoriels gustatifs et les noyaux gustatifs sont superficiels.

La responsable du projet a une très longue expérience sur l'utilisation du poisson zèbre (2000-2017).

L'utilisation des embryons du poisson zèbre pour ce projet est en faveur des 3R :

D'abord, l'imagerie in vivo sur des embryons du poisson zèbre évite la chirurgie, intervention nécessaire chez la souris vu que le système se développe in utero chez les mammifères. La plupart des expériences sera effectués sur des embryons âgés de moins de 5 jours (900 embryons) et 200 alevins de 5.5j-45j seront utilisés pour des expériences.

Des poissons adultes (600 adultes pour 5 ans, dont 100 issus de transgénèse) seront utilisés pour la reproduction (entretenir les lignées sauvages, transgéniques et mutantes) et afin d'obtenir des embryons. Ces adultes sont euthanasiés avec une méthode non décrite dans la Directive, mais selon des études plus récentes que la Directive, mieux adaptée au poisson zèbre et donc les adultes reproducteurs sont comptabilisés. Donc, total: 600 adultes et 200 alevins de 5.5-45jours=800 animaux sur 5 ans.

4897. La paraplégie spastique héréditaire de type SPG11 est une forme précoce et très sévère d'affection neurologique se traduisant par une atteinte de la motricité des membres inférieurs et une atteinte mentale variablement associée à une atteinte cérébelleuse et du système nerveux périphérique. Des mutations de type perte de fonction ont été trouvées chez les patients dans le gène SPG11/KIAA1840 et rendent compte de 20% des cas de paraplégies spastiques transmises selon un mode autosomique récessif.

Dans le but de comprendre les fonctions du produit de ce gène, la spatacine, et ainsi comprendre les mécanismes à l'origine de la pathologie chez les patients, nous étudions un modèle souris mimant l'inactivation de ce gène (Knock-out). L'étude de ce modèle au cours du temps (état clinique) et après autopsie à différents temps nous permettent de mieux comprendre les processus mis en cause afin d'envisager des voies d'intérêt thérapeutiques dans l'avenir. De plus ce modèle souris représente un outil de choix pour tester des molécules pharmacologiques afin de ralentir ou inverser le processus pathologique. Nous nous efforçons à raffiner nos expérimentations et à réduire toutes les occasions susceptibles de causer des souffrances inutiles à l'animal. Nous réduirons, dans la mesure des règles de la signification de la statistique, le nombre de souris utilisé dans chaque procédure expérimentale. La culture cellulaire de fibroblaste embryonnaire (MEF, pour mouse embryonic fibroblast) a pour objet aussi de remplacer les souris. Nous utilisons pour l'ensemble du projet 517 souris.

4898. Les formes ultrarésistantes de tuberculose (TB XDR) sont dues à des souches de *Mycobacterium tuberculosis* ayant de nombreuses résistances et en particulier aux fluoroquinolones qui aggravent la mortalité qui peut atteindre jusqu'à 50%. Toutefois certaines de ces souches dites résistantes aux fluoroquinolones, sont en fait résistantes à l'ofloxacine mais gardent une sensibilité partielle à d'autres fluoroquinolones comme la moxifloxacine ou la lévofloxacine. Notre objectif est de répondre à trois questions : (i) y a-t'il un intérêt à ajouter une fluoroquinolone à une polychimiothérapie utilisée pour le traitement d'une TB XDR, (ii) si oui, quelle est la meilleure fluoroquinolone, moxifloxacine ou lévofloxacine ? et (iii) pour quelle mutation/niveau de sensibilité l'ajout d'une fluoroquinolone est bénéfique dans le traitement ?

A partir d'une banque de mutants représentant les plus fréquemment retrouvés en pratique clinique, nous évaluerons in vivo quelle est la fluoroquinolone la plus active : la moxifloxacine d'une part, mais aussi la lévofloxacine. L'activité des fluoroquinolones sera évaluée dans un modèle murin (souris balb/c/j), en monothérapie et en association avec la bédaquiline et le linezolid utilisés pour le traitement des TB XDR. Cette activité in vivo sera corrélée au génotype des mutants ainsi qu'à la mesure de l'activité in vitro par différentes méthodes couramment utilisées dans les laboratoires de bactériologie.

Une fois que ces données seront disponibles, elles permettront l'application d'un traitement rapide et personnalisé des TB XDR, ce qui est essentiel pour une lutte antituberculeuse efficace.

Avant l'établissement de nos procédures, nous avons pris en compte la règle de 3R :

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

Au total, le nombre d'animaux est de 2320.

4899. Le cervelet est une région du cerveau très importante, impliqué dans le raffinement des activités cérébrales. Cette structure est nécessaire à la réalisation de mouvements coordonnés et précis. Le niveau de computation que requiert le cervelet est très élevé, correspondant aux très grands nombres de neurones cérébelleux présents (cette structure ayant le plus grand nombre de neurones dans le cerveau). Même si de nombreuses études sont en cours, les questions de « comment sont générés ces neurones », « quels sont les facteurs qui contrôlent le développement de ces neurones » et « quels sont les cellules progénitrices de ces neurones » restent à éclaircir. Par ailleurs, nous nous intéressons au développement pathologique de ces neurones du cervelet dans le cadre des médulloblastomes, tumeurs les plus communes chez l'enfant. Le présent projet nécessite l'utilisation de 400 souris pour 5 ans. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place de ce projet : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est

réduit au maximum pour nous permettre de générer des données exploitables ; 2) raffinement, les procédures sont adaptées à l'espèce et sont réalisées en réduisant au maximum le stress et la douleur des animaux; 3) remplacement, les études in vitro et sur animaux invertébrés ne permettent pas d'étude complexe du système nerveux central et du cervelet en particulier, le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type de projet de recherche.

Les animaux génétiquement modifiés nécessaires à la réalisation de ce projet ont été générés chez la souris. De plus, les organes/tissus étudiés dans l'étude ne sont pas présents dans les organismes invertébrés.

4900. La maladie d'Alzheimer (MA) est une affection neurodégénérative du cerveau entraînant des désordres cognitifs (ex: mémoire spatiale) et qui pose un problème majeur de santé publique en raison du nombre de patients et de l'absence de traitement efficace. Notre projet vise à chercher de nouvelles cibles potentielles pour le traitement de la maladie en étudiant les performances cognitives de différentes souris modèle de la maladie d'Alzheimer ayant soit été génétiquement modifiée, soit traitée avec différentes molécules.

Pour cela, nous étudierons les performances des souris dans deux tests de navigation, la piscine de Morris et le « Starmaze ». Nous serons aussi amenés à utiliser des tests de mémoire non spatiale, le « Y-maze » et le « fear conditioning ».

Nous utiliserons sur 5 ans un total de 440 souris. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : Pour la réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides. De plus chaque animal effectuera les deux tests de navigation afin d'éviter d'utiliser un lot de souris par test de navigation. Pour le raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux. Enfin, pour le remplacement, les études in vitro et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes, dans notre cas l'étude de la mémoire spatiale et la navigation, le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude.