



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

Résumés non techniques des projets autorisés (49)

4901. L'administration d'un médicament à l'homme est assujettie à la connaissance de ses propriétés pharmacocinétiques qui traduisent son comportement au sein d'un organisme vivant. Ces propriétés permettent de définir la dose appropriée ainsi que la voie, la fréquence et la durée des administrations.

Ce projet consiste à étudier sur le plan cinétique le devenir d'une nouvelle entité chimique et/ou biologique chez l'animal de laboratoire. L'étude consiste à administrer le produit testé par voie orale, locale (par dépôt) ou parentérale (par injection) à des animaux de laboratoire et à effectuer des prélèvements de sang séquencés sur plusieurs heures ou plusieurs jours pour en étudier l'absorption (passage vers la circulation générale), la distribution (passage de la circulation générale vers les organes et les tissus), le métabolisme (dégradation des produits par l'organisme) et l'élimination. Le produit testé et éventuellement ses produits de dégradation (métabolites) sont recherchés et quantifiés dans les prélèvements. Les données obtenues permettent de calculer de façon mathématique des paramètres pharmacocinétiques qui caractérisent le comportement du produit testé dans l'organisme. Les paramètres obtenus chez l'animal servent à :

- Expliquer l'activité et/ou la toxicité du produit étudié chez l'animal,
- Déterminer, au travers de modélisations mathématiques, la première dose qui sera administrée à l'homme,
- Prédire le comportement du produit testé chez l'homme ainsi que les conditions futures d'administration (forme galénique, voie d'administration, fréquence d'administration et durée du traitement),
- Eclairer un évènement particulier susceptible d'apparaître lors d'une étude clinique chez l'homme, par exemple une cinétique non linéaire.

Le bénéfice attendu de ce projet est considérable dans les étapes de développement d'un nouveau médicament car il va permettre de déterminer la première dose administrée à l'homme ainsi que les conditions de cette administration de façon à garantir la sécurité d'utilisation. Les procédures mises en œuvre chez l'animal de laboratoire sont simples (administration d'un candidat médicament) et peu invasives (prélèvements de sang, de fèces ou d'urine).

Il n'est pas possible de remplacer ces études par des modèles mathématiques ou cellulaires, trop éloigné d'un organisme vivant complet avec toutes les interactions anatomiques et fonctionnelles associées, même si ces modèles apportent des informations pertinentes dans des étapes très précoces de développement. L'évolution récente et continue des technologies adaptées au dosage des médicaments dans des échantillons biologiques permet de réduire, parfois considérablement, le nombre d'animaux utilisés. En effet, chez les petites espèces (rongeurs), les volumes sanguins très faibles sont désormais suffisants pour effectuer un dosage, permettant ainsi de réaliser plusieurs prélèvements sur un même animal et réduire jusqu'à 75% l'effectif d'une étude. L'habituation des animaux pendant les phases d'acclimatation, l'enrichissement de leur milieu (ex : tunnels ou igloo pour les rongeurs, balles pour les chiens et les porcs, ...) et une surveillance particulière de leur comportement tout au long de l'étude sont autant de moyens de raffinement mis en œuvre.

Le nombre d'animaux nécessaire est déterminé en fonction de la variabilité des mesures et du volume de prélèvement minimal requis. Un effectif maximal de 13332 animaux sur 5 ans (6000 souris, 6000 rats, 1200 cobayes, 60 lapins, 60 porcs et 12 chiens) est nécessaire pour la conduite de ce projet.

4902. Le modèle de réponse d'hypersensibilité retardée (DTH) chez le primate-non-humain (PNH) est un « standard » pour évaluer de manière peu invasive les réponses immunes cellulaires et humorales chez l'homme et l'animal, ainsi que le potentiel thérapeutique et l'efficacité de nouvelles stratégies d'immunothérapie. Par ailleurs, puisque ce modèle fait appel à une réponse cellulaire inflammatoire cutanée, il est également considéré comme un modèle préclinique « relevant » de divers pathologies auto-immunes et/ou inflammatoires chroniques, telles que le psoriasis.

Brièvement, ce modèle consiste à immuniser des animaux contre un antigène donné : la tuberculine ou l'anatoxine tétanique par injection de vaccins utilisés chez l'homme : le BCG ou vaccin antitétanique, puis à étudier la réponse mémoire induite par la vaccination par injection intradermique de ce même antigène (intra-dermoréaction : IDR). Ce modèle permet d'étudier l'effet de l'injection de drogues immunosuppressives ou immunomodulatrices sur la réponse primaire (lors de la vaccination) ou sur la réponse secondaire (lors du rappel).

L'interaction interleukine 7 (IL7)- IL7 récepteur (IL7-R) est cruciale pour l'homéostasie des lymphocytes T (LT). Comme ces cellules jouent un rôle essentiel dans les réponses immunes cellulaires et humorales, cette interaction IL7/IL7-R représente une cible thérapeutique potentielle pour la transplantation d'organe et le traitement de diverses pathologies autoimmunes et/ou inflammatoires chroniques, comme ceci a été démontré préalablement chez la souris. Disposant d'une expertise dans le domaine du développement des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique, notre équipe a produit un anticorps monoclonal dirigé contre

l'IL7-R ou CD127 humain, ayant une activité inhibitrice sur les LT. L'équipe a par ailleurs démontré que cet anticorps possède une cross-réactivité avec les primates non-humains (PNH), mais pas avec des espèces plus éloignées de l'homme telles que les rongeurs ou le porc.

Ainsi dans ce protocole expérimental, nous proposons d'évaluer l'efficacité de ces anticorps dans l'induction de tolérance immune dans un modèle préclinique de réponse d'hypersensibilité retardée (DTH) chez le PNH.

Le nombre maximum d'animaux utilisés au cours de cette étude sera de 8. Dans un souci de respect de la règle des 3R, l'étude de pharmacocinétique/ pharmacodynamique de la molécule sera conduite de façon simultanée à la DTH sur les mêmes animaux. Chaque animal sera son propre contrôle dans l'évaluation de sa réponse à la DTH puisque les animaux recevront une première IDR avant traitement. Par ailleurs, un groupe d'animaux dits « contrôles » (sans traitement) recevra plusieurs IDR consécutives, itératives et servira de référence pour cette étude et les études suivantes.

De façon à diminuer le stress, la souffrance, et la douleur, toutes les procédures seront réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure. Les animaux seront hébergés avant le protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental les individus traités seront hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères.

4903. La France a été confrontée en avril 2012 à un foyer de brucellose dans un élevage bovin laitier en Haute-Savoie, département considéré indemne depuis le dernier foyer recensé en 1999 au nord du même massif. Une souche de *Brucella melitensis* biovar 3 a été, en effet, isolée dans le lait d'une vache qui venait d'avorter. Un lien épidémiologique a ensuite été établi entre ce foyer bovin et deux cas de brucellose humaine dont le premier avait été détecté en janvier 2012, suite à la consommation de fromage frais au lait cru produit avec le lait de ce troupeau. Depuis cet évènement, de larges investigations ont été conduites, à la fois parmi les ruminants domestiques résidents permanents ou en estive, et parmi les ruminants sauvages du massif du Bargy. Elles ont permis de mettre en évidence des animaux sauvages infectés de brucellose, notamment des bouquetins et d'émettre l'hypothèse que ces animaux aient pu jouer le rôle de réservoir et ainsi assurer un relais « silencieux » entre le dernier foyer domestique de 1999 et ce foyer de 2012.

Le projet national consiste à vacciner les bouquetins du Bargy contre la Brucellose en utilisant le vaccin commercial servant aux élevages des ovins et des caprins. En effet, le bouquetin est une espèce proche de la chèvre, mais nous ne savons pas comment cette espèce sauvage réagira au vaccin (séroconversion et diffusion chez le bouquetin). La chèvre est un modèle animal connu et dont on connaît la réponse immunitaire et le développement physiopathologique à ce vaccin commercial et sera le témoin positif du projet national. Nous pourrions ensuite comparer les données expérimentales acquises sur les deux espèces génétiquement proches.

Notre projet d'expérimentation consiste à mener une étude vaccinale chez la chèvre domestique pour confirmer l'innocuité du vaccin administré par voie conjonctivale. Il y aura donc 10 caprins répartis en 2 lots, un lot de 5 chèvres et un lot de 5 boucs. Une autre expérimentation menée en parallèle chez l'espèce sauvage cible, le bouquetin, sera faite dans un autre établissement utilisateur. Cette expérimentation vise à décrire la diffusion du vaccin dans les organes des deux espèces chez des individus vaccinés (8 individus) et témoins « contact » (2 individus) sexuellement matures des deux sexes, en évitant toutefois les individus gestants. L'appréciation de la diffusion de la souche vaccinale suppose de réaliser une euthanasie séquentielle pour examiner la présence de la bactérie dans les organes des animaux. Remplacement et réduction : en l'absence de méthode alternative pour mesurer l'efficacité vaccinale, le nombre d'animaux inclus dans le protocole a été déterminé grâce au plan d'expérience utilisé pour évaluer l'efficacité du vaccin et la capacité de l'autre expérimentation à maintenir des bouquetins semi-sauvages confinés. Raffinement : il y aura un enrichissement social, en fonction du sexe et la visite bi-journalière des techniciens animaliers (vie en groupe) et de structure (paillage, tremplin, mise en place de ballon et de pierre de sel).

4904. Dans une cellule normale, la réplication cellulaire s'accompagne d'un stress qui génère des espèces réactives d'oxygène (ROS) et provoque des cassures de l'ADN qui, lorsqu'elles sont en grand nombre, peuvent provoquer la mort des cellules, et donc perturber le développement embryonnaire, en particulier au niveau du système nerveux central. En effet, la mort des cellules souches et des progéniteurs neuronaux peut se traduire par une réduction des couches corticales du cerveau se traduisant à la naissance par une microcéphalie (cerveau de petite taille). Il a également été démontré que les ROS sont impliqués dans le vieillissement, et dans un certain nombre de pathologies, telles que les maladies neurodégénératives et les cancers.

Sur un modèle de souris déficientes pour la réparation de l'ADN, notre laboratoire a déjà mis en évidence une importante mortalité des cellules souches et des progéniteurs nerveux (CSPN) du cortex cérébral embryonnaire qui pourrait être, entre autre, liée à une libération anormale de ROS.

Le but de ce projet est de déterminer l'impact du niveau de ROS sur le développement cérébral embryonnaire et de mettre en évidence d'éventuelles conséquences de l'excès de ROS au cours de l'embryogénèse sur le comportement des souris à l'âge adulte.

Le recours à l'animal vivant est indispensable pour répondre aux objectifs du projet, faute de méthode alternative disponible à ce jour pour le remplacer. Le modèle rongeur a été retenu avec un nombre d'animaux à 7 femelles gestantes par lot. Ce nombre a été ramené au minimum nécessaire compatible avec l'utilisation de tests statistiques adaptés à l'étude, tout en permettant d'assurer la validité des résultats. Au total 478 animaux seront nécessaires à cette étude qui durera un an.

Cette étude repose sur la mise en œuvre d'injections intrapéritonéales quotidiennes d'inhibiteurs de ROS réalisées sur des femelles gestantes normales et déficientes à différents temps au cours de la gestation. L'impact des inhibiteurs de ROS sur le comportement

des souriceaux mâles sera évalué à l'âge adulte (3 mois) par différents tests cognitifs, tout au long de la vie de l'animal. Les animaux seront euthanasiés à l'âge adulte afin d'analyser précisément les couches corticales du cerveau par une étude histologique.

Tous les animaux sont hébergés selon les règles en vigueur dans l'animalerie. Le suivi quotidien des rongeurs, hébergés en groupe, ainsi que l'apport d'enrichissement de milieu sous forme de copeaux ou de modules pour se blottir, garantiront leur bien-être. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Leur état de santé sera surveillé tout au long de l'expérience, afin d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

4905. 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.

La présente étude correspond à l'évaluation de la toxicité chronique sur les premiers stades de la vie de poissons en suivant la ligne directrice OCDE 210 ou une méthode équivalente. Elle permet de déterminer les effets létaux et sublétaux des substances chimiques (à une concentration maximale de 10mg/L) sur les premiers stades de développement des espèces étudiées. Un test complet nécessite 480 poissons. Dans le cadre de notre demande effectuée pour une période de 5 ans, 35000 poissons seront potentiellement utilisés ce qui correspond à l'évaluation de 70 substances maximum.

Dans le respect de la règle des 3R (Raffiner, Réduire, Remplacer) ces essais sont requis dans un cadre réglementaire quand la substance est susceptible d'induire un risque de toxicité à long terme sur les poissons. Afin de réduire, le nombre d'animaux utilisés, la concentration limite est fixée à 10 mg/L.

Dans un contexte de raffinement, 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.

Enfin, il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode alternative permettant de remplacer l'utilisation des poissons pour ce type d'essai.

4906. Le métabolisme par l'homme de composés exogènes (contaminants de l'environnement) et de médicaments (anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, ...) est un enjeu majeur de santé publique. Le métabolisme s'effectue principalement au niveau du foie et est catalysé par des enzymes présentes dans la fraction subcellulaire appelée fraction microsomes. Des traitements d'induction spécifiques par certains composés conduisent à l'expression de différentes formes de ces enzymes qui possèdent alors des activités métaboliques distinctes.

Afin de prédire le métabolisme chez l'homme et la formation éventuelle de métabolites toxiques, des essais in vivo sur l'animal sont nécessaires. Toutefois, les essais in vitro utilisant des microsomes sont reconnus comme une méthode alternative à l'expérimentation animale satisfaisant la règle des 3R en permettant de largement réduire le nombre d'animaux engagés dans les études in vivo ultérieures. Ils permettent par ailleurs d'identifier les principales voies enzymatiques impliquées.

Ce projet a pour but de préparer des fractions microsomes hépatiques de rats.

Les animaux du projet recevront un traitement d'induction par voie péritonéale pendant quatre jours consécutifs à raison d'une injection par jour. Six traitements indépendants seront utilisés sur des lots d'animaux différents. Ces injections seront faites par des personnes qualifiées et expérimentées. Selon notre expérience de plusieurs dizaines d'années, ces injections ne causent pas de douleurs spécifiques chez l'animal ; toutefois, les animaux seront surveillés régulièrement pendant les quatre jours de traitement pour éviter toute souffrance aux animaux. Après un jeûne d'une nuit suivant la dernière injection, les rats seront sacrifiés et le foie sera prélevé immédiatement. Notre projet prévoit l'utilisation maximale de 180 rats sur une période de 5 ans. Il nous permettra de réaliser les études in vitro d'un grand nombre de candidats médicaments et orientera la recherche des voies de métabolisme avant les études in vivo. Cette démarche permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaires aux expériences in vivo futures.

4907. Il apparaît de plus en plus clairement que seule la combinaison de plusieurs traitements qui ciblent différents processus liés au cancer aura une réelle efficacité dans la lutte contre ce problème de santé publique majeur.

1- Ce projet repose sur l'idée que l'inhibition de la croissance des vaisseaux qui alimentent une tumeur permettrait de la détruire. Nous avons démontré le rôle d'une protéine qui cible simultanément plusieurs molécules clés de la vascularisation et de la croissance tumorale in vitro. Ces observations nous ont amenés à mettre en place une nouvelle stratégie anti-tumorale basée sur les propriétés multi-cibles de cette protéine. Nos premiers résultats ont été très encourageants. Nous avons établi que son injection intra-tumorale dans des tumeurs sous-cutanées, préétablies dans un modèle de rongeurs immunodéficients, ralentit la croissance de ces tumeurs et inhibe de façon spectaculaire leur vascularisation. Le projet de recherche que nous soumettons ici vise à optimiser notre stratégie en augmentant l'efficacité de cette protéine. Nous avons récemment généré une version tronquée de la protéine d'intérêt qui s'est révélée beaucoup plus stable et plus active. Notre objectif est d'évaluer l'efficacité anti-tumorale de cette nouvelle protéine chez les rongeurs avec et sans système immunitaire acceptant la greffe de cellules tumorales humaines du sein.

2- Nous avons démontré que des peptides capables de bloquer la formation de grands assemblages supramoléculaires de la chromatine dans le noyau des cellules inhibent la prolifération de lignées tumorales *in vitro* ainsi que leur caractère invasif. Notre objectif est d'évaluer l'efficacité anti-tumorale de ces peptides sur les rongeurs avec et sans système immunitaire acceptant la greffe de cellules tumorales humaines du sein.

L'optimisation de ces 2 stratégies précliniques ouvre des perspectives prometteuses et représente deux approches novatrices dans le domaine des thérapies anti-tumorales existantes.

Le projet portant sur des approches thérapeutiques, il n'est pas possible d'obtenir l'ensemble des réponses en utilisant un modèle cellulaire. Nous avons retenu un modèle rongeur, élevé dans des établissements agréés. Seul cet animal est suffisamment connu et caractérisé génétiquement pour pouvoir comprendre les mécanismes mis en jeu. Le nombre d'animaux (n=306) a été déterminé grâce aux expériences réalisées dans le cadre d'un précédent projet. Cette approche nous a permis de réduire au minimum nécessaire le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille d'observation clinique permettant de limiter les contraintes pour les animaux. L'utilisation de cette grille nous permet d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements antalgiques appropriés.

4908. La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Elle se caractérise par une mort sélective des neurones moteurs situés dans le système nerveux central, par de l'atrophie musculaire et de la paralysie. Le décès des patients intervient trois à cinq ans après diagnostic.

L'axe principal de la pathologie correspond à l'axe moteur, et les principaux tissus impliqués dans la pathologie sont la moelle épinière, les nerfs moteurs et les muscles squelettiques. L'étude de l'interaction de ces 3 acteurs est la clé de la recherche sur cette pathologie. Une partie des cas de SLA est d'origine familiale (SLAF), et des mutations dans plus de 10 loci sont actuellement connues pour provoquer la SLAF. Nous disposons au laboratoire de deux modèles murins de la maladie basés sur des mutations du gène *Fus*, qui provoquent les formes les plus sévères de la maladie avec des patients débutant les symptômes entre 15 et 30 ans et décédant en quelques mois. La cause de la mort des motoneurones est en partie à rechercher dans les motoneurones eux-mêmes et nous proposons ici de caractériser les anomalies dans les motoneurones de ces deux modèles murins. Pour cela, nous utiliserons des techniques de biologie moléculaire pour identifier les gènes exprimés différemment dans les motoneurones de souris malades par rapport aux souris contrôles. Ces gènes constituent des cibles thérapeutiques pour de futures études. Les données issues de ces expériences sont des données de séquençage massif qui seront analysées statistiquement par des techniques classiques de biostatistiques. Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation des protocoles. Les groupes expérimentaux ont été réduits au maximum pour permettre une robustesse statistique et 92 animaux seront inclus dans l'étude. Le remplacement par des approches alternatives n'est pas possible car la complexité des unités motrices et l'implication de plusieurs types cellulaires excluent l'utilisation de modèles cellulaires et rendent incontournable l'utilisation de modèles animaux. Enfin, l'enrichissement de l'environnement des animaux, le maintien des interactions sociales, une surveillance quotidienne, ainsi que le recours à une analgésie post-opératoire permettront de limiter la souffrance des animaux et de s'assurer de leur bien-être.

4909. Ce projet concerne l'identification de marqueurs moléculaires d'une structure cérébrale, la tVTA. Cette structure est un centre de contrôle inhibiteur de l'activité de neurones contenant de la dopamine qui, dans le cerveau, sont importants dans l'étiologie ou le traitement de diverses pathologies neurologiques ou psychiatriques, comme la maladie de Parkinson, l'addiction, la schizophrénie ou la dépression. Pour progresser dans la compréhension des fonctions de la tVTA et permettre notamment de moduler sélectivement son activité, il est aujourd'hui nécessaire de disposer de marqueurs sélectifs de cette structure cérébrale en conditions contrôle et pathologique. Ce projet vise à identifier les marqueurs génomiques de la tVTA ainsi que leurs modifications d'expression dans des modèles de dépression d'étiologie diverse. En accord avec la règle des 3R: ce projet nécessitera un maximum de 240 rats sur une période de 5 ans; il nécessite de travailler sur animal entier; durant les expériences les animaux (rats) seront hébergés en cages collectives (2 ou 3 animaux/ cage), du matériel de nidation (frisure) ainsi que des barreaux à ronger seront mis à la disposition des animaux, les animaux ont un accès libre à la nourriture et l'eau et sont stabulés sous cycle lumière/obscurité de 12h, à température et hygrométrie contrôlées.

4910. Le projet correspond à l'ensemble des procédures techniques (administrations et prélèvements) qui peuvent être réalisées dans le cadre d'une étude (toxicologie, pharmacocinétique, biodistribution...), chez des rongeurs ou non-rongeurs, de façon à doser les niveaux dans le sang, l'urine ou autre liquide biologique d'une substance administrée (ou de ses métabolites), et/ou de réaliser des évaluations de biologie clinique (hématologie, coagulation, biochimie sanguine, analyses urinaires...) après administration d'une substance.

Les techniques d'administration correspondent aux principales techniques couramment utilisées en expérimentation animale, à savoir l'administration intrapéritonéale, per os, sous-cutanée, intraveineuse, intracérébroventriculaire, intramusculaire, intraduodénale, intraplantaire, intratrachéale, intrathécale, intracolonne, intradermique, intracaecale, intranasale. L'administration dans le genou, et celle dans la cheville, ainsi que l'administration après mise en place d'une pompe osmotique sont également décrites dans ce projet. Les espèces animales concernées sont celles couramment utilisées en expérimentation animale, tels que les rats, souris, cobayes, gerbilles, hamsters, lapins, chiens, furets, porcs.

Les techniques de prélèvement correspondent aux principales techniques couramment utilisées en expérimentation animale, à savoir les prélèvements de sang au sinus rétro-orbitaire (rat, souris, cobaye, gerbille), à la veine sublinguale (rat), par ponction

cardiaque (avec ou sans thoracotomie; souris, rat, cobaye, gerbille, furet), veine caudale (rat, souris), à la veine submandibulaire (souris), à l'aorte abdominale (rat, souris), à la veine saphène (cobaye, rat, chien), à la veine cave crâniale (furet, cochon), à la veine céphalique (furet, chien), à la veine jugulaire (cochon, chien), à la veine marginale de l'oreille (lapin), à l'artère centrale (lapin). Des prélèvements de sang répétés peuvent également se faire après cathétérisation de la veine jugulaire chez les espèces rongeurs et le lapin. Dans ce cas, cette technique nécessite une chirurgie préalable aux prélèvements. D'autres techniques de prélèvement peuvent également être appliquées pour le recueil de fluides biologiques tels que l'urine, le liquide céphalo-rachidien... Le prélèvement d'urine se fait par mise en place d'une sonde vésicale (chien, rat) ou par ponction de la vessie (rat, souris).

Ces techniques nécessitent l'utilisation d'animaux de laboratoire et ne peuvent être efficacement remplacées par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les techniques décrites dans ce projet visent à étudier la distribution d'une substance pharmacologique dans l'organisme vivant, dans son intégralité, et/ou les effets d'une substance sur la biologie clinique. Le nombre d'animaux utilisé pour chaque étude a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des études. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre d'animaux qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 9040. 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.

4911. En 1999, le Comité Permanent de la Convention Européenne pour la protection des animaux dans les élevages a recommandé que des études portant sur des méthodes alternatives à la prise forcée d'aliment chez les palmipèdes soient mises en place dans les pays producteurs de foie gras (articles 24 et 25).

Depuis 2009 des essais ont été réalisés chez l'oie. Ces travaux ont consisté à exploiter le comportement d'hyperphagie (i.e. une importante prise alimentaire spontanée) observé à l'état naturel chez les oiseaux durant la période pré-migratoire pour constituer les réserves énergétiques nécessaires aux vols migratoires et ont permis de montrer que la distribution de maïs sec à volonté pendant 12 semaines, durant la période hivernale et après une phase de restriction alimentaire, associée à une réduction de la durée du jour en bâtiment obscur (de 10 à 7 h/j) durant la période automnale, permettait l'expression d'un comportement hyperphagique transitoire chez le jars, associé à un engraissement spontané très variable du foie. Les mécanismes de l'engraissement hépatique mis en place lors de l'engraissement spontané pourraient différer de manière importante par rapport à ceux mis en place lors du gavage.

Ce projet a pour objectif d'explorer les mécanismes sous-jacents à l'engraissement spontané du foie pour un objectif finalisé d'optimisation du système de production de foie engraisé sans prise forcée d'aliment, mais aussi de déterminer la nature de l'engraissement mis en place. Il vise également à évaluer la possibilité d'induire un engraissement spontané du foie chez les deux sexes. Il repose sur une stimulation de la consommation des oies en phase hivernal, comme effectué dans les essais antérieurs avec 1) des cycles lumineux contrôlés simulant la période pré-migratoire automnale, 2) une alternance entre restriction alimentaire de 13 à 19 semaines d'âge et alimentation à volonté par la suite et 3) un accès à un aliment riche en énergie et avec une forte appétence pour les oies, le maïs, entre 19 et 31 semaines d'âge. Les animaux seront ensuite nourris avec un aliment croissance standard à volonté entre 31 et 35 semaines d'âge.

L'essai sera effectué sur 100 jars qui seront abattus à 31 semaines d'âge afin d'évaluer l'engraissement et certains paramètres physiologiques associés.

Les 100 jars impliqués dans ce projet représentent un nombre optimal d'animaux à utiliser pour observer un effet des modalités testées. En effet, l'engraissement hépatique étant très variable (coefficient de variation de 45 à 75% dans les essais antérieurs) des effectifs de 100 animaux expérimentaux sont nécessaires afin d'obtenir une puissance statistique suffisante. Aucune procédure provoquant de la douleur ne sera appliquée aux animaux durant leur élevage. Les oies expérimentales seront élevées en logement fermé à partir de 15 semaines d'âge jusqu'à leur abattage pour contrôler la durée d'éclairage. La conduite alimentaire permettra aux animaux de couvrir leurs besoins d'entretien tout au long du protocole.

4912. L'étude des interactions entre les pathogènes et leurs hôtes vertébrés, nécessite de travailler in vivo avec des modèles animaux. Après avoir travaillé des années sur des modèles mammifères, l'équipe impliquée dans le projet qui fait l'objet de cette demande a fait le choix d'adopter la stratégie 3R (Remplacement, Raffinement et Réduction) pour poursuivre ses travaux. C'est dans ce cadre, que depuis une quelques années l'équipe a fait le choix de travailler sur le modèle poisson zèbre (Remplacement). Le gros avantage du modèle réside dans l'étude de l'embryon qui offre de nombreux avantages l'étude de certaines maladies infectieuses. En effet, du fait de sa transparence optique, le suivi par imagerie permet de Réduire de façon substantielle le nombre d'animaux nécessaires à mener convenablement les études. De surcroit, les très nombreux outils génétiques et immunologiques disponibles permettent de Raffiner les expériences et donc d'obtenir des résultats beaucoup plus robustes et statistiquement plus significatifs.

Afin de compléter l'arsenal d'outils disponibles, l'équipe s'est aussi engagée dans la construction de lignées transgéniques qui puissent être utilisées pour l'étude des interactions hôtes pathogènes

Le but du présent projet est de développer des modèle d'infection de plusieurs bactéries incluant des bactéries du genre pseudomonas, des mycobactéries non tuberculeuses, incluant *M. abscessus* ou *M. marinum* (un pathogène naturel du poisson) dans l'embryon de poisson zèbre afin de :

1) Comprendre comment- ces bactéries interagissent avec le système de défense de l'hôte infecté,

2) identifier des gènes impliqués dans la virulence de ces bactéries,

3) comprendre la susceptibilité accrue de patients atteints de mucoviscidose aux infections causées par ces bactéries pathogènes.

De plus, l'embryon de poisson zèbre étant particulièrement adapté au criblage, nous testerons des approches thérapeutiques innovantes pour identifier de nouvelles molécules anti-bactériennes, qui sont fortement attendues en clinique du fait de la propagation extrêmement rapide des résistances et multi-résistances aux antibiotiques actuellement disponibles.

Nous estimons avoir besoin de 2800 embryons sur une période de 5 ans, pour mener à bien l'analyse statistiquement solide de la virulence d'une douzaine de nouveaux mutants bactériens. Une importante partie de nos travaux sera réalisée avec des embryons de moins de 5 jours post-fécondation, non soumis aux règles éthiques qui s'appliquent aux embryons âgés de plus de 5 jours.

4913. La capacité à estimer le temps est cruciale pour l'adaptation des organismes à leur environnement. Elle permet, entre autres, de mieux se préparer à agir et de planifier des conduites en prévision d'événements. Comment la durée de stimuli ou d'actes moteurs dans une gamme de temps relativement brève (de quelques centaines de milliseconde à quelques secondes) est-elle représentée dans le cerveau? Cette question est actuellement au centre de nombreux travaux qui désignent un système sous-cortical, les ganglions de la base, comme un composant essentiel du réseau de structures cérébrales impliquées dans le traitement des informations temporelles. En particulier, diverses pathologies neurologiques et psychiatriques associées à un dysfonctionnement des ganglions de la base (maladie de Parkinson, troubles compulsifs) se caractérisent par des anomalies comportementales susceptibles de refléter, au moins en partie, un défaut de prise en compte du contexte temporel, aboutissant à un ralentissement moteur ou à une réactivité inadéquate aux sollicitations de l'environnement. Il est également admis que la neurotransmission dopaminergique régule les fonctions du striatum et qu'une atteinte de cette influence modulatrice est la cause de déficits de l'estimation du temps et de l'organisation séquentielle des actions.

Notre projet est centré sur l'étude des mécanismes neuronaux qui sous-tendent l'estimation du temps au niveau du striatum qui est la principale structure des ganglions de la base. Nos objectifs sont les suivants: (1) identifier, à l'échelle neuronale, les mécanismes striataux de traitement des informations temporelles; (2) déterminer si une altération expérimentale de l'innervation dopaminergique du striatum interfère avec la capacité à estimer le temps.

Afin de tenir compte des spécialisations anatomiques et fonctionnelles propres au cerveau du primate, ces travaux seront réalisés chez le singe. On sait que certaines régions associatives du cortex cérébral (aires préfrontales et pariétales) du primate atteignent un degré de différenciation sans commune mesure avec le cerveau du rongeur. Ces régions, connues pour intervenir dans l'estimation du temps, sont une source importante d'afférences au striatum. Par ailleurs, les contraintes imposées par le contexte temporel s'exercent non seulement sur les mouvements du corps, mais aussi sur l'orientation du regard qui joue un rôle fondamental dans le répertoire comportemental des primates, notamment dans les interactions sociales. Une mise en jeu spécifique des régions fronto-pariéto-striatales impliquées dans la perception et le traitement des informations temporelles peut donc participer aux mécanismes neuronaux qui sous-tendent les mouvements d'orientation du regard propres aux primates, qui sont parmi les plus rapides et les plus précis que produit le cerveau des mammifères.

Bien que trois singes soient inclus dans notre projet de recherche, les expériences ne concerneront que deux d'entre eux si les données acquises s'avèrent suffisamment fiables au plan scientifique pour ne pas avoir à inclure de troisième sujet. Nos expériences électrophysiologiques nécessiteront d'habituer des macaques rhésus (*Macaca mulatta*) à des conditions de restriction des mouvements de la tête pour garantir la stabilité des enregistrements neuronaux au niveau de structures profondes du cerveau (striatum). De telles contraintes sont difficilement applicables avec des singes plus primitifs (marmouset, singe-écureuil ou singe capucin) chez lesquels les restrictions de mouvement sont difficiles à tolérer, ces espèces étant spontanément beaucoup plus actives que les macaques. Ainsi, une entrave à leur mobilité risquerait de compromettre les aptitudes mnésiques et attentionnelles requises dans une tâche d'estimation temporelle. Ce sont donc des contraintes méthodologiques (couplage de tests comportementaux et d'enregistrements neuronaux nécessitant une immobilisation de la tête) qui nous font préférer le macaque à d'autres espèces de primate non humain. L'inactivation expérimentale des systèmes neuronaux dopaminergiques prévue dans la partie finale de notre projet sera réalisée chez les mêmes singes utilisés pour l'électrophysiologie. Cette dernière procédure expérimentale visera à mimer le dysfonctionnement observé dans la maladie de Parkinson (déficience dopaminergique) afin d'examiner les conséquences sur la capacité des animaux à estimer le temps. La proximité phylogénétique du modèle d'étude et les protocoles de test mis en œuvre chez le macaque, comparables à ceux employés en psychologie de la perception du temps chez l'homme, rendront les résultats de nos recherches pertinents pour une extrapolation aux situations pathologiques rencontrées en clinique humaine. L'inactivation expérimentale de la neurotransmission dopaminergique par injection systémique ou intracérébrale de neurotoxique est largement employée chez le rongeur (souris, rat) et le singe (marmouset, macaque) pour mieux caractériser les troubles du comportement et les corrélats électrophysiologiques et biochimiques induits par le déficit en dopamine. L'avantage chez le macaque est de permettre de combiner ce type d'inactivation au recueil d'activités neuronales unitaires dans des situations comportementales compatibles avec l'analyse des processus d'estimation temporelle.

La mise en place de ce projet prend en considération, autant que faire se peut, l'application de la règle des 3Rs. Il est impossible de remplacer le modèle singe par un modèle "simplifié" (in vitro, in silico) incompatible avec l'objectif de notre projet qui oblige à travailler chez l'animal vigile, qui interagit activement avec son environnement. Il n'existe pas de solution permettant de remplacer le modèle d'étude sur lequel nous proposons de travailler. Nous avons réduit le nombre d'animaux en tenant compte de la nécessité d'aboutir à des résultats valides au plan scientifique. Bien que trois singes soient inclus dans le projet, il est possible que nous n'ayons à en utiliser que deux, si les résultats et leur interprétation sont probants au plan scientifique. La mise en œuvre de deux procédures expérimentales sur les mêmes animaux permet d'optimiser les données recueillies sur chaque animal. Tous les protocoles décrits dans ce projet répondent au constant souci de limiter les contraintes et les éventuelles souffrances subies par les

animaux en mettant en œuvre tous les moyens disponibles (adaptation des protocoles, surveillance et soins constants, assistance thérapeutique).

4914. Le tétrachlorure de carbone (CCl₄) est couramment utilisé pour induire des fibroses et des cancers hépatiques chez la souris. Il est actuellement considéré par beaucoup comme étant le modèle d'étude le mieux caractérisé sur le plan moléculaire, biochimique, cellulaire, et histologique de ce type de pathologie.

Pour cette raison, de nombreux articles décrivent les effets de l'injection de tétrachlorure de carbone dans de nombreuses situations expérimentales. Chez la souris, les protocoles utilisés varient dans le mode d'administration, les quantités administrées, la lignée utilisée. De plus, les conditions d'hébergement, le régime alimentaire, le sexe et l'âge peuvent affecter le résultat.

Ce projet vise à mettre en place une étude pilote afin d'évaluer la faisabilité et l'intérêt de provoquer un épisode de régénération hépatique transitoire par une injection unique de CCl₄ dans l'objectif de compléter/remplacer un modèle expérimental d'hépatite virale.

Sur le plan scientifique, ce protocole nous permettra de confirmer, dans un second modèle expérimental, que des différences de pathologie que nous observons dans un modèle d'hépatite virale sont effectivement le résultat d'un défaut de prolifération des cellules du foie.

Sur le plan éthique, ce protocole, que l'on anticipe être de classe modérée, sera substitué chaque fois que possible au protocole d'hépatite virale de classe sévère que nous utilisons actuellement. Cette approche respecte donc les exigences de remplacement.

Cette étude pilote s'étendra sur un maximum d'un an, utilisera un nombre maximum de 220 souris des deux sexes, âgées de 8 à 12 semaines. En cas de signes de douleur les animaux seront mis à mort et l'expérience sera répétée soit avec une dose plus faible de CCl₄, soit avec une administration d'antalgiques. Pour cette raison, la procédure devrait être de classe légère.

4915. Etude de l'interaction de *Chlamydia muridarum* avec l'épithélium intestinal de la souris

Objet du projet : recherche fondamentale

L'infection par *Chlamydia trachomatis* est la première cause de maladie sexuellement transmissible d'origine bactérienne chez l'être humain. Dans la majorité des cas l'infection est asymptomatique. Chez certaines patientes, elle prend une forme chronique conduisant à des maladies inflammatoires pelviennes, qui peuvent causer une stérilité ou des grossesses extra-utérines. Les mécanismes sous-jacents à l'infection sont encore mal connus, en particulier les réponses immunes natives et adaptatives à l'infection, ainsi que la façon dont les bactéries parviennent à persister dans l'individu en dépit de ces réponses. Il a été montré dans de nombreuses espèces dont la souris que l'intestin est un réservoir pour *Chlamydia* où elle réside sans causer d'infection. Le présent projet se propose d'identifier la niche dans laquelle cette bactérie intracellulaire persiste dans l'intestin de la souris et d'étudier si le microbiote résident influence les effets causés par *Chlamydia*. Pour cela nous allons procéder à des infections par gavage de souris conventionnelles et axéniques avec une souche de *Chlamydia muridarum* fluorescente, ce qui nous permettra de suivre la localisation de la bactérie dans les tissus. Nous prévoyons d'utiliser 128 souris femelles âgées de 7 semaines (64 conventionnelles et 64 axéniques). Pour chaque point expérimental nous utiliserons le nombre minimal d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats significatifs d'un point de vue statistique. Les animaux seront élevés en groupe, avec un équipement et des conditions sanitaires adéquates. Les protocoles d'infections ont déjà été utilisés chez les souris et ne donnent pas lieu à des manifestations de gêne chez les animaux. Ce projet comporte une procédure expérimentale d'un niveau léger de sévérité. Le bénéfice attendu est une identification des éléments de l'hôte qui permettent à *Chlamydia* de persister dans l'intestin sans y induire de dommages

4916. Près de 20% des femmes subissent une chirurgie pour prolapsus ou incontinence urinaire d'effort au cours de leur vie. Le recours au matériel prothétique est fréquent en particulier en cas de récurrence et de volumineux prolapsus. La rétraction des prothèses est un problème majeur puisqu'à l'origine de douleurs, de dyspareunies et de récurrence de la pathologie. Des prothèses de petite taille, ne correspondant pas à celles utilisées habituellement chez la femme, ont été testées chez la brebis, sous l'urètre et dans l'espace recto-vaginal. Des séances de dissection sur bassins de cadavres frais de brebis ont montré de grandes similitudes anatomiques avec le bassin de la femme et la faisabilité de la chirurgie avec renforcement prothétique a été démontrée. L'objectif de cette étude est d'utiliser ce modèle animal pour évaluer la rétraction prothétique et la tolérance vaginale en fonction des techniques opératoires et les matériaux utilisés. Deux types de prothèses sont posés en sous aponévrotique dans la paroi abdominale de vingt et une brebis. Un animal sera utilisé sous anesthésie générale pour démontrer la faisabilité du geste et de la procédure. Dix d'entre elle ont une cure de prolapsus par voie vaginale avec renfort prothétique selon la technique chirurgicale classique chez la femme. Les dix autres ont également une prothèse transvaginale mais avec une fixation non résorbable à l'arc tendineux du fascia pelvien. Les animaux sont sacrifiés à 3 mois pour une évaluation échographique, macroscopique et microscopique de la rétraction prothétique. Le but est donc de trouver le matériel et la procédure chirurgicale les plus adaptés à la chirurgie du prolapsus par voie vaginale afin de réduire les complications post-opératoires.

Tout au long de l'expérimentation une attention particulière visant à réduire douleurs, souffrance et angoisse chez les brebis sera apportée.

La pose de cinq prothèses et donc l'étude de plusieurs paramètres par animal vise à réduire le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation des statistiques.

La douleur, la souffrance et l'angoisse sont gérées par une anesthésie générale durant toute la procédure chirurgicale. En dehors de ces périodes, les animaux sont gérés par l'unité d'hébergement et de stabulation fera un suivi quotidien des animaux en

particulier sur les premiers post opératoires. Un protocole d'analgésie post opératoire prédéfini est réalisé pour chaque animal, à la fin de ce protocole, il pourra être prolongé si un animal montre toujours des signes de souffrance ou d'angoisse.

4917. Ce projet a pour but l'étude des différents mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place du système cardiovasculaire chez la souris. Nous étudierons les étapes précoces et tardives du développement cardiaque et nous analyserons la réactivation de mécanismes développementaux lors de pathologies cardiovasculaires chez l'adulte.

Le présent projet va permettre de mieux comprendre le développement du cœur, l'étiologie des pathologies congénitales et proposera de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles en vue de thérapies régénératrices chez l'adulte.

Les personnes affectées au projet sont formées et qualifiées à l'expérimentation animale (concepteurs et praticiens).

La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés. Ainsi ce projet utilisera 3640 souris.

Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'étude de cellules cardiaques en culture ne permet pas d'analyser les interactions cellules-cellules telles qu'elles sont situées dans le cœur entier. De plus, en culture, les cellules ne sont pas sujettes au débit et à la pression du sang non plus qu'aux nombreux autres facteurs et signaux qui sont le propre d'un organisme entier et vivant. Par ailleurs, les animaux génétiquement modifiés représentent des atouts pertinents pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les maladies humaines. En particulier, ils fournissent des modèles de cardiopathies congénitales qui permettent d'étudier l'origine embryonnaire de ces anomalies.

La mise en œuvre du projet respectera la règle des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer).

L'élaboration précise des protocoles et le choix pertinent des contrôles, ainsi que l'utilisation d'outils statistiques sont des éléments déterminants pour limiter ou éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires.

Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence d'objets permettant le raffinement de l'environnement. Les élevages sont effectués au sein d'un établissement agréé et des personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et le bien-être des animaux sont contrôlés.

Tout au long du projet nous nous attacherons à reconnaître la douleur, agir lorsque les critères prédéfinis sont atteints, noter dans le registre des animaux les observations faites et les actions entreprises.

Enfin lorsqu'il serait possible, des stratégies de remplacement (utilisation de lignée cellulaire, étude in vitro) seront mises en place. Ainsi l'ensemble de ces arguments démontre la faisabilité de notre projet.

4918. En Europe comme aux Etats-Unis, le cancer est actuellement la seconde cause de mortalité derrière les maladies cardiovasculaires.

En France, le cancer provoque environ 33% des décès chez les hommes et 23% chez les femmes. Il est donc primordial de s'intéresser à cette maladie et de trouver de nouvelles thérapies.

Les cellules cancéreuses sont initialement des cellules normales qui ont acquis, au cours du temps, un certain nombre de caractéristiques faisant qu'elles ne répondent plus au système de régulation de l'organisme et prolifèrent indéfiniment pour former une tumeur maligne et/ou des métastases.

Un enjeu majeur pour la recherche consiste donc à trouver de nouvelles thérapies ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses tout en limitant les effets secondaires sur l'organisme.

Pour tester l'activité de nouveaux composés, des tests in vitro sont systématiquement mis en place sur des modèles cellulaires humains reconstruits, mimant artificiellement la pathologie de l'homme.

Grâce à ces tests in-vitro, des molécules actives sont sélectionnées avant d'être testées, en seconde intention, dans des modèles in-vivo de souris porteuses de tumeurs afin de démontrer leur activité et leur efficacité anti-tumorale. C'est en effet dans un organisme vivant complet que l'on peut mesurer les effets pharmacologiques d'une molécule anti-cancéreuse.

Pour pouvoir effectuer ces évaluations in-vivo, il est indispensable d'utiliser en premier lieu un modèle tumoral maîtrisé et bien caractérisé en recréant la pathologie par implantation de cellules tumorales ou de fragments tumoraux chez la souris. L'animal porteur de tumeur devient ainsi un bon modèle expérimental pour évaluer les composés anti-cancéreux.

L'objectif de ce projet consiste à tester de nouvelles thérapies, spécifiques des cellules cancéreuses, sur un modèle tumoral, préalablement établi et parfaitement maîtrisé, chez la souris.

Les 1ères études sont dédiées à la sélection du meilleur candidat médicament tandis que les suivantes sont dédiées à la recherche des meilleures modalités de traitement par administration du candidat médicament seul ou en association avec d'autres molécules.

Un moyen d'évaluer l'efficacité des molécules testées est de mesurer la régression tumorale en réponse au traitement, à partir de tumeurs greffées sous la peau, au moyen de mesures régulières de leur taille avec un pied à coulisse ou par imagerie optique pendant une durée maximum de 4 mois.

Pour cela, nous utilisons des souris immunocompétentes (c'est-à-dire présentant un système immunitaire parfaitement fonctionnel) greffées par des tumeurs d'origine murine, pour tester des traitements anti-cancéreux de type immunothérapie ou thérapie ciblée, qui nécessitent parfois le recours au système immunitaire pour être actifs et efficaces, ou bien des souris immunodéprimées (présentant un système immunitaire déficient voire absent) pour permettre la greffe de tumeurs humaines.

Les doses de produits à administrer à l'animal sont sélectionnées préalablement in vivo grâce à des études de Dose Maximale Administrable (DMA) et Dose Maximale Tolérée (DMT) (faisant l'objet d'un autre projet).

Les produits sélectionnés peuvent être évalués sur différents schémas de traitements (en modulant les doses, les voies d'administration, le nombre d'administration/jour et la récurrence) pour escompter une régression partielle ou totale de la tumeur.

Durant l'étude, la croissance tumorale est mesurée au moyen d'un pied à coulisse ou par imagerie optique. Ces 2 techniques, présentent chacune leurs avantages et inconvénients et seront choisies en fonction des besoins expérimentaux. Le pied à coulisse permet une mesure rapide sur animal vigile alors que l'imagerie optique nécessite une anesthésie de la souris pendant la durée d'acquisition des données, mais permet une détection plus précoce des tumeurs ainsi qu'une détection de la prolifération métastatique pour certains types de tumeurs. Ces deux techniques non invasives pour l'animal permettent une caractérisation et un suivi de l'évolution de la tumeur dans le temps pour un même animal et ainsi une réduction du nombre d'animaux nécessaires à la conduite d'une étude.

L'état général des souris est surveillé régulièrement et les volumes tumoraux sont mesurés au minimum 2 à 3 fois/semaine, à la fois pour l'objectif de l'étude mais également pour identifier les éventuels signes de souffrance et appliquer les points limites pré-définis si nécessaire.

Tout au long de l'étude, les souris sont hébergées en groupes sociaux et un enrichissement de milieu, sous forme de « cocoon », est apporté de manière à favoriser leur instinct de nidification. Cet enrichissement va également permettre de surveiller leur état général par observation de leur comportement vis-à-vis de cet enrichissement.

La démonstration d'une activité et d'une efficacité anti-tumorale in-vivo est nécessaire et primordiale pour développer un candidat médicament. Elle s'accompagne systématiquement d'une recherche d'indications thérapeutiques dans différents types ou sous-types de cancers, en monothérapie ou en combinaison avec d'autres composés.

Compte tenu du nombre de molécules pouvant être étudiées sur 5 ans, on estime la réalisation d'environ 40 études par an, à raison de 100 animaux par étude (plusieurs doses ou associations testées) ce qui porte à 20 000 le nombre de souris nécessaire pour toute la durée du projet (5 ans).

4919. La radiothérapie est un outil puissant qui fait partie de l'arsenal des traitements anticancéreux. 50% des patients traités pour un cancer reçoivent une radiothérapie au cours de leur traitement. La radiobiologie cherche à potentialiser les effets des rayonnements ionisants (RI), utilisés en radiothérapie sur les tissus tumoraux, et de minimiser au maximum l'impact de ces derniers sur les tissus sains. Effectivement, la difficulté à délimiter exactement une tumeur et les marges nécessaires à prendre au niveau de sa périphérie font que les RI traversent aussi les tissus sains.

La capacité de la radiothérapie à tuer les cellules cancéreuses réside dans sa capacité à induire des dommages sur la molécule d'ADN. Cependant, les cellules possèdent des mécanismes qui leur permettent de faire face à ses dommages et de les réparer. Le but de notre projet est de combiner une molécule qui limiterait la réponse des cellules à la radiothérapie et donc leur survie suite une irradiation. Ceci permettrait d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie.

Il est indispensable d'évaluer ce nouveau type de traitement à l'aide de modèles de cancer du poumon, étant donné qu'il y a eu très peu d'avancées ces dernières années concernant le traitement de ce type de cancer alors que son incidence ne diminue pas. Si l'irradiation constitue un traitement assez efficace, elle génère également des dégâts dans les tissus sains environnants. Dans le cas d'une irradiation du poumon, un des effets secondaires est le développement d'une fibrose radio-induite. Nous vérifierons donc dans un second temps que la nouvelle combinaison thérapeutique n'aggrave pas la fibrose radio-induite, ce qui limiterait grandement le potentiel de ce nouveau traitement en clinique. Le recours à des modèles animaux nous permettra d'étudier les effets de cette nouvelle combinaison thérapeutique dans un contexte qui inclut le micro environnement tumoral et qui permet donc l'interaction des cellules tumorales avec leur environnement naturel. Ces interactions jouant un grand rôle dans les effets de la radiothérapie, il apparaît indispensable d'avoir une évaluation sur un modèle animal (animal entier vivant) pour déterminer exactement les effets de cette molécule avant d'envisager un passage en thérapie humaine. Aucun modèle in vitro ne permet actuellement d'obtenir la complexité présente dans un animal vivant (immunité, vascularisation, organo-dépendance, ...).

Pour mener à bien ce projet et avoir une idée précise du potentiel en thérapie humaine de cette nouvelle combinaison, 720 souris seront nécessaires. Cette estimation se base sur des analyses statistiques qui permettent de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans cette étude. Les animaux seront observés quotidiennement pour détecter tout signe éventuel de souffrance ou de toxicité des traitements. Un enrichissement (cocoon) est utilisé en permanence. Ils recevront une alimentation adaptée (Diet Gel Hi Energy ou Rénutryl en cas de problème nutritif).

4920. Les modèles d'étude in vitro ne permettent d'obtenir qu'un nombre limité d'informations. C'est pourquoi il est souvent nécessaire d'utiliser l'animal afin de pouvoir étudier, par exemple, le rôle d'un gène ou d'une protéine au sein d'un organisme entier. Les techniques de transgénèse consistent à introduire ou à modifier un gène dans un organisme vivant afin d'en étudier sa fonction. Ce sont des techniques particulièrement pointues nécessitant un matériel coûteux et du personnel spécialisé. Notre plateforme est spécialisée dans la production à façon de modèles murins transgéniques par transgénèse additionnel ou par recombinaison homologue ou par approche CRISPR, pour des clients extérieurs à notre entité.

La production de souris génétiquement modifiées nécessite un stock important de souris mâles et femelles mais le fait de travailler en plateforme permet de réduire les différents lots de souris, notamment les lots de mâles qui sont utilisés pour plusieurs projets. Le nombre de souris utilisé sera proportionnel au nombre de projets réalisés par an. Notre activité est estimée à 50 projets maximum pour la durée du projet. Le nombre total estimé de souris utilisées au maximum pour le projet sera donc de 14095.

La création de modèles animaux transgéniques nécessite de fait l'utilisation d'animaux pour fournir les embryons qui sont injectés avec les outils moléculaires porteurs de la modification génétique. Les modèles sont créés en fonction de la demande de clients qui ont eu l'accord du financeur de son projet scientifique. On peut donc affirmer qu'il n'existe pas de méthodes alternatives à la création d'un modèle murin afin de répondre à la question scientifique du projet. Le chercheur aura vérifié au préalable que son modèle n'existe pas dans les bases de données existantes afin d'éviter la duplication d'un modèle de souris.

Dans le but de répondre à la règle des 3R, les lots de mâles fertiles sont changés 2 à 3 fois par an en fonction du fonds génétique et sont utilisés pour tous les projets initiés pendant cette période. La superovulation des femelles est préférée à l'accouplement naturel afin de diminuer la quantité de souris utilisée et augmenter la production d'embryons. Seules les femelles présentant un bouchon vaginal sont euthanasiées et prélevées. Les femelles qui ne se sont pas accouplées (absence de bouchon vaginal) ne sont pas sacrifiées et sont réutilisées après un temps de latence de 15 jours pour un nouveau projet. Afin de ne pas utiliser trop d'animaux, les séances d'injections sont arrêtées dès l'obtention de cinq souris transgéniques. Il arrive parfois qu'aucun fondateur ne puisse être obtenu: les injections seront alors stoppées après la réimplantation de 15 à 20 femelles porteuses. Les animaux bénéficieront d'anesthésie, de chauffage pendant les anesthésie, et d'apport de nourriture énergétique pour les petits au sevrage et facile d'accès.

4921. Le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII) est une pathologie fonctionnelle digestive fréquente, se manifestant par un mal au ventre et/ou des troubles du transit sans anomalie à l'examen clinique. Elle touche environ 8% de la population en France. Sa physiopathologie est mal comprise ; sont évoqués une hypersensibilité viscérale, une augmentation de la perméabilité intestinale, une inflammation légère et des modifications du microbiote intestinal. Peu de traitements pharmacologiques se révèlent efficaces, notamment sur les douleurs abdominales. L'alimentation semble jouer un rôle puisque 60% des patients rapportent une augmentation de leurs symptômes selon la prise alimentaire. Récemment, il a été montré, dans des études cliniques, que l'élimination d'un groupe de sucres, appelés FODMAPs, permettait d'améliorer les symptômes de 70% des patients atteints d'un SII. Le terme FODMAPs regroupe différents sucres non absorbés par l'intestin grêle et fermentés par le microbiote colique. A ce jour, il n'y a pas de données physiopathologiques permettant d'expliquer cet effet clinique observé. On sait que la fermentation des sucres par le microbiote produit une quantité importante de métabolites intermédiaires et finaux. Ces substances chimiques ont des effets toxiques connus sur les tissus humains. Ils entraînent notamment la formation de produits, qui sont une source certaine d'inflammation. L'hypothèse étudiée est celle d'un effet toxique de certains métabolites de la fermentation des FODMAPs sur la fonction barrière intestinale et la sensibilité viscérale. D'abord, des FODMAPs seront administrés à des souris puis seront recherchées des modifications de la fonction barrière intestinale, de la sensibilité viscérale et une inflammation légère. Ensuite, nous étudierons l'effet des FODMAPs dans un modèle de souris qui présente une barrière intestinale déjà fragilisée. Ce modèle reproduit les modifications physiopathologiques observées chez les patients atteints de SII, en exposant des souris à un stress chronique. Nous analyserons le microbiote des souris ayant consommé des FODMAPs à la recherche d'un déséquilibre de la flore intestinale qui favoriserait des voies de fermentation plus toxiques que d'autres. Le deuxième volet de ce projet permettra d'étudier l'implication de ces toxiques issus de la fermentation dans le SII chez l'homme. Le microbiote et la présence de métabolites toxiques dans les selles de patients SII, avant et après régime pauvre en FODMAPs, seront mis en parallèle pour rechercher des profils de « mauvais fermenteurs ». Pour reproduire ces effets, nous administrerons à des souris les surnageants fécaux de ces patients, puis étudierons leur fonction barrière intestinale et leur sensibilité viscérale. La souris est un modèle préclinique pertinent et validé pour l'étude de la fonction barrière intestinale. Nous estimons avoir besoin d'un nombre total de 2400 animaux sur 5 ans, pour obtenir des résultats pertinents sur le plan statistique, tout en prenant en compte la nécessaire réduction du nombre d'animaux utilisés. De plus, au vu de la complexité des mécanismes physiopathologiques mis en jeu en effet seules des approches in vivo permettent d'évaluer la douleur viscérale ainsi que des modifications du microbiote. Enfin, nos animaux seront hébergés dans des locaux d'animalerie standardisés leur assurant les meilleures conditions d'environnement, bien-être et santé.

4922. Les maladies cardiovasculaires sont parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés, et les médicaments anticancéreux peuvent induire une cardiotoxicité irréversible. Celle-ci se manifeste par le développement d'une cardiomyopathie dilatée (gros cœur), pas toujours symptomatique. Cette cardiotoxicité peut se manifester dès les premiers traitements ou ne se révéler que plusieurs années après.

Une partie importante de notre activité consiste à développer des composés cardioprotecteurs pour traiter l'insuffisance cardiaque et protéger le cœur contre les effets secondaires des traitements anticancéreux.

-La ligature d'artère coronaire chez la souris représente le modèle d'infarctus du myocarde le plus couramment accepté dans le monde.

-Les modèles murins de cardiotoxicité induite par médicaments anticancéreux sont incontournables pour examiner de nouvelles interventions thérapeutiques qui peuvent protéger le cœur.

En effet pour évaluer l'activité cardioprotectrice de nos composés, nous devons impérativement utiliser les modèles qui sont prédictif de ce qui se passe chez l'être humain. L'utilisation de ces modèles permet de comparer nos résultats à ce qui est établi dans la littérature. Ils sont donc particulièrement pertinents.

Notre activité, consiste à examiner comment une nouvelle hormone, pourrait être impliquée dans les mécanismes liés aux maladies cardiovasculaires à l'obésité et au diabète. L'objectif est double : comprendre les mécanismes liés à l'apparition et l'évolution de ces affections, et également explorer des stratégies thérapeutiques pour les traiter. Ce projet est basé sur nos travaux antérieurs.

-Nous examinerons l'effet d'un régime riche en graisse sur des souris sauvages et sur nos souris mutantes ayant un phénotype obèse ou diabétique.

L'ensemble de ces études sera mené avec le minimum de souris nécessaire pour générer des données statistiquement significatives. Nous estimons ce nombre de souris à 1240 pour ces études sur 5 ans.

Toutes les expérimentations sont effectuées en respectant la règle des 3 R (Remplacer, Réduire, Raffiner)

Remplacer : Ces procédures expérimentales ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. L'approche que nous proposons est largement utilisée dans ce domaine d'étude.

Réduire : Le nombre minimum d'animaux nécessaire à ces approches in vivo a été très précisément calculé sur la base d'une validation statistique.

Raffiner (critères d'interruption) : Dans la Ligature d'artère coronaire, en cas de souffrance temporaire nous administrons un analgésique (Buprenex 0.1 mg/kg i.p.). En cas de douleur sévère nous euthanasions la souris avec une solution de pentobarbital (200 mg/kg i.p.). Dans les modèles murins de cardiotoxicité induite par la doxorubicine, les animaux seront sacrifiés immédiatement si une perte de poids supérieure à 20% est observée.

4923. La communication entre les neurones se fait au niveau de très petites structures, les synapses et grâce à des récepteurs spécifiques à différents neurotransmetteurs. Les mouvements de ces récepteurs synaptiques sont fondamentaux dans la communication entre les neurones, et comprendre les mécanismes qui sous-tendent ces mouvements permet de décrypter les phénomènes de mémorisation et d'apprentissage. Les récepteurs de type AMPA sont associés à des protéines de la famille des protéines transmembranaires régulatrices des récepteurs AMPA dites TARP. Leur rôle dans la mobilité des récepteurs est mal connu. Nous disposons de modèles murins inactivés pour les gènes de ces TARPs (Gamma2 appelé aussi stargazin, Gamma 6 appelé aussi Shisa, et Gamma8). Il apparaît que les conséquences de l'absence d'une de ces protéines sont en partie compensées par les autres en terme fonctionnel.

Le but de ce projet est la création de lignées murines doubles et triples transgéniques par croisement de lignées knock out pour les gènes de ces 3 protéines TARPs, afin de mieux cerner leur rôle respectif dans la transmission synaptique (trois double transgéniques Stagazin x Shisa 6, stagazin x Gamma8, SHisa6x Gamma 8, et un triple Stagazin x Shisa x Gamma8).

Nous savons que parmi ces 3 lignées, l'une (Stargazer) présente un phénotype dommageable qui se manifeste chez les homozygotes par des troubles moteurs choreiformes. Nous envisageons donc que chez les doubles et triples mutants incluant cette lignée, un phénotype identique ou plus invalidant soit observé. Le nombre d'animaux produits pour établir ces lignées sera d'environ 1240 (tous génotypes confondus). Dans le cadre du respect de la règle des 3R, pour réduire au maximum le nombre d'animaux la production sera rationalisée par l'établissement de programmes d'élevage. Les homozygotes seront l'objet d'une surveillance particulière afin d'établir si ces créations de nouvelles lignées provoquent l'apparition de phénotype nocif, et si c'est le cas, des points limites adaptés seront établis pour limiter toute souffrance chez les animaux.

4924. Malgré les récentes avancées dans le traitement des mélanomes avec l'avènement des thérapies ciblées (Vémurafénib et Cobimétinib notamment) et l'augmentation de la survie des patients porteurs d'un mélanome à un stade avancé (métastatique) à 11 mois en moyenne contre 6 mois auparavant, tous rechutent finalement du fait du développement d'une résistance à leur traitement.

Notre équipe a récemment mis en évidence l'hyperactivation d'un complexe protéique impliqué dans l'initiation de la traduction dans les tumeurs résistantes et identifié des drogues (silvestrol et dérivés synthétiques) ciblant ce complexe et qui permettraient de resensibiliser les cellules tumorales au Vémurafénib + Cobimétinib.

Le traitement de lignées cellulaires de mélanomes humains in vitro par la combinaison des thérapies ciblées Vémurafénib + Cobimétinib pendant 3 jours permet d'éradiquer en grande partie les cellules tumorales mais quelques cellules persistent cependant. Ces dernières s'avèrent particulièrement sensibles au silvestrol et à ses dérivés. La séquence thérapeutique consistant à traiter par la combinaison Vémurafénib + Cobimétinib (traitement de référence) puis par silvestrol (ou dérivé) paraît donc prometteuse.

Le but de ce projet est de confirmer ces résultats in-vivo sur trois modèles de xéno greffes de mélanomes humains sur souris nude.

L'expérimentation in vitro a permis de montrer l'intérêt de notre démarche mais ne suffit pas à elle seule à justifier l'exploration de cette thérapeutique séquentielle dans des essais cliniques. L'expérimentation dans des modèles de cancer chez la souris ne peut donc pas être remplacée par des tests in vitro. En effet, il est nécessaire de vérifier cet effet dans un organisme entier incluant les interactions avec les systèmes nerveux et hormonaux.

Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum tout en assurant la valeur des résultats de l'expérimentation. Nous disposons de 3 modèles validés de mélanomes humains greffés sur souris nude et pour ces 3 modèles, le nombre sera réduit au minimum nécessaire pour comparer les différents protocoles de traitement avec une puissance statistique suffisante. La réalisation de ce projet nécessitera au total 240 souris Nude.

Dans un souci de raffinement, l'utilisation de croquettes contenant le Vémurafénib et le Cobimétinib permettra d'éviter le gavage quotidien des souris.

4925. Le syndrome de Netherton (SN) est une maladie génétique cutanée rare dont l'incidence est estimée à 1/200000. Il est caractérisé par une érythrodermie ichtyosiforme congénitale, une anomalie capillaire et des manifestations atopiques (allergiques). Ces symptômes sont présents dès la naissance, entraînant des infections bactériennes, une déshydratation, une hypothermie et une perte de poids extrême et sont à l'origine d'un taux de mortalité postnatal élevé. Ces symptômes conduisent à une inflammation sévère de la peau et à la diminution de la qualité de vie, principalement pendant l'enfance et l'adolescence. Jusqu'à présent, il n'existe pas de traitement efficace pour les patients atteints du SN. Seule l'utilisation d'un modèle animal, mimant le plus fidèlement possible les symptômes du SN, permettra d'étudier la maladie et de découvrir des cibles pour le développement des nouvelles thérapies.

Différentes lignées de souris génétiquement modifiées ainsi qu'un modèle de xéno greffe humaine seront utilisés pour étudier les mécanismes impliqués dans le SN. Ces modèles permettront dans un premier temps de valider in vivo des cibles thérapeutiques préalablement identifiées par des études in vitro. Par la suite, des tests incluant des molécules thérapeutiques, développées actuellement avec des collaborateurs, seront réalisés. Après 3 semaines d'expérimentation, les souris seront euthanasiées pour le prélèvement des organes afin d'étudier la peau et d'évaluer l'efficacité de ces composés. Un total de 466 animaux est estimé pour la durée du projet, estimé à 5 ans. Il s'agit du nombre d'animaux jugé nécessaire pour obtenir des résultats analysables, en incluant les répétitions indispensables à la démonstration.

Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, une anesthésie sera pratiquée et les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière. Les antalgiques seront administrés systématiquement en post-opératoire peuvent être prévus en cas de nécessité dans les autres procédures. Enfin, des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément la physiopathologie du syndrome de Netherton et l'obtention de données précliniques chez le modèle animal est un atout majeur pour l'amélioration de la prise en charge thérapeutique des patients.

4926. Les conjugués anticorps-médicaments (ADC) sont de nouvelles thérapies anticancéreuses ciblées. Les ADC se composent de trois fragments : l'anticorps, le médicament et le linker.

1. L'anticorps joue le rôle d'agent de ciblage. Il est conçu pour reconnaître sélectivement les cellules cancéreuses, en se liant spécifiquement à une protéine exprimée à la surface des cellules malades. Cette approche de ciblage permet de réduire considérablement les effets toxiques par rapport à la chimiothérapie classique.

2. Le médicament est un agent chimiothérapeutique qui détruit les cellules malignes lors de sa libération. Ainsi, il peut induire la régression partielle, voire complète, de la tumeur.

3. Le linker lie l'anticorps et le médicament de façon covalente. C'est un fragment crucial dans les ADC : il doit être extrêmement stable en circulation sanguine, mais induire la libération du médicament dans l'environnement de la tumeur.

À ce jour, l'une des problématiques la plus importante est la détermination d'antigène(s) spécifique(s) à une pathologie. En effet, dans la plupart des cas les protéines exprimées à la surface des cellules cancéreuses sont également présentes à la surface des cellules saines, induisant ainsi la destruction de cellules non-cancéreuses lors de l'application de traitements de type ADC. Ceci est un véritable problème notamment dans les cas des cancers du pancréas, d'une part, pour lequel il n'existe aucun traitement curatif, et, d'autre part, du poumon qui est particulièrement virulent. Dans ces cas une autre approche thérapeutique est nécessaire.

Les tumeurs solides présentent une activité métabolique très élevée et augmentent la vascularisation de leur environnement afin d'accéder facilement aux macromolécules circulantes. Ainsi il a été établi que l'albumine s'accumule préférentiellement dans l'environnement tumoral.

Notre collaborateur, a pu développer le « linker thérapeutique », permettant le couplage extrêmement stable d'un agent chimiothérapeutique (MMAE) à l'albumine. Cela devrait permettre de minimiser la toxicité non-spécifique du MMAE due à la rupture du linker. Une étude préliminaire a déjà démontré l'efficacité de notre « linker thérapeutique » dans l'élimination des cancers du sein et du pancréas chez des modèles murins de xéno greffe. Nous proposons ici de tester la dose maximale tolérée (DMT) de l'agent thérapeutique « MMAE-□Glu-MMAE » chez la souris. L'utilisation de cette technologie a pour but d'éliminer partiellement ou totalement la tumeur, de façon plus efficace et moins toxique que les technologies actuelles et de permettre le traitement de cancers incurables. Il est impératif d'établir dès le début de notre étude la limite thérapeutique supérieure de notre médicament potentiel.

De plus, à l'évaluation de la toxicité de notre produit, nous réaliserons l'apprentissage de la technique d'injection intramammaire, en vue de tester l'efficacité thérapeutique de « MMAE-□Glu-MMAE » dans le cas d'un modèle de tumeur du sein par greffe orthotopique chez la souris.

Pour cette étude, il est indispensable d'utiliser un modèle animal. Le remplacement par des modèles alternatifs, tels que des modèles in vitro, n'est pas possible car ils ne sont pas représentatifs de la complexité biologique de l'organisme dans son ensemble.

Dans le cadre de raffinement, nous avons déjà déterminé la toxicité du « linker thérapeutique » et avons établi que la dose de 12 mg/kg était létale. Pour réduire le nombre de souris nous allons effectuer un test pilote sur souris CD-1 où nous testerons l'effet biologique de la dose 10 mg/kg afin de nous assurer qu'elle n'est pas létale. Ici, la taille des groupes expérimentaux sera fixée à n = 3 animaux/traitement. Cela nous permettra de choisir une gamme de concentration de « linker » optimale d'utilisation in vivo. Dans le cadre de l'étude de la DMT, l'agent thérapeutique sera testé à deux concentrations différentes (4 mg/kg et 10 mg/kg). Afin de réduire le nombre de souris, les groupes expérimentaux seront composés de 12 souris. L'agent sera injecté par voie intraveineuse (IV), et afin d'éviter les souffrances, l'état des souris sera suivi quotidiennement après administration du « linker thérapeutique ». L'identification de symptômes de détresse entraînera l'élimination des souris concernées. Finalement, pour effectuer cette étude nous allons réutiliser les groupes des animaux d'un projet antérieur et si nécessaire compléter les cohortes expérimentales par les animaux achetés au prêt du même fournisseur.

Pour l'apprentissage de l'injection intra-mammaire, nous réaliserons des injections de sérum physiologique (0.9 % NaCl) coloré au bleu de méthylène (1 g/L). Ces injections seront réalisées sur 25 souris Nude. (Au total, 175 souris seront utilisées dans ce projet).

4927. Les fractures de l'os associées à des problèmes de réparation sont fréquentes et entraînent une prise en charge clinique lourde et douloureuse. Actuellement, une partie de l'os de la hanche du patient est prélevée puis greffée au niveau du site du défaut osseux. Ces fractures vont augmenter avec le vieillissement de la population, ce qui nécessite de trouver des alternatives de soin moins invasives et moins douloureuses pour le bien être des individus touchés.

Plusieurs alternatives ont donc été développées comme l'utilisation de matériaux synthétiques ou d'origine naturelle (biomatériaux). Cependant, ces supports ne possèdent pas la capacité de former de l'os du fait, notamment, de l'absence de cellules souches. Une étude clinique pour le traitement des fractures non consolidées en greffant des cellules souches en association avec des biomatériaux montre des résultats très encourageants, cependant une petite fraction de patients traités est en échec de consolidation. Notre objectif est donc de comprendre les causes à l'origine de cet échec dans le but d'améliorer la procédure clinique. Des analyses ont été réalisées et mettent en évidence six cytokines cibles qui pourraient avoir un impact sur le potentiel ostéoformateur des cellules humaines.

Nous allons donc évaluer l'impact de ces cytokines sur les cellules souches humaines ainsi que sur la mise en place du processus de formation osseuse en coordination avec les cellules de l'organisme receveur. Pour cela, nous allons utiliser une technique couramment utilisée de greffes simples et faiblement invasives, de biomatériaux associés aux cellules, en sous-cutané chez la souris sous anesthésie générale. Cette technique efficace n'a montré aucune mortalité ni souffrance chez les animaux. Pour que l'étude soit statistiquement relevant au moins 3 animaux indépendants doivent être étudiés par condition. A cause de l'hétérogénéité de la population, les cellules souches provenant de 3 à 6 donneurs devront être testées.

Dans le souci de diminuer au maximum le nombre d'animaux, nous avons validé que la greffe de 6 implants de petite taille au lieu de 2 était réalisable. Ce qui nous permet de passer pour une étude complète des 6 cytokines d'un nombre de 16200 souris à 3006 souris. Afin de pouvoir réduire encore l'utilisation des animaux, l'étude sera réalisée en 2 étapes : L'étape 1 sera la sélection des cytokines ayant un effet majeur sur la formation osseuse. L'étape 2 concernera l'étude des mécanismes d'action induits par ces cytokines. En conclusion, après l'étape 1, si seulement 1 cytokine montre un intérêt majeur cela va nous permettre de réduire le nombre d'animaux à 756 souris. Pour le bien-être des souris, celles-ci resteront en groupe et un enrichissement de la cage avec du papier et du carton sera réalisé. Les animaux seront surveillés tous les jours. En cas de douleur les dispositions adéquates à la situation seront prises

4928. Un des enjeux majeurs dans la recherche sur la maladie d'Alzheimer (MA) est de la diagnostiquer avant la mise en place de dommages irréversibles. Un taux faible du peptide amyloïde β ($A\beta$) dans le liquide céphalorachidien (LCR) et élevé dans le cerveau sont des marqueurs très précoces. Cependant le caractère invasif de leur mesure rend leur suivi compliqué et pénible pour le patient. Dans la maladie d'Alzheimer on peut observer un dysfonctionnement entre l'activité cérébrale et le débit sanguin, mais aussi un dysfonctionnement des astrocytes.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) de diffusion est devenue un outil essentiel pour visualiser l'organisation structurelle du cerveau. Elle est couramment utilisée pour le diagnostic clinique / préclinique de l'ischémie cérébrale. Il s'agit d'un procédé unique pour observer de manière non invasive la structure des tissus par l'intermédiaire de la diffusion des molécules d'eau dans ces tissus.

Lors de l'évolution de la maladie d'Alzheimer, un dysfonctionnement du couplage entre l'activité cérébrale, et le débit sanguin a été identifié au stade de post-symptôme. Donc, l'IRM fonctionnelle (IRMf) sera aussi un marqueur de la MA.

Ce projet vise à établir des marqueurs d'IRMD pour un diagnostic précoce de la MA et un suivi des patients. Le but de ce projet est 1) d'étudier les signaux d'IRMD sur un modèle rongeur quand le canal d'aquaporine est réprimé (TGN-020, inhibiteur d'aquaporine) ou lorsque l'activité d'astrocyte est réprimée (Acide dihydrokainique, l'inhibiteur du transporteur du glutamate) 2) de comparer sur un modèle Alzheimer et un animal témoin les différents signaux d'IRMD, signaux IRMf et l'électrophysiologie lors de l'activité ou du repos des neurones à âge du 3 mois (pré-symptôme) au 12 mois (post-symptôme). Les retombées de ce projet auront un fort impact sur le diagnostic précoce d'Alzheimer par neuro-imagerie pour les hommes, cette pathologie du système nerveux étant une préoccupation croissante en santé publique.

Ce projet est réalisé sur des animaux de façon à ce qu'aucune angoisse, douleur ou souffrance ne soit ressentie lors des expérimentations. Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont donc été définis et validés par une équipe vétérinaire et une observation quotidienne des animaux seront effectuée pour s'assurer de leur bien-être. Dans le cas d'effêt inattendu, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en œuvre les traitements appropriés ou de décider de l'euthanasie. Le nombre d'animaux (210) a été réduit au minimum nécessaire pour recueillir un nombre suffisant de données pour une analyse statistique valide. Chaque test sera pratiqué sur des groupes de 10 animaux

4929. La sélection et la validation de nouveaux traitements sont devenues incontournables dans les domaines de l'immunothérapie des cancers, de l'infectiologie et des maladies auto immunes.

Récemment, la reconstitution d'un système immunitaire humain dans des modèles murins immunodéficients, a relancé l'intérêt de l'utilisation de tels modèles, pour résoudre les mécanismes physiopathologiques de maladies liées à l'immunité et à la prédiction de réponses immunitaires pendant le traitement de maladies complexes. Pour cela les modèles de souris possédant un système immunitaire humain sont un outil préclinique particulièrement approprié, qui permet d'accéder pour un coût réduit à une alternative rapide par l'accès à un essai clinique de petite échelle.

Ce projet a pour objectif de créer et valider un nouveau modèle de souris possédant un système immunitaire humain, permettant de présenter et d'exprimer des récepteurs humains par des cellules dendritiques humaines. La génération, la validation et diffusion

de des modèles qui peuvent reproduire de manière fiable une réponse immunitaire humaine in vivo dans un animal de petite taille, va procurer un outil important pour le développement des vaccins, pour prévenir ou guérir des maladies dévastatrices.

Afin de répondre à l'objectif de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable un système immunitaire complet en dehors du recours à l'animal.

Pour se faire, des souris immuno-déficientes seront utilisées, associée à une irradiation modérée. Une greffe de cellules souches des cellules immunitaires sera réalisée, permettant le développement d'un système immunitaire humain. 3 mois plus tard, une validation de la bonne greffe de ces précurseurs sera évaluée par mesure en cytométrie de flux.

Lors de ce projet, 2 études identiques de caractérisation de la greffe des cellules souches seront réalisées. Pour chacune de ces études, 20 souris seront utilisées soit un total de 40 souris.

La souche de souris utilisée étant immunodéprimée, une attention toute particulière sera portée à l'hébergement et aux soins de ces animaux afin d'éviter toute infection. Au cours de chaque étude, les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter rapidement les premiers signes anormaux et ainsi prendre les mesures nécessaires pour le bien être de l'animal. Une pesée quotidienne (en phase post irradiation), puis hebdomadaire sera également réalisée tout au long de l'étude après injection des cellules souches. Toute anomalie clinique observée sera rapporté à un vétérinaire dans le but de réaliser un examen clinique plus approfondi. Des mesures thérapeutiques seront mises en place pour essayer de traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés (injection de fluides, d'analgésiques, isolement, réchauffement, etc...).

4930. Les acariens de la volaille, comme le pou rouge (*Dermanyssus gallinae*) posent de sérieux problèmes de santé et d'économie aux exploitations avicoles du monde entier. Ce parasite vit à la surface externe de l'être vivant qu'il attaque. Le pou a d'abord une couleur grise, rouge, puis presque noir dès qu'il est bien repu. Quant à sa larve, elle est blanche transparente. Le contrôle de ces parasites est particulièrement difficile parce que le traitement direct du poulet est impossible pendant la production d'œufs pour éviter les résidus dans les œufs ou la viande. Le traitement des bâtiments par des acaricides est également très limité pour les résidus et les aspects de sécurité, souvent limités aux bâtiments vides, entre deux lots de poules pondeuses. Il est difficile d'éradiquer le pou rouge car il se cache durant la journée dans les charnières de porte, les petites fissures, les fentes, sous les fientes, le pondoir, le perchoir etc. Dès la nuit tombée, il attaque les poules pour se nourrir de leur sang. Il apprécie également un climat chaud et humide qui facilite sa prolifération. Le contrôle biologique des ravageurs est déjà largement utilisé dans l'industrie des cultures. S'il est utilisé efficacement dans les élevages de volailles, il peut participer au contrôle de la population de parasites. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité des spores de champignons génétiquement sélectionnés, *Metharizium anisopliae*, dans la destruction des acariens de *Dermanyssus* dans un milieu confiné. Pour cette étude durant six mois, 15 poules pondeuses, espèce cible des poux, seront utilisées et réparties en une pré-expérimentation de mise aux point du modèle sur trois poules et en quatre lots de deux poules (deux lots non traités et deux lots traités). Une marge de 4 poules est prévue dans le cas d'une forte infestation conduisant la mort de l'animal. L'infestation se fait par contact direct en déposant les poux dans l'isolateur. Remplacement et réduction : en l'absence de méthode alternative pour le développement du pou, le nombre d'animaux inclus dans le protocole a été déterminé en fonction des normes d'hébergement d'animaux en isolateur. Raffinement : il y aura un enrichissement social (vie en groupe et visite bi-journalière des animaliers) et de structure (perchoirs et objets suspendus).

4931. Le projet vise à analyser les effets des matières en suspension (MES) sur des espèces de poissons communes dans le Haut Rhône (entre Genève et Lyon). Dans le Rhône, les sédiments fins s'accumulent au niveau des zones calmes telles que les retenues ou les sorties d'écluses, et entravent la navigation ou le bon fonctionnement des centrales hydroélectriques. Ces matériaux sont régulièrement extraits par des dragues aspiratrices et sont alors remis en suspension dans le chenal principal, ce qui provoque une augmentation de la turbidité de l'eau sur plusieurs kilomètres. Une approche en milieu contrôlé est nécessaire afin d'isoler le facteur d'intérêt (concentration en MES) et de fournir des données quantitatives afin de discuter les normes actuellement en vigueur concernant le relargage de MES en aval des dragages (arrêté interpréfectoral n°2011077-0004 du 18 mars 2011). Des tests d'exposition de poissons à différentes concentrations de MES sont requis, le modèle animal ne pouvant pas être remplacé pour répondre à la question posée (règle des 3 R : Remplacement).

Nous exposerons des juvéniles de différentes espèces présentes dans le Haut Rhône (2 salmonidés la première année : truite arc-en-ciel et truite fario) à différentes concentrations de MES régulièrement observées en milieu naturel. La durée d'exposition est de 4 semaines, correspondant à la durée moyenne des opérations de dragage sur le Haut Rhône. Les effectifs sont de 360 individus (4-5 grammes) par espèce ainsi que 60 individus pour les pré-tests d'acclimatation et de validation du dispositif (règle des 3 R : Raffinement). L'effectif de 5 individus par occasion de prélèvement a été déterminé de manière à prendre en compte la variabilité interindividuelle dans chaque aquarium ainsi que la variabilité entre série (facteur aléatoire), tout en limitant au maximum le nombre d'individus euthanasiés (règle des 3 R : Réduction). Le même protocole sera ensuite appliqué sur deux espèces de cyprinidés (vairon et une autre espèce définie ultérieurement) dès 2016 pour évaluer leur sensibilité aux MES.

Au total, 1'500 poissons seront utilisés au cours des différentes expériences réalisées sur les 4 espèces et lors des pré-tests. Nous évaluerons les effets sur la mortalité, la croissance, et différents indicateurs de stress.

4932. Les maladies inflammatoires de l'intestin touchent un nombre très important de patients dans les pays occidentaux (Europe et Amérique du Nord). Elles sont causées par une mauvaise régulation de la fonction inflammatoire et les traitements actuels ne sont pas totalement efficaces. Une des hypothèses qui a été proposée pour expliquer l'augmentation de fréquence de ces maladies

inflammatoires dans les pays développés concernent les changements de style de vie et de mesure d'hygiène, ce qui a privé notre système immunitaire d'éléments de régulation essentiels à son fonctionnement. Les helminthes (vers) intestinaux peuvent jouer ce rôle de régulateurs de la réponse inflammatoire et leur disparition dans nos sociétés modernes a été proposée comme étant une des causes de l'augmentation des maladies inflammatoires de l'intestin. Dans ce projet nous souhaitons étudier le potentiel d'adaptation d'un nématode intestinal (*Heligmosomoides polygyrus*) lorsqu'il est exposé à un environnement inflammatoire. Ce nématode est un parasite naturel de rongeurs. Nous utiliserons pour cette expérience des souris BALB/c femelles âgées de 7 semaines. Nous envisageons d'utiliser un total de 260 souris BALB/c pour cette expérience sur une période d'un an. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum. Il correspond au nombre minimal permettant d'obtenir des résultats significatifs avec les tests statistiques utilisés.

Les souris seront hébergées en groupe (5 par cage), avec un enrichissement de l'environnement. Elles seront suivies sur une base quotidienne. Si nous constatons des signes d'inconfort liés au traitement (trouble du comportement, perte de poids supérieure à 20%, hémorragie), les souris concernées seront immédiatement sorties de l'expérience.

4933. Certains parasites tels que les helminthes présentent des stratégies visant à contrôler la réponse immunitaire de l'hôte ce qui leur permet de persister sur de longues durées au sein de l'hôte. Les coûts et bénéfices de ces stratégies pour le parasite varient en fonction du « statut immunitaire » de l'hôte qui peut être plus ou moins orienté vers un état pro- ou un état anti-inflammatoire. Ainsi les mécanismes de régulation mis en place par le parasite lui sont d'autant plus favorables que l'environnement que constitue l'hôte est faiblement régulé, c'est-à-dire plutôt orienté vers un état pro-inflammatoire. Des mécanismes propres à réguler fortement la réponse de l'hôte seront sélectionnés dans ces conditions. Inversement, ces mécanismes doivent être coûteux et contre sélectionnés dans un environnement immunitaire déjà fortement régulé (anti-inflammatoire). Nous souhaitons tester cette hypothèse par des expériences de sélection du parasite *Heligmosomoides polygyrus* (un nématode régulant la réponse inflammatoire de l'hôte) chez des souris (N = 75) caractérisées par des « statuts immunitaires » différents. Nous avons suivi la règle de réduction du nombre d'animaux (un nombre plus petit d'animaux compromettrait fortement la validité statistique des résultats). Pour ce qui concerne le bien-être des animaux, ils seront hébergés dans des cages dont l'environnement sera enrichi (5 animaux par cage). Les souris seront suivies quotidiennement afin de vérifier leur état de santé et leur bien-être. Si des signes de mal-être sont perçus (perte de poids, changement de comportement avec prostration dans la cage) les animaux seront immédiatement sortis de l'expérience.

4934. *Mycobacterium avium* est un pathogène respiratoire chez les patients porteurs de bronchopathies chroniques obstructives mais également responsable de bactériémie et de maladie disséminée chez les patients immunodéprimés. Bien que la clarithromycine soit une molécule incontournable dans le traitement de ces pathologies, le traitement reste complexe (polythérapies), long (9-12 mois), à faible niveau de preuve et souvent très mal toléré. A ce jour le traitement optimal (choix des molécules, nombre de molécules à utiliser, durée du traitement,...) n'est pas défini et de nouveaux antibiotiques potentiellement susceptibles de raccourcir le traitement n'ont pas été testés cliniquement faute d'étude préclinique. De plus, on note l'émergence de souches résistantes aux macrolides et de nouvelles molécules actives sont donc nécessaires. Il a été récemment décrit que l'utilisation d'un modèle murin d'infection pulmonaire reproduisait l'effet bénéfique de la clarithromycine et certaines associations semblaient prometteuses dans cette indication. Le choix des molécules, le nombre de molécules à utiliser et la durée optimale de traitement reste à définir d'abord sur un modèle murin qui pourra ensuite guider les essais cliniques. Nous proposons une étude expérimentale comprenant 72 souris. Il est prévu 4 groupes de traitement comprenant chacun 12 souris et une groupe contrôle comprenant 24 souris. Le calcul d'effectif des groupes a été conduit de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux à utiliser en tenant compte de la possible mortalité liée aux accidents de gavage. Les souris seront infectées par voie aérosol ce qui diminue les stress liés à une injection intraveineuse et améliore la reproductibilité. Il n'existe pas à ce jour de méthodes alternatives pour mesurer l'efficacité des combinaisons de médicaments contre cette mycobactérie qui remplacerait la souris ou qui réduirait le nombre de souris à utiliser. Les tests *in vitro* sont fiables en monothérapie et ont déjà été fait, tester les combinaisons *in vitro* est en revanche beaucoup moins fiable et non prédictif des combinaisons actives *in vivo* dans ce modèle, justifiant les études *in vivo*. En revanche il n'est prévu aucune intervention douloureuse, et les souris infectées seront traitées avant l'apparition de signes cliniques de la maladie réduisant ainsi l'inconfort que les animaux pourraient rencontrer, les souris contrôles seront surveillées attentivement pour évaluer déceler tout signe douloureux qui nécessiterait une euthanasie précoce. De plus, des travaux précédents faits chez l'animal sur ce type d'infection démontre que même s'il existe des lésions pulmonaires et des bactéries sur les cultures des poumons de souris infectées, celles-ci ne présentent (contrairement à la tuberculose) aucun signe clinique de douleur, d'altération de l'état général ni même de modification du comportement. De plus les animaux bénéficieront d'enrichissement de leurs cages (litières foisonnantes et absorbantes, fond musical...), de nourriture et de boisson *ad libitum*.

4935. Les nématodes intestinaux sont reconnus pour interférer avec le système immunitaire de leurs hôtes, ce qui favorise l'établissement d'infections chroniques. Cette capacité de moduler la réponse immunitaire de l'hôte est actuellement en voie d'exploitation en vue de soigner des maladies inflammatoires humaines. Cependant, nous ignorons comment le parasite peut s'adapter lorsqu'il fait face à des environnements inflammatoires variables. Répondre à cette question est important si on veut réellement comprendre le potentiel thérapeutique de ces nématodes intestinaux. L'expérience que nous souhaitons réaliser porte sur le modèle constitué par des souris de laboratoire et le nématode *Heligmosomoides polygyrus*. Nous utiliserons des souris BALB/cJrJ femelles, réparties en 5 groupes pour un total de 145 souris.

Etant donné la nature de l'expérience visant à étudier l'adaptation du parasite à un environnement inflammatoire et sa capacité de modulation de l'inflammation intestinale, il n'est pas possible de remplacer le modèle in vivo par des modèles in vitro. Nous avons suivi la règle de réduction du nombre d'animaux en n'ayant que 5 ou 10 souris par groupe (un nombre plus petit d'animaux compromettrait fortement la validité statistique des résultats). Pour ce qui concerne le bien-être des animaux, ils seront hébergés dans des cages dont l'environnement sera enrichi (5 animaux par cage). Les souris seront suivies quotidiennement afin de vérifier leur état de santé et leur bien-être. Si des signes de mal-être sont perçus (perte de poids, changement de comportement avec prostration dans la cage) les animaux seront immédiatement sortis de l'expérience.

4936. La sumoylation est une modification de protéines qui permet de moduler leurs fonctions dans la cellule. Ainsi, la sumoylation touche de nombreux aspects de la vie d'une cellule, et des travaux récents ont montré son importance dans des pathologies à forte prévalence, telle que la maladie d'Alzheimer.

Notre laboratoire s'intéresse à la sumoylation depuis sa découverte à la fin des années 1990. Le laboratoire a développé un modèle murin permettant d'abolir complètement la sumoylation. Ce modèle a permis de démontrer l'importance de la sumoylation dans le développement embryonnaire et dans le renouvellement de l'épithélium intestinal.

Nous souhaitons désormais tirer parti de ce modèle pour démontrer l'importance de la sumoylation dans l'oncogenèse. En effet, plusieurs protéines impliquées dans l'oncogenèse ont d'ores et déjà été décrites sous leur forme sumoylée. Cependant, l'étude du rôle global de la sumoylation dans l'oncogenèse n'a jamais été réalisée, et notre modèle constitue l'outil idéal pour le faire. De plus, des données préliminaires obtenues par le laboratoire sur des biopsies humaines de cancers du côlon d'une part, et du foie d'autre part, montrent une augmentation de la sumoylation dans les tissus hyperplasiques, suggérant un rôle important dans la vie de la tumeur.

Aucun modèle actuel ne permet de reconstituer in vitro le processus complexe de développement tumoral, celui-ci étant fortement impacté par l'organisme, ne serait-ce que par le système immunitaire et des facteurs circulants.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 1504 souris, sur 5 ans repartis en 6 procédures :

5 procédures modérées impliquant 568 souris et une légère impliquant 936 souris.

Ce nombre est le nombre de souris maximum qui sera utilisé pour obtenir des résultats significatifs. Ce nombre pourra être réduit au vu des premiers résultats obtenus. Les protocoles qui seront utilisés dans ce projet ont été bien établis et publiés.

Ces procédures pouvant engendrer des souffrances pour les animaux, ceux-ci seront surveillés et mis à mort dès qu'ils présentent des signes avérés de souffrance selon la grille de suivi de la douleur recommandée par le comité d'éthique

Le bénéfice attendu du projet est de déterminer le rôle de la sumoylation globale dans les étapes basiques de l'oncogenèse ainsi que dans la progression tumorale dans le cadre du cancer du côlon et du foie, ouvrant la voie à une potentielle nouvelle cible thérapeutique.

4937. Le vieillissement de la population représente un problème majeur de santé publique. Ceci dit la compréhension de pourquoi les organismes vieillissent est loin d'être acquise, surtout si on considère que la sélection naturelle ne devrait pas favoriser les génotypes associés à une détérioration de la valeur sélective. Parmi les hypothèses évolutionnistes sur le vieillissement, une d'entre elles suppose que certains gènes confèrent un avantage lorsqu'ils sont exprimés tôt dans la vie d'un individu mais qu'ils induisent des coûts lorsqu'ils sont exprimés à un âge avancé. Bien que très étudié au niveau théorique, nous ne disposons que de très peu d'exemples de gènes/fonctions qui pourraient avoir ce type d'effets. La réponse inflammatoire pourrait bien jouer ce rôle car elle est indispensable pour lutter contre les infections mais elle est aussi l'agent étiologique de nombreuses maladies dégénératives associées au grand âge. Si nous voulons comprendre pourquoi le processus de vieillissement est accompagné de l'apparition de ces pathologies, l'application des concepts de l'écologie et de l'évolution peut s'avérer utile comme pour d'autres questions de santé. Nous souhaitons tester expérimentalement cette hypothèse. Cette expérience portera sur 100 jeunes souris balb/c femelles reparties en 5 groupes expérimentaux. Nous avons suivi la règle de réduction du nombre d'animaux (un nombre plus petit d'animaux compromettrait fortement la validité statistique des résultats). Pour ce qui concerne le bien-être des animaux, ils seront hébergés dans des cages dont l'environnement sera enrichi (5 animaux par cage). Les souris seront suivies quotidiennement afin de vérifier leur état de santé et leur bien-être. Si des signes de mal-être sont perçus (perte de poids, changement de comportement avec prostration dans la cage) les animaux seront immédiatement sortis de l'expérience.

4938. 90% des patients atteints de cancer décèdent de leurs métastases. L'invasion des cellules tumorales dans le microenvironnement local est la première étape de la cascade métastatique et, à ce titre, une cible thérapeutique stratégique. Les cancers colorectaux (CRC) représentent la deuxième cause de mortalité liée au cancer et le foie est le premier site métastatique chez ces patients.

L'aflibercept est une molécule de la classe des anti-angiogéniques, qui a pour but d'inhiber la croissance des vaisseaux qui vont se développer afin de « nourrir » la tumeur. Ce médicament a été approuvé et a obtenu son autorisation de mise sur le marché (AMM) pour les patients atteints d'un CRC métastatiques. Certains patients peuvent être opérés de leur CRC, et recevoir de l'aflibercept en post-opératoire (adjuvant), afin de prévenir l'installation de métastase hépatique.

Toutefois, de manière contradictoire, de récents rapports ont montré que certaines molécules anti-angiogéniques pouvaient promouvoir plutôt qu'inhiber la croissance des métastases dans certaines situations particulières.

Le but de ce projet sera donc de déterminer si l'aflibercept est effectivement capable d'inhiber le développement (adjuvant) et/ou la croissance de métastases (précoces ou tardives) hépatiques de CRC.

L'utilisation d'animaux est nécessaire pour mettre en évidence la capacité de l'aflibercept à diminuer le nombre et la taille des métastases hépatiques.

Pour ce projet, nous utiliserons 60 souris NOD/SCID (immunodéprimées). Ce nombre a été déterminé de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude et que ce dernier puisse nous permettre d'obtenir des résultats exploitables afin de répondre à notre problématique.

Le bien-être des animaux sera respecté en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésique. Ils auront une injection d'analgésique en préopératoire qui sera renouvelée toutes les 24 heures pendant les 48 heures post-opératoires.

Les points limites seront les suivants : perte de poids > 20%, comportement anormal (yeux fermés, dos voûté, isolement), apparence physique anormale (automutilation, plaies), gêne pour se déplacer, augmentation du volume hépatique visible. Nous effectuerons une visite les deux jours suivants les procédures.

Les greffes n'induiront pas de douleur au cours du temps mais pour s'en assurer, ces points seront surveillés trois fois par semaine et consignés dans un cahier de suivi par l'expérimentateur. En cas d'atteinte d'un des points limites, les animaux seront mis à mort dans les 24 heures. Aussi, les souris disposeront de dôme INNODOME pour enrichir leur environnement.

4939. La transition épithélio mésenchymateuse (TEM) est un phénomène mis en évidence dans le développement embryonnaire mais également au cours de la progression tumorale. En effet, la TEM est un processus complexe qui permet à une cellule épithéliale de modifier sa composition et l'organisation de ses protéines pour se détacher de la masse cellulaire à laquelle elle appartient ; elle acquiert alors un phénotype typique de cellules mésenchymateuses (type cellules souches) qui lui confère une motilité et une résistance à la mort cellulaire.

Ce phénomène étant réversible, les cellules cancéreuses l'utilisent afin de développer des métastases et ainsi aggraver la maladie. C'est alors que les patients sont traités par chimiothérapie, traitement lourd et responsable de nombreux effets secondaires.

Ainsi, pour éviter le traitement cytotoxique chez les malades atteints du cancer, dévier la différenciation des cellules souches de cancer peut être une autre alternative. Dans cet objectif, nous analysons la différenciation des cellules mésenchymateuses (lignée de cellules cancéreuses qui ont des caractéristiques des cellules mésenchymateuses) vers des cellules différenciées (non proliférative).

Nous avons effectué plusieurs études in vitro très prometteuses avec une inhibition de la prolifération, et une diminution de l'expression des marqueurs de cellules souches mésenchymateuses (CD90 et CD117).

De ce fait, tester la tumorigénicité de cellules cancéreuses mises en culture avec des milieux de différenciation cellulaire par xéno greffe sur souris Nude est maintenant nécessaire. L'objectif de notre projet est donc de savoir si les cellules cancéreuses différenciées sont encore capables de se développer, de former une tumeur, et seule une expérience in vivo, dans un organisme entier, nous permettra de répondre à cette question. Il y aura ensuite sur les prélèvements des analyses histologiques et immunologiques, notamment pour observer l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et l'apoptose ; Ces informations permettront d'appuyer les résultats obtenus.

Pour ce projet, nous aurons besoin de 150 souris Nude. Ce nombre a été déterminé de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux tout en conservant la validité statistique de l'étude.

Les points limites sont les suivants : gêne pour se déplacer, comportement et apparence physique anormaux, perte de poids >20%, nécrose tumorale, diamètre de la tumeur >2cm. Si un des points limites est atteint, les animaux seront mis à mort dans les 24h. Ces points seront surveillés deux fois par semaine pour permettre de limiter la douleur de l'animal à son minimum. Aucune procédure douloureuse n'est à envisager. Aussi, la croissance tumorale sera suivie par bioluminescence car les cellules expriment le gène de la luciférase. Enfin, les souris disposeront de fibres de peupliers leur permettant de construire un nid et ainsi améliorer leurs conditions d'hébergement.

4940. La communication entre cellules joue un rôle essentiel dans le développement tumoral. Les vésicules extracellulaires (VEs) ont récemment émergé comme des médiateurs majeurs de cette communication car elles transportent des protéines, des lipides, des acides nucléiques et des ARNs. Ces VEs circulent dans l'organisme et peuvent reconnaître des cellules à distance, notamment des cellules cancéreuses, leur délivrer leur contenu et ainsi transmettre un message.

L'idée est d'exploiter les propriétés uniques des VEs pour transporter et transmettre spécifiquement des molécules aux propriétés thérapeutiques qui puissent agir contre le processus tumoral.

Dans notre projet, les molécules aux propriétés thérapeutiques seraient des nanoparticules chauffantes associées à de la chimiothérapie.

En effet, on observe un essor considérable des nanoparticules thérapeutiques activables à distance par un stimulus extérieur (champ magnétique, laser infrarouge).

Notre projet propose donc de combiner les avantages des VEs et des nanoparticules chauffantes pour potentialiser le traitement du cancer tout en réduisant les effets secondaires. Notre approche peut lever un verrou thérapeutique dans la prise en charge de certains types de cancers qui demeurent sans traitement efficace, tel que la carcinose péritonéale.

Pendant toute la durée du projet, nous utiliserons au maximum 574 souris femelles BALB/C ou Nude. Ce nombre a été déterminé après évaluation statistique afin de réduire le nombre d'animaux au minimum mais permettre également d'obtenir une réponse à notre étude. Des tests in vitro sont en cours, notamment pour sélectionner les doses optimales des nanoparticules et les types de nanoparticules utilisés mais l'utilisation des animaux restent nécessaire afin de s'assurer de l'effet du traitement sur les cellules cancéreuses de façon spécifique dans un système intégré.

Le bien-être des animaux sera respecté en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. Ils auront une injection d'analgésique avant l'application du champ magnétique ou l'exposition au laser infrarouge qui sera renouvelée toutes les 24 heures pendant les 48 heures post-opératoires si besoin.

Les points limites seront les suivants : perte de poids > 20%, diamètre tumoral > 1,5cm, comportement anormal (yeux fermés, dos voûté, isolement), apparence physique anormale (automutilation, plaies), gêne pour se déplacer. Nous effectuerons une visite les deux jours suivants les procédures puis, ces points seront surveillés deux fois par semaine et consignés dans un cahier de suivi par l'expérimentateur. En cas d'atteinte d'un des points limites, les animaux seront mis à mort dans les 24 heures. Aussi, les souris disposeront de fibres de peupliers leur permettant de construire un nid et ainsi améliorer leurs conditions d'hébergement.

4941. Dans la famille des Bunyaviridae, le virus Akabane fait partie du séro-groupe Simbu et du genre Bunyavirus. C'est un virus des ruminants transmis par des moustiques, mais surtout par des culicoïdes, enzootiques dans de nombreux pays dont le Japon et l'Australie où il est à l'origine d'épizooties régulières. Le virus Akabane peut être transmis par Le virus Akabane est aussi largement répandu en Afrique, au Moyen-Orient (aux portes de l'Europe) et en Asie, et des anticorps contre ce virus ont été trouvés chez les bovins, les ovins, les caprins, camélidés, les chevaux ainsi que chez plusieurs espèces gibiers d'Afrique. L'infection des animaux adultes est sub-clinique, mais peut entraîner des avortements, en particulier chez les bovins mais aussi chez les ovins et les caprins. La présence du virus Akabane doit être suspectée lorsque des avortements, une mortalité, des arthrogryposes congénitales et des hydrocéphalies surviennent sur un mode épizootique lors de saisons excessivement pluvieuses et au cours desquelles les insectes ont pullulé. Cependant, ce virus qui a une préférence pour les bovins, les ovins et les caprins et ne représentent pas une menace pour l'homme et ne sont pas zoonotiques. Ces virus provoquent généralement des symptômes légers mais si des femelles gestantes sont infectées en début de gestation, entre 30 et 70 jours (brebis), ils peuvent entraîner des avortements et sont tératogènes provoquant ainsi des arthrogryposes, un raccourcissement des tendons du jarret, des déformations de la mâchoire, une hydranencéphalie.

Ce projet vise à infecter expérimentalement 8 brebis de race pré-Alpes avec le virus Akabane par injection intramusculaire puis à suivre leur séroconversion immunitaire par prise de sang répétées pour finalement collecter d'importantes quantités de sérum de référence. Cette production est nécessaire pour la production et la commercialisation d'un test de dépistage ELISA du virus Akabane. Un suivi sanguin sera régulièrement effectué pour examiner les réponses immunes humorales (dans le sérum) et le suivi de la virémie. Remplacement et réduction : en l'absence de méthode alternative pour produire les sera nécessaires, le nombre d'animaux inclus dans le protocole a été déterminé grâce aux retours d'expériences réalisées précédemment. Raffinement : il y aura un enrichissement social (vie en groupe) et de structure (mise en place de ballon et de pierre de sel).

4942. Les plaquettes sanguines sont au centre d'un processus physiologique important qui vise à l'arrêt des saignements : l'hémostase primaire. 2.1011 plaquettes sont produites quotidiennement. Elles sont de petite taille (2µm de diamètre environ) et de forme discoïde, soutenue par un anneau de microtubules (MT) que l'on appelle la bande marginale. Certaines pathologies s'accompagnant d'une perte de la forme discoïde des plaquettes conduisent à une altération des fonctions plaquettaires et à l'apparition de manifestations hémorragiques.

Dans ce contexte, notre projet vise à étudier les mécanismes uniques d'assemblage des microtubules (MTs) nécessaires au maintien de la forme discoïde des plaquettes.

Une analyse protéomique et transcriptomique préalable des mégacaryocytes (MKs) et des plaquettes a permis l'identification d'une combinaison spécifique d'isoformes α ($\alpha 4$ et $\alpha 8$) et β ($\beta 1$) de tubuline dans ces cellules et un rôle de l'isoforme alpha 4A dans la formation des plaquettes. Parallèlement, lors d'études menées in vitro, la différenciation de progéniteurs hématopoïétiques en MKs nous a permis d'identifier la protéine APC (Adenomatous polyposis coli), un partenaire connu des MTs, comme un acteur important de la biogénèse des plaquettes sanguines.

Pour mieux comprendre l'impact de ces acteurs de la biogénèse des plaquettes sur la préservation de la forme discoïde des plaquettes et leurs fonctions, l'utilisation d'animaux transgéniques déficients ou mutés pour ces différentes protéines, la tubuline $\beta 1$ (KO Tubb1), la tubuline $\alpha 4$ (KO Tuba4 et V260E (porteur d'une mutation sur la tubuline $\alpha 4$)), la tubuline $\alpha 8$ (KO Tuba8) et la protéine APC (KO APC), sera indispensable.

Nous étudierons :

i) le risque hémorragique de ces animaux, en mesurant, sur des souris préalablement anesthésiées et sur une durée de 30 min, le temps de saignement et la perte sanguine après une section de la queue à 3mm de l'extrémité

ii) les fonctions plaquettaires à partir de plaquettes isolées du sang. La fonction primaire des plaquettes sanguines et de s'activer au contact d'une brèche vasculaire afin de maintenir l'intégrité des vaisseaux. Pour étudier ex vivo les fonctions plaquettaires il est important de prélever le sang de manière franche à partir d'un gros vaisseau et de mettre le prélèvement directement en contact avec un anticoagulant.

Pour les expériences que nous mènerons nous serons vigilants à mettre en œuvre la règle des 3R :

Réduire le nombre de souris utilisées, en prélevant la moelle osseuse, pour faire de la culture cellulaire, des souris sacrifiées suite à un prélèvement terminal de sang.

Remplacer dès que possible : les expériences seront réalisées in vitro, à partir des cultures de cellules primaires humaines transduites par des shRNA permettant d'étudier l'effet d'une diminution d'expression du gène d'intérêt sur la mégacaryopoïèse.

Raffiner : Toute au long de leur vie, une attention particulière est portée au bien-être des animaux en particulier par un enrichissement de leur milieu de vie qui leur permet d'assouvir les comportements liés à leur espèce. Au cours des procédures, des traitements antalgiques et des anesthésies adaptées sont appliqués.

Les expériences étant menées deux à deux, nous utiliserons un test de Student.

L'étude se fera sur 100 souris de chacune des lignées, nous disposons de 5 lignées, et leurs souris contrôle attenantes, donc au total 1000 souris.

4943. La gaine de myéline joue un rôle important dans la conduction des signaux électriques du système nerveux. De nombreuses pathologies sont liées à une atteinte de cette gaine isolante. C'est le cas de la sclérose en plaques, maladie inflammatoire immunitaire caractérisée par des cycles de démyélinisation et de remyélinisation au cours desquels la dégradation de la myéline est synonyme de troubles moteurs et sensoriels. L'évolution de cette maladie est classiquement suivie par IRM, avec une résolution spatiale insuffisante pour visualiser des fibres individuelles de myéline. Les suivis in vivo reposent donc principalement sur l'observation de lésions étendues dans la substance blanche (lésions sous corticales), touchant des faisceaux de fibres. Or des études, pour la plus part post mortem, ont montré l'existence de lésions corticales, soit diffuses dans les couches superficielles (lésions épidurales), soit focales (intracorticales ou mixtes corticales et sub-corticales). La compréhension de l'influence mutuelle entre la démyélinisation des différentes structures cérébrales et de leurs liens avec d'éventuelles pertes fonctionnelles, pourrait amener à mieux comprendre les stades précoces de la maladie mais reste à l'heure actuelle une question ouverte.

Le développement de stratégies pharmacologiques potentielles de remyélinisation permet d'envisager le développement à court terme d'essais cliniques de phase II chez les patients atteints de sclérose en plaques. Les critères d'évaluation de ces essais reposeront en grande partie sur des méthodes d'imagerie quantitative de la myéline. En l'état actuel, la majorité des séquences d'IRM proposées manquent de spécificité ou n'ont pas été suffisamment validées dans des modèles pertinents. Ceci nous a conduit récemment à proposer des techniques d'imagerie moléculaire en TEP à l'aide de marqueurs myéliniques utilisables en clinique.

Dans le présent projet, nous souhaitons développer les axes complémentaires suivants:

- validation et application de méthodes d'imagerie myélinique en IRM dans des modèles expérimentaux
- Etude des conséquences fonctionnelles et imagerie de la démyélinisation corticale
- Développement d'une technique d'imagerie des précurseurs d'oligodendrocytes

La technique d'IRM nous permettra de ne pas utiliser trop d'animaux, 200 animaux pour ces 5 ans

Nous avons suivi la règle des 3R en introduisant des points limites à notre protocole. En revanche, et à notre connaissance après une recherche dans plusieurs bases de données de la littérature scientifique, il n'y a pas d'alternative à l'utilisation de modèles animaux pour étudier la sclérose en plaques. En conséquence, nous prévoyons l'emploi d'un modèle murin simple que nous maîtrisons parfaitement au laboratoire et un total de 200 souris seront nécessaires pour ce projet. La règle des 3 R a été considérée pour la mise en place du projet: -Réduction du nombre d'animaux suffisants pour permettre des données statistiquement fiables. Les études in vivo développées dans ce projet permettent des approches fonctionnelles sans mise à mort de l'animal permettant un suivi pendant plusieurs semaines réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés -Raffinement le stress/fatigue/douleur de l'animal est réduit à son maximum par une surveillance quotidienne, -Remplacement. Les animaux ne peuvent pas être remplacés dans ce type d'expériences. La culture cellulaire, du fait de sa connectivité réduite, ne reproduit pas toutes les propriétés.

4944. La résistance aux antibiotiques des entérobactéries représente un problème majeur de santé publique tant en milieu nosocomial que communautaire, en particulier via la production d'enzymes de type β -lactamase à spectre étendu (BLSE) ou de carbapénémase. La résistance aux antibiotiques est telle que nombre d'infections sont devenues intraitables. Au sein de l'Union Européenne, on estime qu'au moins 25 000 patients décèdent chaque année d'une infection due à une bactérie multi-résistante ou hautement résistante (BMR/BHR). La diffusion des BMR/BHR expose à un risque de prescriptions d'antibiotiques inadaptés. Or, il est clairement établi qu'une antibiothérapie initiale inadaptée est responsable d'une augmentation de morbidité et de mortalité. D'autre part, la dissémination des entérobactéries productrices de BLSE a pour conséquence une prescription accrue de carbapénèmes qui sont le dernier groupe de β -lactamines à large spectre efficace mais qui favorisent l'apparition des carbapénémases.

La colonisation digestive à entérobactéries BMR/BHR est le principal facteur de risque d'infection. De plus, le risque d'infection augmente avec le niveau de colonisation. Par ailleurs, le portage digestif de BMR/BHR représente un des réservoirs de gènes de résistance les plus importants et également un site de transferts de gènes entre différentes espèces contribuant ainsi aux phénomènes de dissémination. Ainsi, la décolonisation du portage digestif est considérée comme une priorité pour lutter contre la dissémination et les conséquences de l'antibiorésistance. L'utilisation d'antibiotiques dans ce cadre a été testée mais n'a pas montré son efficacité ; il est souvent rapporté un effet à très court terme mais qui disparaît au-delà de 7 jours. Par ailleurs, elle occasionne des effets secondaires non négligeables. Face à l'explosion de la multi-résistance et des risques d'impasses thérapeutiques, il est essentiel de chercher et développer de nouvelles armes antibactériennes.

Les bactériophages (ou phages) découverts en 1915 par Frederick W. Twort, pourraient être une de ces nouvelles armes. Les phages sont des virus présents dans l'ensemble de la biosphère. Ils infectent les bactéries et il existe au moins un phage identifié pour chaque bactérie. Les phages sont utilisés dans le monde vétérinaire mais également dans l'industrie alimentaire comme moyen de décontamination bactérienne. En médecine humaine, différentes utilisations sont décrites : dysenterie, abcès, brûlures, ulcères cutanés etc... Leurs voies d'administration sont variées (orale, rectale, ou en inhalation).

Le développement de cocktails de phages pour décoloniser des patients du portage intestinal de BMR/BHR ou diminuer la charge bactérienne, ouvre une perspective intéressante et innovante: diminution du risque de transmissions croisées donc réduction des infections liées aux BMR/BHR et diminution de la morbidité-mortalité associées.

Notre projet consiste à évaluer l'efficacité d'un traitement par phages dans un modèle murin dont le tractus digestif aura préalablement été colonisé par une entérobactérie. Nous avons choisi le modèle murin car il a été récemment montré comme étant

un bon modèle de décolonisation nasale par phages de *S. aureus* résistant aux β -lactamines. Nous avons choisi des souris femelles (afin d'éviter les conflits entre mâles) SWISS (souris immunocompétentes non consanguines).

En application de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour nous permettre (1) de tester les conditions optimales d'établissement de la colonisation par une entérobactérie soit 99 souris ; et (2) de tester et de valider statistiquement la décolonisation par le traitement par phages une fois le modèle établi. Deux concentrations de phages seront alors testées afin de déterminer la concentration optimale à utiliser, soit 136 souris pour une souche de *K. pneumoniae* associée à 5 phages. Au total, pour le premier test, 235 animaux sont nécessaires.

L'utilisation d'un modèle in vivo est indispensable dans l'étude de l'efficacité du traitement par phages et ne peut être remplacé. En effet, tout le microbiote intestinal est susceptible d'interagir avec les phages et il est nécessaire d'en apprécier les effets avant une possible extrapolation du traitement chez l'homme. L'enrichissement utilisé et les procédures expérimentales classées légères permettent de limiter le stress des animaux. L'observation biquotidienne des souris va permettre de fixer des points limites précoces afin de n'engendrer aucune souffrance chez les animaux.

L'évolution des recherches actuelles sur les phages et l'émergence de résistance sur les entérobactéries peuvent nous mener à tester des combinaisons entérobactéries/ phages supplémentaires. Nous souhaitons tester au maximum l'action de 5 cocktails de 5 phages sur *K. pneumoniae* en plus de l'expérience de mise au point du modèle, ce qui porterait le nombre d'animaux à utiliser pour tester l'efficacité des phages à 5 x 136 souris soit 680 animaux. En effet, une fois les conditions optimales d'établissement de la colonisation par une entérobactérie établie, il ne sera pas nécessaire de réitérer l'étape de mise au point du modèle et les 99 souris utilisées pour cette mise au point ne seront plus nécessaires (règle des 3R).

Au total, le projet d'évaluation d'un cocktail de phages sur une entérobactérie nécessite 915 souris réparties comme suit : 99 souris pour la mise au point des conditions optimales de la colonisation par une entérobactérie ; 136 souris pour tester la décolonisation par le traitement par phages sur une souche de *K. pneumoniae* associée à 5 phages à deux concentrations ; 680 souris pour tester la décolonisation par le traitement par 5 autres cocktails de 5 phages sur *K. pneumoniae* supplémentaires (136 x 5).

4945. La formation commune de base des étudiants inscrits en pharmacie implique d'aborder des notions fondamentales et expérimentales de physiologie humaine et animale ainsi que de pharmacologie à travers des cours magistraux, des enseignements dirigés et des travaux pratiques (TP). Les TP d'expérimentation animale sur rats et souris proposés permettront de préparer l'ensemble des étudiants à l'acquisition de compétences en pharmacologie expérimentale et à la compréhension des mécanismes d'action des molécules médicamenteuses utilisées en thérapeutique humaine et vétérinaire.

Avec la réforme des études de santé, des unités d'enseignements optionnelles (UEO) ont été incluses dans les maquettes de formation dans le but de préparer de petits groupes d'étudiants à leur insertion professionnelle. Afin de préparer les étudiants désireux de s'orienter vers une filière recherche, une UEO d'expérimentation animale appliquée à la physiologie et à la pharmacologie sera proposée en 2ème et 3ème année d'étude. Pour cette UEO, 25 rats par an et 25 souris par an seront utilisés au maximum soit sur 5 ans, au maximum 125 rats et 125 souris. Celle-ci permettra de sensibiliser les étudiants à la méthodologie employée dans les laboratoires de recherche et d'aborder les questions éthiques que posent l'utilisation de l'animal de laboratoire. Ces TP seront également, dans le cursus des études pharmaceutiques, la seule opportunité pour les étudiants de mettre en application pratique les cours théoriques vus précédemment.

Cette formation sera dispensée à un nombre restreint d'étudiants (12 maximum). Elle aura pour objectif de mettre en situation pratique l'étudiant afin qu'il utilise ses connaissances en physiologie des systèmes cardiovasculaire, digestif et nerveux central, en pharmacologie moléculaire ainsi qu'en éthique animale dans le but d'analyser les effets sur l'animal de molécules médicamenteuses.

Pour ce projet les principes de remplacement, de réduction et de raffinement seront appliqués. Dans le cadre de leur formation globale à l'expérimentation animale, les étudiants recevront des formations sur l'éthique, la réglementation en vigueur ainsi que sur les méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum (n=25 par an par espèce). Ce nombre est nécessaire afin de couvrir les expériences de 12 étudiants par semaine sur 3 semaines par an soit 36 étudiants formés par an. Ce nombre peut être diminué en fonction du nombre d'étudiants inscrits à cette UEO. Enfin, 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.

4946. Ce projet, ayant pour finalité la conservation d'espèces d'oiseaux marins menacés, traite de l'errance animale et plus précisément de l'impact des chats errants (*Felis catus*) sur 4 espèces d'oiseaux marins présents à l'île de La Réunion ; 2 espèces protégées nichant sur le littoral urbanisé : le Puffin du Pacifique (*Puffinus pacificus*) et le Paille en queue à brins blancs (*Phaethon lepturus*), et deux espèces de pétrels (endémiques et menacés d'extinction) nichant dans les hauts de l'île, au cœur du Parc national de La Réunion classé au patrimoine mondial de l'UNESCO : le Pétrel de Barau (*Pterodroma barau*) et le Pétrel noir de Bourbon (*Pseudobulweria aterrima*), ce dernier considéré comme un des oiseaux le plus rare du monde. Des études scientifiques et de nombreuses observations de terrain ont montré que les chats errants, présents partout sur l'île même dans les plus hautes falaises, avaient un impact important sur ces 4 espèces en tuant et consommant des poussins et des adultes. L'objectif de ce projet est d'obtenir, d'une part, des informations sur les populations de ces prédateurs (taille, densité, déplacement et taille de territoire, démographie et dynamique de colonisation des milieux reculés, connectivité entre milieux anthropisés et naturels), d'autre part, d'identifier des risques sanitaires afin de mettre en place une politique de conservation et de gestion adaptée à ces milieux naturels.

Dans ce cadre, afin de répondre aux objectifs, des captures de chats sont réalisées, l'équipement télémétrique de ces derniers et des euthanasies pour des prélèvements post-mortem.

Un total de 150 chats au maximum sera utilisé durant la première année de mise en place du projet. Par la suite, il sera prélevé 50 chats maximum par an sur les 4 années suivantes du projet, permettant de suivre l'évolution de la dynamique de la population et des comportements des chats restants, ainsi que la prévalence des agents pathogènes. Ces procédures seront réalisées dans le respect de l'animal, en prenant les mesures nécessaires pour qu'il n'y ait pas de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

4947. Au sein de notre laboratoire, nous sommes amenés à former le personnel sur des techniques d'expérimentations et des techniques de chirurgies.

Les recherches menées chez l'animal se feront dans le cadre de formation interne encadrée par le responsable de projet. Les procédures abordées au cours des formations seront avec des degrés de sévérités légères et modérés.

Pour les procédures de classe légère les techniques pratiquées seront : la contention, l'identification par bague, prélèvements sanguins, les différentes voies d'administration par injection intra-péritonéale, per-os, sous-cutané, intraveineuse et intramusculaire.

Pour les procédures de classe modérée les techniques abordées seront de la chirurgie légère: ovariectomie, néphrectomie.

Le respect du bien-être animal passera par les conditions d'hébergement des animaux, par le suivi quotidien des animaux, par l'instauration de points limites et par la mise en place de traitement d'analgésique ou bien d'euthanasie.

L'ensemble des formations représente un total de 200 souris pour 1 an soit un total de 1000 souris pour les 5 ans demandés. Le nombre de souris c57 bl6 choisit est réduit au minimum (ce nombre est choisi de manière à obtenir une formation performante pour le personnel a formé). Ce projet se fera dans le respect de la règle des 3 R de manière à assurer autant que possible une Réduction des animaux utilisés le Raffinement des techniques opératoires d'analgésie et d'euthanasie ainsi que le Remplacement le cas échéant par des techniques in vitro.

4948. La maladie de Parkinson est une affection neurologique d'origine incertaine, provoquée par la destruction irréversible d'une population bien définie de cellules nerveuses, les neurones dopaminergiques du tronc cérébral. L'objectif de ce projet est d'étudier, les effets de gaz rares comme le xenon et/ou l'argon. Dans un modèle expérimental de cette maladie chez la souris (par injection intra-nigrale de PDC: un inhibiteur du transporteur de recapture du glutamate). En effet, ces gaz ont déjà démontré leur potentiel neuroprotecteur dans différents modèles expérimentaux, de pathologies aigues comme l'ischémie cérébrale mais jamais dans des maladies dégénératives chroniques. La finalité du projet sera de déterminer si ces gaz protègent la dégénérescence des neurones dopaminergiques, suite à l'injection dans la substance noire de PDC, et préviennent ou corrigent certains déficits moteurs associés à la dégénérescence de ces neurones.

Le projet nécessite une estimation de 268 souris sur fond génétique C57/BL6J.

Tout au long du projet la règle des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement) sera respectée et appliquée

1) Réduction, Le nombre de 268 souris (148 pour la mise en place du modèle chez la souris et 120 pour le projet en soi), prévu dans le contexte de ce projet, représente le nombre d'animaux nécessaire pour tester les effets potentiels des gaz rares et pour générer des résultats statistiquement robustes, en considérant la variabilité inhérente aux modèles animaux.

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 ; De plus, Les tests préliminaires effectués sur les 148 souris, nous permettront de nous placer dans les conditions optimales pour le bon déroulement du projet.

3) Remplacement, la souris est communément utilisée en recherche préclinique pour modéliser les maladies neurologiques humaines. Le choix des souris C57/BL6 J vient du fait que cette souche est généralement utilisée pour les tests comportementaux et aussi du fait que des souris génétiquement modifiées qui pourraient être potentiellement ultérieurement, dans le contexte de cette étude, sont produites sur un même fond génétique. Il s'agit des souris KO EAAC1, qui présentent une perte des neurones dopaminergiques progressive, associée à des déficits moteurs. L'expérimentation sur le rongeur reste, pour des raisons éthiques évidentes et pour des raisons de coût et de faisabilité, une étape indispensable avant toute expérimentation sur des modèles plus proches de l'homme comme le primate non-humain.

4949. L'objectif du projet est d'apporter un regard nouveau dans l'étiologie des maladies métaboliques en analysant les mécanismes et signatures épigénétiques impliqués dans le développement de l'obésité et du diabète de type 2. En effet, bien qu'il soit largement admis que l'obésité augmente significativement le risque de développer un diabète de type 2, il est encore mal compris pourquoi tous les patients obèses ne développent pas un diabète de type 2. De même, il n'existe, à l'heure actuelle, aucun modèle permettant d'expliquer la rémission des symptômes du diabète de type 2 observée chez certains patients obèses après chirurgie bariatrique. Les anomalies épigénétiques sont une des réponses à ces questions. Notre recherche se fonde sur l'obtention d'épigénomes issus d'adipocytes et d'hépatocytes provenant d'un modèle de rat développant des symptômes de diabète et d'obésité, et ayant subi une chirurgie bariatrique. Nous utiliserons donc un modèle de rat isogénique développant spontanément des symptômes du diabète, le rat GK (Goto-Kakizaki). Suite au développement d'une obésité chez le rat GK – induite par une mise sous régime enrichi en graisses (60%) – nous réaliserons une gastrectomie longitudinale consistant à retirer environ les deux-tiers de l'estomac. Des explorations physiologiques seront entreprises avant et après chirurgie. Les phénotypes mesurés seront le poids corporel, la glycémie, la tolérance au glucose et la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

La réduction est prise en compte, n=12 est le n minimum pour avoir des résultats fiables et fins pour le dosage de sécrétion d'insuline effectué par ELISA ainsi que pour l'observation de variations génomiques et épigénomiques individuelles. En ce qui concerne le raffinement, la chirurgie gastrique est effectuée sous anesthésie et un cocktail d'antibiotiques, analgésiques et

d'antidouleurs est administré à l'animal durant les 3 jours suivant la chirurgie. Au moindre signe de souffrance, l'expérimentation sera arrêtée. Pour le remplacement, nous utiliserons dès que possible des modèles cellulaires pour étudier l'aspect plus mécanistiques des effets physiologiques que nous aurons pu observer in vivo. Nous ne multiplierons pas les procédures sur ces animaux. Nous utiliserons 48 rats au total.

4950. Les aptamères sont de petites molécules d'ADN ou d'ARN qui ont des propriétés comparables aux anticorps dans leurs capacités de cibler les molécules. Cependant, les aptamères possèdent des avantages par rapport aux anticorps : ils n'induisent pas de réponse immunitaire indésirable et peuvent être sélectionnés pour lier à leurs cibles de manière plus spécifique que les anticorps. Pour ces raisons, nous développons des aptamères pour le traitement et le diagnostic de la maladie d'Alzheimer (MA).

Thérapeutique : La maladie d'Alzheimer est définie par la présence d'agrégations de deux protéines : tau et bêta-amyloïde (BA). Notre but est de développer un traitement à base d'aptamères afin d'inhiber l'agrégation de ces protéines et, de ce fait, ralentir la progression ou retarder l'apparition de la maladie.

Pour ce faire, nous allons montrer que ces aptamères sont capables de pénétrer la barrière hématoencéphalique (barrière qui sépare le système sanguin du cerveau).

Dans toutes nos expériences, la procédure de base ne change pas et consiste en l'injection de nos séquences d'aptamères dans la veine caudale d'une souris. Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale (risques d'altération des résultats expérimentaux en cas d'utilisation d'un anesthésique) et les séquences d'aptamères ayant traversé la BHE sont extraites et séquencées. Des souris de souche sauvage C57Bl6 et de souche mutante P301S seront utilisées pour ce projet.

Dans nos premières séries d'expériences, nous allons injecter des séquences aléatoires dans la veine de la queue et récupérer celles qui passent au travers de la BHE. Nous allons ensuite utiliser ces séquences pour la sélection de séquences spécifiques qui se lient soit à tau ou à la BA. Une fois cette sélection faite, nous allons démontrer que ces aptamères peuvent inhiber l'agrégation de ces protéines in vitro. Ceux qui inhibent l'agrégation de ces protéines et qui traversent la BHE seront prioritaires pour les tests de leur efficacité sur la souris. Avant l'évaluation de l'efficacité, nous devons étudier leur capacité à pénétrer la BHE et à y être retenus.

Et finalement, nous voulons démontrer que ces aptamères ont la capacité d'inhiber l'agrégation de ces protéines dans le cerveau de la souris. Nous ferons ça en deux temps. Dans les premières expériences, nous mesurerons l'effet des aptamères sur la quantité de protéine agrégée en examinant le tissu cérébral de souris transgéniques traitées avec l'aptamère au microscope. Nous allons tester à nouveau les aptamères qui se comportent bien dans cette expérience dans une expérience ultérieure où nous évaluons la capacité des aptamères à prolonger la rétention de la mémoire chez les souris transgéniques qui présentent des symptômes de la maladie d'Alzheimer.

Diagnostic : Pour ce qui est de la partie diagnostique, nous avons déjà sélectionné des aptamères contre un mélange de sérum sanguin provenant de différents patients atteint de la MA. Nous ne sélectionnons que des aptamères qui ne se lient à des épitopes spécifiques de la MA. Nous caractérisons la covariance de ces aptamères à travers ces patients individuellement. Nous utilisons alors ceux-ci pour diagnostiquer et caractériser la sévérité de la maladie.

Nous voulons étendre et confirmer cette analyse en reproduisant cette étude avec les souris de lignée P301S. Ce processus implique que nous prélevons 100 µL de sang par animal à un âge de 6 mois. Ce processus sera répété tous les mois pendant 4 mois. Les souris utilisées seront les mêmes que pour les autres procédures afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés lors de ce projet.

Un total de 390 souris est prévu pour tout ce projet. De plus, nous prévoyons le maintien de colonie de la lignée P301S, mutante et exhibant des symptômes de la maladie d'Alzheimer.

Toutes les souris transgéniques seront euthanasiées dès qu'elles présenteront des symptômes importants de dysfonctionnement physique. Dans ces lignées, une perte de poids est souvent observée due à une paralysie du train arrière. De ce fait, celles-ci seront pesées hebdomadairement et si elles perdent 20% du poids maximal atteint, elles seront sacrifiées afin de réduire la durée et l'intensité de la souffrance.

Du fait que le temps de l'injection n'est que de quelques minutes, nous ne prévoyons pas un besoin de remplacement. Pour ce qui est des souris transgéniques, nous ne comptons pas remplacer et nous prenons en compte les effets de l'aptamère sur cette souris. Nous avons réduit le nombre de souris utilisées pour un minimum de 5 ou 10 par traitement. Ce nombre est minimal pour une estimation statistique. Cela représente une réduction. La voie d'administration intraveineuse a été retenue car il s'agit de celle utilisée chez l'Homme pour injecter les traitements. Aucun effet secondaire n'est attendu suite aux injections, mais les animaux seront surveillés durant 1 à 2h suivant cet acte, puis observés tous les jours, et pesés régulièrement. Les procédures exécutées ne provoqueront qu'un inconfort passager (injections intraveineuses) et ne nécessiteront qu'une contention légère. A la fin des protocoles expérimentaux, le cerveau sera prélevé sur les animaux qui auront été euthanasiés. Durant l'étude, tout sera mis en œuvre pour minimiser le stress auquel les animaux sont soumis. Les animaux seront hébergés en groupe, et des éléments d'enrichissement du milieu seront mis à disposition: blocs à ronger, litière papier pour la confection de nids Si un animal présentait un état douloureux inacceptable, ou des signes de mal-être important, il sera examiné par un vétérinaire, et si nécessaire anesthésié puis euthanasié.

4951. Notre laboratoire a déjà caractérisé in vitro l'action du VEGF-C sur les cellules souches neurales et les cellules endothéliales lymphatiques. Nous voulons maintenant tester les effets de la signalisation VEGF-C/VEGFR3 sur la maintenance et l'activité des cellules souches neurales et des vaisseaux lymphatiques méningés au cours du vieillissement, dans le contexte de maladies neurodégénératives, et dans l'optimisation des greffes intracérébrales de cellules souches afin de réparer les tissus cérébraux. Les

conditions in vitro ne reproduisent qu'une partie de la complexité des signaux moléculaires (ligands, matrices extracellulaire) et des interactions cellulaires dans la niche neurogénique qui sont réunis in vivo. L'ensemble de nos études ne peut donc être conduit que par des expérimentations in vivo et ne sont pas remplaçables par des expériences in vitro sur cellules isolées.

Nos études nécessiteront environ 420 souris au cours des 4 prochaines années, soit environ 5 souris par semaine et 21 semaines par an. Le nombre d'animaux a été calculé de façon la plus fine pour s'assurer d'avoir des résultats statistiquement exploitable tout en minimisant le nombre d'animaux utilisés. Toutes nos expérimentations in vivo sont décrites dans notre protocole expérimental et sont encadrées par lui, avec des contrôles réguliers des animaux et des points limites établis pour réduire la souffrance et la douleur des animaux et limiter au maximum la variabilité des résultats expérimentaux.

Le développement, le maintien et la réparation des tissus nerveux dépendent d'une part de l'activité des cellules souches neurales, qui produisent et renouvellent les cellules nerveuses, et d'autre part du lien neurovasculaire qui permet de connecter le tissu nerveux avec le reste de l'organisme.

Nous avons montré que les cellules neurales et vasculaires partageaient des systèmes de signalisation communs. Par exemple, le récepteur VEGFR3 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3) est exprimé par les cellules souches neurales murines/humaines et par les cellules endothéliales lymphatiques. Nous avons aussi découvert que le ligand du VEGFR3, VEGF-C (Vascular Endothelial Growth Factor-C) activait les cellules souches neurales en les faisant quitter leur état quiescent pour entrer en division et en différenciation, et également stimulait la croissance des vaisseaux lymphatiques des méninges.

Afin de visualiser les cellules souches neurales et les cellules endothéliales lymphatiques exprimant le VEGFR3, nous avons développé une souris transgénique exprimant un rapporteur fluorescent (Venus, aussi appelé YFP) sous le contrôle des séquences régulatrices du VEGFR3.

Dans ce contexte nos objectifs actuels sont:

- Identifier des sous-populations de cellules souches neurales exprimant VEGFR3 dans différentes régions du cerveau adulte;
- Caractériser les gènes clefs qui sont associés à la quiescence, la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales in vivo.
- Analyser les interactions cellulaires et moléculaires entre les cellules souches neurales et le réseau vasculaire cérébral et méningé
- Analyser les conséquences des interactions neurovasculaires sur le vieillissement cérébral, les maladies neurodégénératives et la réparation des tissus cérébraux.

4952. La séparation maternelle (SM) est un stress postnatal permettant de reproduire la symptomatologie de la prématurité observée en clinique. Nous avons observé que les animaux adultes ayant été au préalable exposés à cette perturbation néonatale présentaient une hypersensibilité à la douleur comparativement aux animaux contrôles ainsi qu'un comportement social plus réduit et une anxiété accrue. De nombreuses études ont montré le rôle de l'ocytocine (OT) et de la vasopressine, deux molécules synthétisées dans l'hypothalamus, dans la régulation des comportements sociaux, du comportement maternel et dans les contrôles de la douleur. Le système ocytocinergique est donc un candidat de choix pour tenter d'expliquer les comportements atypiques des animaux ayant subi cette séparation maternelle à la naissance.

En outre, cette étude fait suite à un précédent projet de recherche de l'équipe qui a démontré un défaut de fonctionnement de l'analgésie portée par l'OT dans des situations de stress non douloureux chez les animaux ayant été séparés de leur mère à la naissance. Cependant, la réponse du système OT suite à un stress douloureux n'avait pas été étudié, ni les mécanismes à l'origine de ce défaut de fonctionnement.

De ce fait, dans ce complément nous étudierons les réponses douloureuses à une inflammation, connue pour recruter le système anti-douleur associé à l'ocytocine. Nous tenterons également de comprendre pourquoi le système ocytocinergique n'est pas fonctionnel chez ces animaux, avec pour objectif de mettre en évidence des cibles thérapeutiques potentielles.

Les travaux se dérouleront sur trois ans et utiliseront 282 rats Wistar, soit 22 femelles gestantes et 260 animaux de la descendance. Ce nombre d'animaux permettra d'effectuer des analyses statistiques classiques démontrant la significativité de l'effet de la séparation maternelle sur les données mesurées. La règle des 3R sera mise en œuvre à travers les procédures suivantes : raffinement par un hébergement en cages collectives enrichies (nid + bâtons) après sevrage et maintien des fratries après séparation selon les sexes. Bien que ce projet nécessite une approche invasive (implantation de cathéters d'injection), le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux tout au long de l'expérience (habituation à l'expérimentateur, anesthésiques, analgésiques); réduction par une utilisation des portées dans leur ensemble sans tenir compte du sexe biologique dans un premier temps. Un avenant sera apporté si un éventuel effet sexe-spécifique devait être suspecté pour analyser séparément les mâles et femelles, afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. Etant donné que ce projet a pour but d'étudier les conséquences comportementales de la séparation maternelle sur le système ocytocinergique, aucun remplacement n'est envisageable car le comportement requiert l'intégrité des circuits neuronaux.

4953. Au cours de la maladie d'Alzheimer (MA), différentes protéines s'accumulent de façon anormale dans le cerveau des patients. Ces protéines pourraient transmettre leurs caractères pathologiques (« mauvaise conformation » et toxicité) aux protéines bien conformées et présentes naturellement dans les tissus. Ce phénomène de propagation évoque celui à l'œuvre dans les maladies à prions (maladie de la vache folle, maladie de Creutzfeldt-Jakob). Notre projet vise à étudier les mécanismes de ce phénomène en répondant à deux questions principales :

- 1) Les lésions de la maladie d'Alzheimer se propagent-elles le long des connexions nerveuses (appelées axones) ?

Nous étudierons la propagation des lésions, chez l'animal (souris) dans un circuit anatomique bien délimité reliant deux structures cérébrales (le subiculum et les corps mamillaires) via un faisceau de fibres axonales (le fornix). Nous utiliserons à nouveau un paradigme d'infusion intracérébrale. Des souris recevront des injections de fornix provenant de patients Alzheimer. Les injections seront réalisées dans le subiculum et on étudiera la présence et transport des agrégats pathologiques dans le fornix et dans les corps mamillaires. L'analyse des résultats permettra d'affiner notre connaissance des mécanismes de propagations des lésions.

2) Existe-t-il différentes souches de la maladie d'Alzheimer ?

La maladie d'Alzheimer est une maladie hétérogène : d'un patient à l'autre les symptômes varient, s'aggravent plus ou moins vite et parfois l'évolution est fatale en un an. On peut suspecter l'existence de différentes souches de la maladie que nous allons isoler et étudier. Nous évaluerons la capacité de tissus cérébraux de patients avec des formes distinctes de la maladie à induire, une fois injectés chez l'animal (souris), des lésions et des symptômes précis, attestant de l'existence de différentes souches. Ce travail vise à mieux comprendre l'hétérogénéité de la maladie d'Alzheimer. En particulier, pourquoi certains patients déclenchent une maladie relativement jeune avec une évolution rapide alors que d'autres patients s'aggravent plus lentement ? La compréhension des mécanismes responsables de la vitesse d'évolution permettra des approches thérapeutiques « ciblées » qui prennent en compte la diversité des patients. On sait en effet que différentes souches responsables d'une maladie peuvent répondre de façon variable aux traitements ciblant les lésions. Ainsi, au-delà des connaissances fondamentales apportées sur la maladie d'Alzheimer, notre projet aura des prolongements dans les domaines de la thérapeutique et de la santé publique.

Nous utiliserons sur 5 ans un total de 616 souris. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée

1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données reproductibles et donc solides ;

2) raffinement, les animaux seront soumis à une chirurgie unique au cours de la période d'expérimentation, chirurgie qui ne s'accompagne pas d'effets secondaires dommageables ;

3) remplacement, les études de propagation permettant de répondre aux questions posées ne peuvent être réalisées que sur des souris transgéniques, mimant à bas bruit les lésions de la maladie d'Alzheimer (souris transgéniques APP et tau) et chez lesquelles les effets des différents injectats pourront être étudiés.

4954. Les troubles neuropsychiatriques sont aujourd'hui les premières causes de souffrance et d'handicap à l'échelle mondiale, avec les pathologies cardiovasculaires et les tumeurs cancéreuses. La résistance aux traitements pharmacologiques classiques a mené au développement d'alternatives thérapeutiques, les plus prometteuses étant les méthodes de neurostimulation. Le progrès considérable réalisé dans les domaines de la stimulation magnétique et électrique profonde souffre cependant de limitations techniques (précision ou chirurgie invasive).

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

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

Dans un projet précédent qui permit d'évaluer la faisabilité de cette technique chez la souris mâle, nous avons déterminé les paramètres optimaux requis pour réaliser une stimulation ultrasonore précise et efficace. Dans la poursuite de ce projet, l'objectif de la présente étude est de mettre en œuvre un protocole thérapeutique basé sur les ultrasons dans un modèle murin mâle de dépression. Les effets de ce nouveau protocole sur l'activité cérébrale seront évalués in vivo par imagerie scintigraphique au ¹⁸F-DG, une technique qui permet d'observer distinctement le métabolisme cérébral

Cette demande d'autorisation de projet correspond donc à la partie imagerie du projet déposé initialement dans un établissement utilisateur (EU) voisin. Elle est soumise ici dans cet autre EU car la procédure décrite dans le présent document nécessite l'utilisation d'un imageur scintigraphique, uniquement présent dans l'EU.

Pour cette expérience, 24 souris réparties en 2 lots sont requises.

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

- Raffinement : les différentes procédures seront réalisées sous anesthésie. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu et hébergement en groupe.

- Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée, les procédures doivent être réalisées sur l'animal vivant afin d'engager des études approfondies par la suite.

- Réduction : les effectifs sont optimisés, l'évaluation de plusieurs variables méthodologiques nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité interindividuelle (n = 32). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

4955. Environ 1/3 de la population mondiale souffre d'anémie consécutive à une carence en fer, une maladie génétique ou une maladie chronique. Outre son rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques fondamentaux tels que la synthèse et la réparation de l'ADN, le fer est essentiel au transport de l'oxygène en tant que constituant majeur de l'hémoglobine. En effet, la production et la maturation des érythrocytes dans la moelle osseuse mobilisent les deux tiers du fer présent dans l'organisme. L'hepcidine est une hormone synthétisée par le foie qui joue le rôle de régulateur central de l'homéostasie du fer. L'hepcidine contrôle le flux de fer vers le compartiment sanguin : l'absorption du fer contenu dans le bol alimentaire au niveau de l'intestin, le

recyclage du fer par les macrophages qui phagocytent les globules rouges sénescents, et la mobilisation du fer stocké dans les hépatocytes. L'apport en fer lors d'un besoin accru en fer pour la synthèse de nouveaux globules rouges est régulé par des mécanismes complexes encore mal connus. Notre projet vise à décrypter ces mécanismes qui entrent en jeu pour corriger une anémie consécutive à une hémorragie, un syndrome inflammatoire le paludisme ou encore dans les anémies héréditaires comme la β -thalassémie, une maladie génétique affectant des millions de personnes dans le monde. Malheureusement, les traitements actuels sont peu efficaces et très contraignant pour ces patients. Notre projet conduira au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des surcharges en fer primaires (hémochromatoses), secondaires à une anémie (thalassémies), et les anémies inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde, maladies chroniques de l'intestin, affections rénale chronique, infections, cancer...).

Pour ce faire, nous utiliserons différents modèles de souris de pathologies humaines mis en place au sein de l'institut comme les maladies inflammatoires de l'intestin, les infections bactériennes et le paludisme et à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des anémies et des surcharges en fer. La régulation du fer est impossible à modéliser *in vitro*. Il est pour l'instant impossible de la contrôler chez l'homme car les voies de régulation ne sont pas totalement connues. Les modèles de souris génétiquement modifiés miment les pathologies humaines et sont la seule solution actuelle pour obtenir des données avec une pertinence physiologique correcte. Pour atteindre les objectifs de nos études, il est nécessaire d'utiliser des modèles *in vivo* capables de tenir compte de nombreuses voies physiologiques intégrées. Il n'existe pas actuellement des méthodes alternatives à ces études *in vivo*. L'espèce animale utilisée dans ce projet (souris) offre la possibilité de développer de nombreux modèles mimant plusieurs pathologies humaines comme en témoignent les nombreuses références bibliographiques. Par ailleurs, cette espèce présente certains intérêts pratiques décisifs justifiant l'utilisation des souris comme modèles dans ce type de projet: cycles de reproduction courts, croissance rapide, facilité de transport, facilité de manipulation et une bonne adaptabilité aux conditions expérimentales. De plus, notre projet de recherche est basé sur l'utilisation des animaux génétiquement modifiés (KO). Aucune autre espèce d'animaux n'est disponible. Le nombre de souris utilisé dans chaque expérience a été réduit au minimum en tenant compte de la variance biologique des résultats obtenus. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés tous les échantillons prélevés sont stockés à -80°C et répertoriés dans une banque de données. Ils peuvent être réutilisés dans des expériences ultérieures, servir de témoins pour de nouvelles expériences ou transmis à d'autres laboratoires de recherche. Les souris sont contrôlées tous les jours, voire deux fois par jour. Les critères suivants sont pris en compte : perte de poids, activité extrême, posture prostrée, aspect (amaigrissement, déshydratation, poils hérissés, salissures et écoulements)...Si l'un de ces critères est atteint, l'expérimentation est immédiatement arrêtée et les souris sont euthanasiées. La dernière procédure décrite dans ce projet est jugée de classe sévère et fera l'objet d'une évaluation rétrospective. Au total, la réalisation de ce projet nécessite l'étude de 5460 animaux.

4956. Nous avons récemment découvert la présence de nouveaux peptides (chaîne d'acide aminés) nommés Aeta-alpha et Aeta-beta issus du clivage de la protéine appelée Amyloid precursor protein (APP). Nous connaissons encore très peu le rôle de ces peptides dans le cerveau mais nos données publiées et préliminaires nous font penser qu'ils pourraient jouer des rôles clés dans la fonction des neurones du cerveau et dans la maladie d'Alzheimer. Dans ce projet, nous allons étudier plus en détail leur fonction biologique dans le cerveau. Notre but principal est une meilleure compréhension de l'action de ces peptides dans le cerveau. Nous avons l'avantage d'utiliser des techniques de pointe développées dans l'équipe. Par utilisation d'outils qui contrôlent l'excitabilité des neurones chez l'animal vivant, nous déterminerons si la production des Aeta est modulée par l'activité des neurones. Nous allons aussi tester si la production des Aeta est modulée par l'activité cognitive en soumettant des souris sauvages adultes à des tâches cognitives et en analysant post-mortem les niveaux d'Aeta en fonction de ces tâches. Nous pensons aussi que si ces Aeta jouent un rôle clé dans le cerveau, leur production sera régulée par l'activité neuronale et cognitive. Enfin, nous allons étudier si les Aeta eux-mêmes modulent la fonction cognitive. Des souris exhibant des niveaux élevés d'Aeta-alpha ou -beta appliqués de façon extracellulaire dans le cerveau seront testées dans des tâches de mémoire. Nos collaborateurs ont aussi créé des souris transgéniques sécrétant ces peptides de façon chronique *in vivo*. Nous allons soumettre ces souris aux tâches de mémoire. Nous nous attendons à observer un phénotype dommageable sur la fonction des neurones et sur les tâches cognitives quand nous augmenterons la quantité des peptides Aeta dans le cerveau. Ce projet est en accord avec le principe des 3R: 1) Réduire : pour réduire l'utilisation d'animaux, nous effectuerons, quand cela sera possible, plusieurs tâches cognitives sur les mêmes animaux. 2) Raffiner : nous avons mis en place des grilles de suivi quotidien des animaux pour s'assurer de leur bien-être. Nous avons aussi opté pour des tâches de comportement qui n'engendrent pas d'inconfort ou au maximum un inconfort bref et modéré pour évaluer leurs capacités cognitives. 3) Remplacer : quand cela sera possible, nous réduirons l'utilisation des animaux en testant nos hypothèses de travail sur lignées cellulaires. Cela sera particulièrement utilisé pour comprendre plus en détail les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'action des Aeta sur les neurones. Nous utiliserons 580 souris. Le nombre d'animaux utilisés a été calculé en considérant 1/ le nombre d'expériences nécessaires planifiées 2/ la variabilité expérimentale des paramètres étudiés pour chaque type d'expérience, afin d'obtenir une puissance statistique suffisante ($>80\%$). Cette variabilité expérimentale a été estimée d'après des expériences similaires préalablement effectuées dans notre laboratoire ou d'après des études d'autres laboratoires publiées dans des revues internationales à comité de lecture. La dimension des colonies de souris génétiquement modifiées sera maintenue au minimum. Les animaux seront systématiquement anesthésiés avant d'être sacrifiés.

4957. Les pathologies obstructives des artères coronaires sont une cause majeure de dysfonction cardiaque, menant à des remodelages structurels qui aboutissent à un arrêt cardiaque. Les maladies cardiaques sont dans les nations industrialisées, une étiologie prédominante d'invalidité et de mortalité aussi bien chez l'homme que chez la femme. L'occlusion d'une artère coronaire majeure résulte en l'ischémie et la mort cellulaire potentielle dans la zone anatomique du cœur irriguée par cette artère, appelée

région à risque. Le remodelage ventriculaire est le processus qui survient suite à un IM aigu. Il englobe, d'une part, la perte de cardiomyocytes par apoptose et nécrose aboutissant à l'espacement des cellules contractiles, et d'autre part, l'amincissement de la paroi du ventricule gauche (VG), mais aussi la dilatation du VG ainsi que l'accumulation de collagène. Ces altérations architecturales complexes surviennent non seulement dans la zone infarctée mais également dans le tissu cardiaque sain après un IM. En effet, des effets compensatoires par hypertrophie, dilatation et hypercinésie des territoires non ischémiés apparaissent. Bien que ce remodelage cardiaque soit initialement une réponse adaptative, il conduit progressivement à une dilatation menant à une insuffisance cardiaque par congestion.

La restauration cardiaque suite à un IM nécessiterait le remplacement des myocytes endommagés et la restauration du flux sanguin, et ce, afin de limiter le remodelage du ventricule gauche et de sauver les cardiomyocytes hibernants. La thérapie cellulaire par l'injection des cellules souches embryonnaires pluripotentes présente un potentiel intéressant pour la réparation tissulaire cardiaque et constitue un espoir thérapeutique considérable.

La souris est l'espèce la plus étudiée en recherche biomédicale et son utilisation remonte à la fin du XIX^{ème} siècle. Le génome murin étant très proche de l'humain, la majorité des gènes humains ont leur homologue chez la souris. De plus, le génome murin a été largement séquencé et, de ce fait, la localisation des gènes est connue. En ce qui concerne les études sur la fonction cardiaque, le modèle d'IM par ligature de l'artère coronaire est largement utilisé et a permis de démontrer que l'altération de la structure et de la fonction cardiaque après ligature de l'artère coronaire chez la souris est proche des changements physiopathologiques dans le cœur humain ischémié. Ainsi, ce modèle ne peut être REMPLACÉ par un modèle in vitro.

Par conséquent, nous établissons un modèle minimalement invasive et simple d'infarctus du myocarde chez les souris par ligation de l'artère coronaire descendant gauche. Afin de minimiser toute douleur post opératoire (RAFFINEMENT), les animaux feront l'objet d'un suivi rapproché et des analgésiques seront utilisés.

Nous tâcherons à REDUIRE au maximum le nombre d'animaux utilisés, 44 souris réparties sur différents groupes seront utilisées afin de mettre au point le modèle et de réaliser la thérapie cellulaire pour voir la capacité des cellules à réparer les tissus lésés in vivo. Ainsi, ce modèle répond aux exigences du principe des 3R (remplacement, raffinement et réduction) pour les expérimentations animales et assure l'information scientifique nécessaire au développement de stratégies thérapeutiques pour les maladies cardiovasculaires.

4958. Ces études s'inscrivent dans le cadre d'une série d'expériences qui visent à déterminer comment l'organisme réagit aux variations circadiennes et saisonnières de l'environnement. Notre organisme fonctionne de manière rythmique, sur un cycle d'environ 24 heures. Ce rythme, dit circadien, intervient dans la régulation de toutes les fonctions biologiques et comportementales. Un dysfonctionnement de cette activité rythmique peut entraîner d'importants troubles physiologiques qui engendrent des pathologies potentiellement graves comme des maladies cardio-vasculaires, immunitaires, des dérèglements métaboliques, des troubles anxio-dépressifs voire cognitifs. De ce fait, développer un voire plusieurs modèles animaux est un outil nécessaire pour étudier l'étiologie de ces maladies. L'ensemble de ces études sera réalisé sur des souris. Deux approches seront utilisées. Une première approche consistera à réduire la longueur du jour et d'étudier le comportement des animaux dans diverses catégories de tests et de comparer leur comportement à celui d'animaux placés en cycle normal. Ces tests vont permettre de déceler des troubles de type anxieux, dépressifs ou cognitifs. On sait également que la mélatonine, une hormone libérée de manière rythmique exclusivement la nuit par la glande pinéale située à la base du cerveau, joue un rôle prépondérant dans ces processus de régulation. Lorsque les jours sont longs, le pic de mélatonine est important et de courte durée, lorsque les jours sont courts, le pic est moins important et plus étalé dans le temps. Afin d'étudier le rôle de la mélatonine dans ces processus, une deuxième approche consistera à étudier les effets d'une administration de mélatonine, de manière à mimer des jours courts, sur le comportement des animaux stabilisés selon leur cycle jour/nuit habituel.

Les tests comportementaux utilisés font partie de procédures validées en tant que modèles d'évaluation des troubles mentionnés ci-dessus. Il n'y a pas de remplacement possible pour les études de comportement. En ce qui concerne la réduction, chaque étude est composée de deux groupes de 20 sujets chacun. Cet effectif est déterminé dans le respect des règles statistiques en vigueur et de manière à obtenir une bonne reproductibilité des résultats. Sur cinq ans, un nombre total de 160 souris mâles seront utilisées dans divers tests comportementaux. Les mêmes souris peuvent être impliquées dans plusieurs procédures, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Chaque catégorie de tests est espacée d'environ une semaine afin de permettre à l'animal de récupérer et d'éviter toute interférence entre les tests.

En ce qui concerne le raffinement, les animaux sont stabilisés par 5 à 8 dans des grandes cages ayant une surface au sol de 1820 cm² avec du matériel d'enrichissement (nids en coton, laine de bois ou de papier). Le comportement social, alimentaire etc. des animaux sera surveillé quotidiennement.

4959. Les maladies inflammatoires et infectieuses touchant le système nerveux central sont actuellement une thématique de recherche majeure puisque de plus en plus de personnes sont touchées par ces maladies. Par exemple, en France, la sclérose en plaques touche 80000 personnes. Des thérapies ont été développées pour prendre en charge les patients mais elles entraînent des effets secondaires graves chez certains sujets comme la leucoencéphalopathie multifocale progressive qui peut conduire au décès du malade ou des cancers. C'est la raison pour laquelle les mécanismes aboutissant à ces pathologies vont être étudiés afin de déterminer de nouvelles cibles pour prendre en charge ces maladies. Ceci est basé sur l'utilisation des modèles animaux (lignées pures génétiquement homogènes, environnement "contrôlé") qui reproduisent en majeure partie les caractéristiques cliniques et histopathologiques des maladies humaines. L'objectif de notre projet est d'étudier les interactions entre les lymphocytes et les cellules endothéliales. Cette étude se fait en utilisant des animaux transgéniques qui expriment

l'antigène HA (Héماغلутinine de l'Influenzae virus) au niveau des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique. Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 1953 animaux sur 5 ans.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet.

1- Remplacement : le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude se fait après de nombreuses études in vitro dans des modèles cellulaires montrant l'importance de ces gènes dans le fonctionnement du système immunitaire. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car les études in vitro ne reproduiraient pas l'ensemble des voies impliquées dans des modèles physiologiques intégrés et par conséquent ne permettent pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables et pertinents de la pathologie humaine.

2- Réduction : les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. De plus, nous avons également pu valider certaines approches expérimentales in vitro permettant d'optimiser l'utilisation des animaux. Les résultats actuels ont permis de valider que des lots de 10 souris selon les paramètres à évaluer permettent d'acquérir des données fiables.

Raffinement : Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement à l'initiation du modèle. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, que nous aurons définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal.

4960. La sclérose en plaques (SEP) est la deuxième cause de handicap chez l'adulte jeune après les accidents de la voie publique et elle concerne 100 000 patients en France. Le traitement de cette pathologie évolutive et inflammatoire repose aujourd'hui essentiellement sur des traitements visant le système de défense de l'organisme : le système immunitaire. Si les poussées de la maladie sont contrôlées, la progression du handicap est plus difficile à maîtriser et surtout aucun traitement ne permet de stopper la maladie ou la guérir. La cause exacte de la SEP n'est pas connue et l'origine est multifactorielle avec des facteurs de risques environnementaux et génétiques.

Le mécanisme pathologique biologique de la SEP met en jeu des cellules appelées lymphocytes B et lymphocytes T qui vont être activées par une cible aujourd'hui non connue. Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu, des modèles expérimentaux surtout murins de la maladie sont mis en place par création d'une encéphalomyélite auto-immune expérimentale ou EAE. Il s'agit d'une maladie expérimentale avec inflammation du cerveau et de la moelle épinière comme ce qu'il se passe dans la maladie humaine. Cette EAE peut être induite par injection de protéines de la myéline (composant du système nerveux), mais des modèles transgéniques de souris permettent aussi d'induire une EAE spontanément (sans injection quelconque).

Dans cette étude nous avons choisi d'utiliser un modèle transgénique de souris déclenchant une EAE très proche de la maladie humaine avec des poussées et des rémissions: souris appelées TCR1640. Dans ce modèle où les lymphocytes T sont transgéniques, il a été démontré que l'initiation de l'EAE nécessitait leur interaction avec des cellules B spécifiques. Le but de l'utilisation de ce modèle est de préciser les cibles des lymphocytes B qui sont mises en jeu initialement dans le processus de la maladie expérimentale et l'évolution de ces cibles dans le développement et le maintien de l'EAE.

Le nombre de souris utiles à l'étude (n=1980) pour un résultat fiable a été calculé en fonction de données de la littérature concernant ce modèle spontané où la non totalité (80%) des souris déclarent une maladie à 3 mois de vie avec 20% de mortalité. Cette étude souhaite évaluer aussi l'impact de l'environnement microbien de 2 animaleries théoriquement différentes (l'une conventionnelle, l'autre dite sans pathogène spécifique). Le nombre de souris total tient compte aussi de la nécessaire répétition minimale des expériences (3 fois) dans chaque animalerie pour s'assurer d'une homogénéité des résultats considérés alors fiables. Enfin parce que ces lymphocytes B sont rares dans les organes, nous avons développé une méthode in vitro d'expansion de ces cellules afin de limiter le nombre de souris utilisées (expansion in vitro sur cellules nourricières).

Afin de respecter complètement la règle des 3R visant à "Remplacer ou Réduire" mais aussi à "Raffiner", des mesures de raffinement avec cages transparentes et tubes de jeux, les souris seront par ailleurs manipulées quotidiennement avec douceur et calme. Par ailleurs, nous avons mis en place des critères d'arrêt (points limite) par rapport à la souffrance potentielle des souris durant l'expérimentation. Si un de ces critères ci-dessous est atteint, l'expérimentation est immédiatement arrêtée et les souris sont euthanasiées.

4961. L'industrie chimique qui est un secteur économique important en France (2ème acteur européen et 5ème acteur mondial) s'est fortement développée au cours du XXème siècle en s'appuyant sur l'utilisation du pétrole pour répondre aux besoins grandissants de la population mondiale. Durant la dernière décennie, les préoccupations croissantes de la société civile et du monde économique quant aux incertitudes liées à la disponibilité et aux cours du pétrole mais également aux conséquences du changement climatique et à la nécessité de s'en prémunir ont contribué à l'émergence d'une chimie nouvelle basée sur l'utilisation de la biomasse. Cette chimie dite verte se doit de répondre à divers enjeux incluant la diversification des sources de matières premières, le développement de procédés énergétiquement plus efficaces ou encore l'allongement du cycle de vie des différents produits. Le développement de cette nouvelle industrie passe par le déploiement d'outils de production adaptés que sont les bioraffineries. Il s'agit de complexes industriels qui transforment la biomasse agricole et forestière en une diversité de produits biosourcés et de bioénergie aux usages divers et variés. Le développement de ce nouveau tissu industriel doit également intégrer des critères de développement durable en adéquation avec les exigences sociétales et réglementaires en matière de protection de l'environnement et de la biodiversité. Les bioraffineries, comme les raffineries, présentent la particularité de produire des coproduits susceptibles de se retrouver dans les effluents. Ces différentes substances sont donc susceptibles de participer à la contamination des milieux aquatiques récepteurs. Dans ce contexte, il semble primordial d'accroître les connaissances relatives aux risques pour l'environnement associés aux activités de la chimie verte et de proposer une approche novatrice de biosurveillance de l'environnement dans un contexte de rejet industriel en lien avec cette activité en développement. Pour y

répondre, le présent projet tend à mieux appréhender les mécanismes d'action écotoxique de différentes molécules d'intérêt en chimie verte par l'intermédiaire d'essais en conditions contrôlées de laboratoire.

Afin de prendre en compte la grande diversité des stress environnementaux et la multiplicité de leurs effets, il est indispensable de recourir à des approches multi-paramétriques basées sur la mesure chez un même organisme de plusieurs indicateurs complémentaires. Ainsi, différents marqueurs liés aux grandes fonctions physiologiques (reproduction, métabolisation et énergie, capacité de défense) seront étudiées afin d'affiner notre connaissance sur les effets potentiels de ces nouvelles substances. Au cours de ce projet, toutes les expérimentations sont en accord avec la Directive 2010/63/EU, qui s'intéresse à la protection et le bien-être des animaux utilisés à des fins scientifiques, pour le maintien et l'utilisation des animaux en laboratoire. L'épinoche à trois-épines est utilisée du fait de sa large utilisation en analyse du risque environnemental et de sa présence dans les rivières françaises.

4962. La maladie de Marek, causée par un herpes virus, est associée à un cancer mortel chez la poule, de type lymphome. Depuis la fin des années 1970, trois types de vaccins sont utilisées en élevage de part le monde, dont la souche non pathogène de l'herpes virus du dindon (HVT). Ces vaccins préviennent de façon efficace contre la formation des tumeurs et ont permis le développement de l'élevage aviaire. Depuis quelques années, le génome du virus HVT est utilisé comme génome plateforme, c'est-à-dire pour y introduire des gènes d'autres pathogènes, dans le but de vacciner les poules contre la maladie de Marek (MD) et aussi contre d'autres maladies infectieuses. Ces vaccins recombinants sont appelés des vaccins recombinants (rHVT). Plusieurs de ces vaccins rHVT se sont révélés très efficaces pour vacciner contre la maladie de Gumboro (IBD), la maladie de Newcastle (ND) et même la grippe aviaire. Malheureusement, en association entre eux, certains de ces vaccins s'avèrent moins efficaces pour des raisons inconnues. On parle d'interférence vaccinale.

L'objectif de cette expérience est de tester de nouvelles façons d'associer ces rHVT, la corrélation entre protection et présence du génome vaccinal dans les plumes, ainsi que l'efficacité d'un nouveau vaccin trivalent visant à protéger contre les 3 maladies majeures de la poule, la maladie de Marek, la maladie de Gumboro et la maladie de Newcastle.

Des poussins de 1 jour seront vaccinés selon 5 modalités différentes et comparés à un groupe contrôle non vacciné, quant à la protection vis-à-vis de la maladie de Newcastle (ND), une maladie très contagieuse de distribution mondiale. Le suivi de vaccination sera effectué pendant huit semaines.

Les moyens mis en œuvre pour respecter la règle des 3R seront les suivants:

- Réduction : Les calculs de puissance réalisés pour un test approprié (non paramétrique de comparaison de moyennes entre 2 échantillons indépendants) sur plusieurs des paramètres suivis indiquent qu'un effectif de 10 animaux minimum par lot est nécessaire pour répondre aux questions posées.

- Raffinement : les poussins EOPS seront vaccinés à 1 jour d'âge comme en élevage et placés en isolateurs pour éviter toutes infections par des pathogènes. Les animaux, seront observés au minimum 2 fois par jour afin de repérer d'éventuels signes cliniques de la ND, après inoculation d'épreuve. Leur milieu sera enrichi par des jouets suspendus.

- Remplacement : seule une expérience in vivo permet de mesurer l'efficacité d'un vaccin. Cette expérience vise à étudier la corrélation entre mesure de la charge virale dans les plumes, les titres en anticorps et la protection contre la maladie de Newcastle. Si elle est concluante, cette expérience pourrait permettre un premier criblage des associations de vaccins HVT et des modalités vaccinales les plus prometteuses in vivo, sans avoir recours à l'inoculation d'épreuve.

L'ensemble de ce projet nécessitera l'utilisation (au maximum) de 60 animaux.

4963. Le cancer de la prostate (CaP) est le plus fréquent des cancers masculins en France. C'est une pathologie complexe dont les facteurs pronostiques actuellement disponibles ne permettent pas de prédire avec précision l'évolution de ce cancer vers la résistance aux traitements. Par ailleurs, malgré l'émergence de plusieurs médicaments, ceux-ci restent des traitements palliatifs et non curatifs.

Les objectifs de notre équipe sont donc :

1. La recherche de nouveaux marqueurs moléculaires pour prédire l'évolution de la maladie et la réponse aux traitements. Nous étudions, la Neuropiline-1 (NRP1), une molécule impliquée dans les processus de développement et de l'agressivité tumorale qui pourrait être une cible des traitements du CaP.

2. Le développement de nouveaux médicaments qui ciblent plus spécifiquement les cellules tumorales et apportent un bénéfice clinique significatif aux patients. C'est le cas des dermaseptines (DRS), peptides antimicrobiens isolés des sécrétions de peau d'une grenouille amazonienne. Nous avons montré que la DRS-B2, en plus de son activité antimicrobienne, possède une activité anticancéreuse. Cependant, dans le but d'améliorer les effets de cette molécule et afin d'augmenter sa concentration locale et son efficacité tout en diminuant sa toxicité périphérique, nous souhaitons développer une chimiothérapie ciblée (DRS-B2-X). Cette molécule chimérique (DRS-B2-X) interagit spécifiquement avec le récepteur surexprimé à la surface des cellules tumorales prostatiques et absent sur les cellules normales. Les résultats in vitro montrent que cette molécule a un effet toxique sur les cellules tumorales et pas sur les cellules normales. En vue de l'utilisation potentielle en clinique, l'évaluation de la DRS-B2-X dans un modèle de développement tumorale in vivo chez la souris est indispensable.

Ces expériences seront menées dans le respect des règles des 3R. En effet, le nombre de souris par groupe est réduit à la limite de l'analyse statistiques acceptable. Seules les expériences indispensables seront réalisées. Le modèle animal est choisi avec soin. L'expérience est planifiée et organisée afin d'éviter tout stress pour l'animal.

Nous utiliserons 192 souris pour réaliser les expériences décrites ci-dessus.

4964. Les gliomes diffus sont les tumeurs cérébrales primitives les plus agressives chez l'adulte. En particulier, les glioblastomes sont les gliomes les plus fréquents. Alors que la génétique de ces tumeurs est relativement bien connue, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement tumoral restent mal caractérisés. Les glioblastomes présentent des caractéristiques morphologiques de cellules gliales, tels que les astrocytes et les oligodendrocytes. Nous postulons que les précurseurs d'oligodendrocytes (OPCs), les cellules qui produisent la gaine de myéline, sont responsables de la croissance tumorale et représentent la population de cellules souches tumorales dans les glioblastomes. Pour tester ces hypothèses, nous proposons de : (1) déterminer si les OPCs sont requis pour l'initiation et la progression tumorale ; (2) évaluer le potentiel tumorigène des OPCs isolés de biopsies de glioblastomes ; (3) tester l'action de drogues favorisant la différenciation oligodendrocytaire (drogues pro-myélinisantes) sur le développement tumoral. Notre projet permettra de mieux comprendre les mécanismes d'oncogenèse des gliomes. Pour ces expériences, nous utiliserons la souris comme modèle expérimental.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ; 3) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes ; le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude. Nous utiliserons un nombre total de 492 souris pour ce projet.

4965. La dépression majeure est une maladie mentale chronique récurrente qui affecte des millions de personnes dans le monde. La dépression est souvent précédée d'une période de stress chronique qui active l'amygdale, l'hippocampe et d'autres régions cérébrales. Ces réponses peuvent être inadaptées conduire à la dépression. Cependant, on sait peu de choses sur les circuits spécifiques et/ou les cellules responsables de ces processus. Le fait d'identifier des populations de neurones spécifiques qui jouent un rôle crucial dans les processus sous-jacents est nécessaire pour comprendre la physiopathologie de la dépression majeure et de concevoir des approches thérapeutiques plus efficaces.

Ce travail a pour but d'identifier des populations de neurones impliquées dans la genèse et l'expression de symptômes dépressifs chez la souris et de tester le rôle précis d'une protéine particulière (la tyrosine kinase Pyk2) dans ces manifestations dépressives. Nous utiliserons un modèle bien validé chez la souris, la dépression induite par des stress minimes chroniques et imprévisibles ou CUSP (« chronic unpredictable stress protocol »). Les résultats devraient nous permettre d'identifier des ensembles neuronaux importants pour la dépression et de tester un mécanisme moléculaire candidat. A long terme ces recherches aideront à comprendre les mécanismes cérébraux qui aboutissent à la dépression et potentiellement à découvrir de nouvelles approches thérapeutiques de la dépression qui pourraient être utiles chez les patients.

- Ces expériences seront effectuées chez la souris car il n'existe pas de modèle de dépression dans des cultures de cellules ou de modèles informatiques par exemple. L'utilisation d'animaux est indispensable pour espérer comprendre la maladie.

- Le nombre de souris utilisée sera réduit au strict minimum. Toutefois le nombre de souris inclus dans chaque groupe expérimental doit être suffisant pour que les résultats soient statistiquement significatifs et les résultats reproductibles. Beaucoup de ces expériences seront réalisées dans différentes lignées de souris transgéniques qui permettent de tester des hypothèses spécifiques et qui fournissent des moyens puissants d'accéder aux mécanismes. Le nombre total de souris qui sera nécessaire pour l'ensemble des expériences est estimé à 870. Les études biochimiques et histologiques seront réalisées sur des animaux ayant déjà fourni les résultats comportementaux pour réduire le nombre.

- Les animaux seront suivis attentivement et les procédures expérimentales les moins traumatisantes possibles seront utilisées.

4966. Afin de réduire et optimiser le temps de travail en élevage porcin, les cycles sexuels des truies et cochettes sont synchronisés, et l'ovulation est induite par injection d'hormones extraites. Nous avons développé une molécule capable d'induire l'ovulation et donc de remplacer les hormones d'extraction utilisées actuellement. Nous souhaitons tester cette molécule chez la cochette pour déterminer la dose efficace, mais également étudier sa toxicité générale éventuelle. Les cochettes pubères seront séparées en 5 lots de 5 animaux, dont 4 lots recevront 4 doses différentes de molécule, et le dernier groupe servira de contrôle non traité. Les paramètres observés seront l'intervalle injection du produit - œstrus, le pourcentage de cochettes en œstrus 7 jours après injection du produit, et le taux d'ovulation. Le site de l'injection du produit ainsi que l'état général des animaux seront observés afin de vérifier la tolérance au produit.

REMPACEMENT : Nous avons démontré l'efficacité de cette molécule *in vitro* sur cellules et *in vivo* chez la rate, la brebis et la génisse. Nous allons maintenant la tester sur la troisième espèce cible : la cochette afin de déterminer la dose efficace et la tolérance au produit.

REDUCTION : Au total, 25 cochettes seront utilisées. Le nombre d'animaux a été estimé d'après des résultats que nous avons obtenus chez la brebis et la génisse, pour atteindre une puissance de test statistique d'au moins 80% avec un seuil de risque α de 0.1.

RAFFINEMENT : Les conditions d'élevage ne seront pas modifiées. Les animaux seront hébergés ensemble, et non pas en loge individuelle pour limiter le stress occasionné. Le nombre de prise de sang a été réduit au maximum. Un système de récompense est utilisé pour motiver les cochettes : elles reçoivent des Smarties® après chaque acte, ce qui les incite à se présenter de manière quasi-volontaire pour le prélèvement suivant.

4967. L'analyse GENOMIQUE a montré que Bin1 était un facteur de risque de la maladie d'Alzheimer. Les techniques de culture cellulaire utilisant des cellules cancéreuses neuronales nous ont permis de déterminer le rôle de Bin1 sur le développement de la maladie d'Alzheimer. Les études in vivo réalisées sur des drosophiles transgéniques surexprimant des isoformes de Tau et de Bin1 ont montré que ces deux protéines interagissent (résultats publiés). Chez l'humain atteint de la maladie d'Alzheimer, le premier marqueur que l'on peut suivre est l'Abeta 40 et Abeta 42. Aussi afin d'approfondir les résultats obtenus sur les drosophiles nous voulons développer un modèle de souris BinAPP. Cette étude portera sur 952 souris âgées de 6-7 mois et 10-11 mois. Afin de respecter la règle des 3Rs nous travaillerons sur les 2 sexes. Pour réduire le nombre, nous effectuons sur un hémisphère les analyses immunohistologiques et sur le second les extractions d'ARN, de protéine. Pour la réalisation de cette étude longitudinale et afin de réduire le stress et l'angoisse chez nos animaux, les procédures seront espacées de 3 à 7 jours selon la procédure suivante à effectuer. Pour toute procédure invasive ou terminale nous utiliserons des anesthésiques afin d'éviter toute douleur inutile aux animaux. Chaque procédure impliquée dans ce projet a un point limite défini au préalable afin d'éviter toute souffrance inutile aux animaux. Les animaux inclus dans ce projet sont observés régulièrement afin de vérifier l'absence de signes de souffrance (perte de poids, piloérection, dos rond, démarche anormale, pâleurs des extrémités, automutilation, isolement, léthargie, vocalisation anormale, ...). Conformément aux nouvelles directives, pour l'hébergement des animaux dans toutes les cages nous avons mis des maisons à souris afin de limiter le stress. De plus afin de s'assurer du bien-être des animaux, leur état sanitaire est surveillé par des contrôles réguliers.

4968. L'objectif principal de l'Etude proposée vise à caractériser l'impact d'un complément alimentaire sur les fonctions clefs du tube digestif, i.e. la fonction de barrière de la muqueuse intestinale et la motricité intestinale dans un modèle murin soumis ou non à un stress (le « water avoidance stress » - "stress d'évitement de l'eau"). En effet, le stress induit des altérations des fonctions intestinales (perméabilité et motricité) et mime ainsi les modifications observées chez l'homme dans des maladies telles que le syndrome de l'intestin irritable (SII). La recherche de facteurs nutritionnels capables de renforcer la barrière intestinale et de préserver son intégrité lors d'un stress est donc un enjeu majeur pour la prévention et/ou le traitement de cette maladie.

Tout en tenant compte du principe des 3R (limitation du nombre d'effectifs, raffinement des conditions d'hébergement des souris en ajoutant des igloos ou des tunnels dans les cages leur permettant de jouer, de se cacher; remplacement quand possible), l'étude proposée se déroulera de la manière suivante : le complément alimentaire ou bien un placebo (témoin) seront administrés aux souris par voie orale pendant 4 semaines. . 5 compléments alimentaires différents seront testés au cours de ces 4 années. Pour cette étude, 400 animaux maximum seront utilisés. Pour chaque complément alimentaire, les animaux seront divisés en 4 groupes distincts : un groupe recevant le complément alimentaire, un groupe recevant le placebo, un groupe recevant le complément alimentaire puis stressé et enfin un groupe recevant le placebo et stressé. La semaine précédant le début du traitement et durant les 4 semaines de traitement, la motricité intestinale et la perméabilité intestinale seront évaluées in vivo à l'aide de différentes approches expérimentales (décrites ci-après). La dernière semaine de traitement, les souris seront soumises ou non à un stress: le water avoidance stress = stress d'évitement de l'eau. A l'issue de ce stress, la motricité intestinale et la perméabilité intestinale seront également évaluées in vivo afin de mettre en évidence un éventuel effet protecteur du facteur nutritionnel testé. Les souris seront ensuite sacrifiées et des segments d'intestins seront prélevés pour 1) étudier la perméabilité et la motricité ex vivo de segments d'intestin ; 2) pour étudier l'expression de gènes clefs (marqueurs neuronaux, gliaux, inflammatoires) impliqués dans le contrôle des fonctions digestives (approches transcriptomiques).

4969. Inhibition de retinal aldehyde dehydrogenase 1 (Raldh1) un enzyme impliqué dans le métabolisme de la vitamine A est un facteur causal de la maladie de Parkinson (MP) chez l'homme. En accord avec ces données cliniques, les souris avec une inactivation génétique du Raldh1 (Raldh1KO) développent les troubles moteurs pendant le vieillissement. En vue que le stress est un facteur environnementale qui contribue de façon important à l'étiologie des maladies neurodégénératives y compris la MP, nous proposons de : (i) tester les effets du stress liée à la surpopulation dans la cage sur les troubles moteur et cognitifs chez les souris Raldh1KO, (ii) identifier les méthodes de prévention du développement des troubles comportementales.

Pour tester la progression des troubles comportementales du au stress et associées à l'inactivation génétique d'enzyme Raldh1 il n'est pas possible de remplacer les modèles murins par un autre modèle animal dans cette étude. Dans l'objectif de raffinement nous allons utiliser un modèle du stress faible mais chronique, liée à la surpopulation dans la cage.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans cette étude nous allons effectuer une étude longitudinale sur les mêmes groupes des souris.

Au total, 280 souris seront utilisés dans ce projet.

4970. La dopamine est un neurotransmetteur synthétisé par le système nerveux central où, elle active les récepteurs dopaminergiques postsynaptiques. Bien que la dopamine soit très minoritaire dans le cerveau, puisqu'elle concerne moins de 1 % des neurones, elle joue un rôle modulateur final essentiel des sorties motrices et psychiques. Il est connu depuis que la destruction des neurones à dopamine d'un territoire cérébral appelé substance noire est à l'origine de la maladie de Parkinson. Cinq gènes codant pour les récepteurs de la dopamine sont aujourd'hui connus, correspondant à une diversité supplémentaire de transcrits et de protéines du fait de phénomènes surajoutés d'épissages alternatifs. Les récepteurs de la dopamine, au nombre de 5 (du RD1 au RD5) sont une cible essentielle des neuroleptiques, leur caractérisation moléculaire constituant une promesse de développement de produits plus spécifiques qu'aujourd'hui, aux effets secondaires atténués. Par ailleurs, les gènes de ces récepteurs pourraient être liés à la susceptibilité à certaines maladies psychiatriques. L'apparition des modèles murins transgéniques avec la préparation de

modèle knock-out (KO) avec l'inactivation d'un gène, a permis d'étudier ces récepteurs. Ainsi, il existe des KO pour chacun de 5 gènes. Seuls les KO pour le RD1 présentent un phénotype nocif pour lequel les animaux montrent des troubles moteurs importants qui apparaissent tôt au cours de la croissance. C'est donc le cas du KO décrit ici, le RD1 Cre, qui possède aussi un système inducible de type Cre qui permet de restaurer l'expression du récepteur D1 dans les territoires de façon spécifique, avec des techniques de transfert de gènes.

Le but de ce projet est l'entretien de la lignée murine transgénique knock-out pour le gène codant pour le récepteur dopaminergique 1 sous forme hétérozygote. Le nombre d'animaux produits pour entretenir cette lignée sera 100 (hétérozygotes). Dans le cadre du respect de la règle des 3R, pour réduire au maximum le nombre d'animaux la production sera rationalisée par l'établissement utilisateur. Les animaux maintenus en hétérozygote sans phénotype seront l'objet d'une surveillance quotidienne afin de leur assurer une vie sans souffrance.

4971. Ce projet a pour objectif d'évaluer l'immunogénicité de nouveaux candidats vaccins développés en traitements préventifs et/ou thérapeutiques de maladies infectieuses ou de cancers. L'évaluation de l'immunogénicité sur animaux est l'une des méthodes décrites pour démontrer l'efficacité préclinique des candidats vaccins avant d'envisager des études cliniques chez l'homme. Ces tests d'immunogénicité sont également très utiles pour mettre en place des tests libératoires des lots de vaccins pour leur utilisation en clinique humaine (libération des lots et suivi de la stabilité au cours du temps).

Les essais d'immunogénicité permettent d'évaluer le bénéfice de différentes préparations vaccinales, d'identifier les composés nécessaires à la formulation vaccinale, d'évaluer les nouvelles voies d'administration, de nouvelles molécules adjuvantes ou les nouvelles formes pharmaceutiques qui permettent d'améliorer la performance du vaccin. Enfin, les mécanismes d'action et la caractérisation de la réponse immunitaire doivent être évalués pour comprendre la réponse immunitaire, voire, l'améliorer.

Un test d'immunogénicité consiste à administrer à des animaux un candidat vaccin, à les héberger pendant la période nécessaire à l'obtention d'une réponse immunitaire, puis à recueillir du sang, des fluides corporels et/ou des organes afin d'analyser par des méthodes *in vitro* la réponse immune humorale (recherche d'anticorps) et/ou cellulaire (recherche de sécrétions de cytokines ou mesure de la fréquence des lymphocytes spécifiques de(s) antigène(s) ciblés par le vaccin).

Ces différentes données précliniques sont un préalable aux essais cliniques et à l'enregistrement du candidat vaccin et figureront dans les différents dossiers réglementaires.

Les espèces utilisées pour ce projet sont la souris, le rat, le cobaye, le hamster et le lapin. Le modèle animal utilisé est sélectionné en fonction de la pathologie ciblée, du type de réponse immune analysée et des données de la littérature ou des connaissances scientifiques. Il est estimé qu'au cours de ce projet d'une durée de 5 ans, 5 000 souris, 700 hamsters, 700 rats, 700 cobayes et 500 lapins seront nécessaires.

Mise en œuvre des 3R

Remplacement : Des essais *in vitro* sur cellules animales ou humaines sont également utilisés pour évaluer l'immunogénicité, ils apportent des données complémentaires. Le développement et la validation de ces tests *in vitro* sont souvent difficiles à réaliser notamment pour les vaccins adjuvés où la relation entre la charge d'antigène et le niveau de protection est difficile à définir. A ce jour, ces tests ne peuvent remplacer les essais *in vivo*. En effet, il n'est pas possible de mesurer la capacité d'un vaccin à développer une réponse immunitaire sur des tests purement *in vitro*. L'ensemble du système immunitaire de l'organisme receveur est en effet mobilisé après injection du vaccin. La mise en place de cette réponse nécessite des migrations des cellules immunitaires entre le site d'injection et les ganglions lymphatiques drainant où un processus complexe va se mettre en place pour le développement de la réponse immunitaire.

Réduction :

Les schémas expérimentaux de ce projet feront l'objet d'une revue par des biostatisticiens, afin de calculer au plus juste le nombre d'animaux nécessaire.

Raffinement :

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des dispositifs d'enrichissement dans des locaux appropriés, conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé.

L'anesthésie gazeuse à l'isoflurane est recommandée et est appliquée dès que le type de manipulation et l'espèce animale le permettent. Lorsque cela est possible, le mécanisme d'action et la bio-distribution des composés du candidat vaccin pourront être suivis en cinétique par des techniques de bio-imagerie non invasives.

4972. Ce projet couvre l'ensemble des études très précoces réalisées sur l'ensemble des candidats médicaments de notre recherche, études pour lesquelles il n'existe pas d'alternative validée scientifiquement, éthiquement et réglementairement à l'utilisation d'animaux. Ces études sont réalisées conformément aux principes éthiques. Au cours du développement de tout nouveau médicament, des études sont requises par les autorités pour évaluer sa sécurité d'utilisation chez l'Homme, rechercher les mécanismes liés à une toxicité éventuelle et proposer des mesures d'accompagnement pour renforcer le bénéfice/risque à utiliser ces médicaments. La réglementation impose l'utilisation d'espèces de rongeurs et de non-rongeurs. Les primates non-humains (*Macaque cynomolgus*) ne sont utilisés que si les autres non-rongeurs ne permettent pas de répondre aux objectifs du projet en tenant compte des éléments suivants:

- Similarité des paramètres cinétiques ou du métabolisme entre l'espèce non-rongeur choisie et l'Homme
- Réponse pharmacologique ou toxicologique spécifique observée seulement chez le primate non humain et l'homme

Les études incluses dans ce projet ont une durée de 1j à 4 semaines selon le mode d'administration prévu chez l'Homme. Les voies d'administrations (orale ou parentérale) sont celles prévues chez l'Homme. Des examens réguliers, à l'aide de matériel

adapté à chaque espèce, incluent observations cliniques, prise de température corporelle (mesure rectale), prélèvements de sang pour vérifier les paramètres hémato-biochimiques et vérifier le passage du médicament dans le sang, examen cardiologique (ECG ou mesure de pression artérielle généralement par télémétrie non invasive), collecte d'urines (via des entonnoirs placés sous les unités d'hébergement), examen ophtalmologique.

Pour mener à bien ces études, il peut être nécessaire de manipuler les animaux sur une très courte durée ; les animaux sont régulièrement entraînés à ces manipulations et des procédures de renforcement positifs (récompenses, jeux) sont régulièrement mises en œuvre. Certains animaux peuvent être réutilisés si les conditions sont conformes à la réglementation. Les autres animaux sont sacrifiés en fin d'étude pour identifier les organes qui pourraient être l'objet d'effets adverses. Le nombre d'animaux utilisés dans ces études préliminaires est inférieur à celui des études réglementaires et est choisi en fonction de la variabilité des paramètres examinés afin de permettre d'atteindre les objectifs de l'étude. Le degré de sévérité de ces études ne doit pas dépasser le stade modéré : des grilles de points-limites sont appliquées, sous contrôle d'un vétérinaire, afin de prendre des décisions très rapidement chaque fois que cela s'avère nécessaire et éviter ainsi toute souffrance inutile.

Le bénéfice apporté par ce projet est de permettre d'optimiser le développement de candidats médicaments en évaluant très précocement leur toxicité éventuelle (réduction ainsi du nombre d'études réglementaires) et en ajustant au mieux les doses et le schéma expérimental des études réglementaires (diminution des contraintes pour l'animal dans les études réglementaires). Selon le nombre de candidats médicaments qui atteindront l'étape de validation « in vivo », chaque année, un maximum de 2000 rongeurs ou de 100 non-rongeurs sera utilisé (50 chiens et/ou 50 PNH) (dont des animaux réutilisés).

4973. Le cancer de la peau de type non-mélanome est la forme de cancer la plus répandue dans le monde et particulièrement chez les populations adultes à peau claire. Le développement de nouvelles stratégies pour lutter contre l'apparition de ce cancer non mélanome reste un enjeu sociétal mondial, le nombre de cas détectés par an étant en constante augmentation. Parmi les facteurs de risques majeurs impliqués dans le développement de ce cancer, on retrouve les rayons ultraviolets (UV) et l'infection par les papillomavirus humains cutanés (HPV). De plus, les personnes immunodéprimées sont très sensibles à ce type de cancer de la peau, soulignant l'importance du système immunitaire dans la protection contre ce type de cancer.

Cette étude a pour but d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes synergiques de ces deux facteurs environnementaux, l'irradiation UV et l'expression de E6/E7 (qui sont les protéines impliquées dans la transformation par le virus HPV), dans le développement de la carcinogenèse de la peau. Pour cela nous utiliserons un modèle de souris transgéniques (Tg) exprimant de manière constitutive les onco-protéines E6 et E7 du virus HPV et nous étudierons : les réponses du système immunitaire avant et après exposition aux UV. En particulier nous étudierons : 1-l'impact de E6/E7 et des UVs sur la voie de l'inflammasome (immunité innée) et son rôle dans la carcinogenèse de la peau ; 2- les différentes populations immunitaires (et leur niveau d'activation) recrutées au site exposé aux UV. Il est prévu que les résultats obtenus faciliteront l'élaboration de stratégies préventives et / ou thérapeutiques contre le cancer non mélanome.

Le projet nécessitera l'utilisation de 2016 souris. Le choix du modèle souris est imposé par la nécessité de pouvoir utiliser des animaux génétiquement modifiés. De plus, la réponse immunitaire est un phénomène biologique complexe et dynamique, faisant intervenir de multiples types cellulaires et une organisation spatiale qui rend impossible son étude dans des tests in vitro. Le nombre d'animaux utilisé est réduit au minimum nécessaire à l'interprétation statistique des résultats des diverses expériences. 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 que pourraient ressentir les animaux.

4974. L'objectif de ce travail est de revitaliser les dents dévitalisées par les chirurgiens-dentistes suite à une infection carieuse afin qu'elles puissent se défendre face aux nombreuses bactéries présentes dans la cavité buccale. En effet, le traitement actuel consiste simplement à remplacer la pulpe dentaire présente au centre de la dent par un matériau inerte. Les études ont montré que ce matériau manque souvent d'étanchéité, ce qui peut conduire à une nouvelle infection dentaire qui va nécessiter de refaire les traitements réalisés, voire même dans certains cas, d'extraire la dent. Cet inconvénient souligne l'importance de trouver de nouvelles solutions thérapeutiques pour remplacer celle, insatisfaisante, utilisée actuellement.

Plusieurs approches de médecine régénérative à base de cellules souches ont récemment fait leurs preuves dans la réparation et le remplacement des tissus endommagés chez l'homme. De telles approches suscitent un grand intérêt en médecine bucco-dentaire car la régénération d'une pulpe dentaire vivante permettrait à la dent revitalisée et fonctionnelle de se défendre face à de futures agressions. Nous avons récemment identifié une nouvelle population de cellules souches dans la pulpe dentaire, que nous avons appelées DP-MSCs et dont les propriétés en termes de régénération tissulaire sont prometteuses. Nous avons parallèlement créé un protocole innovant pour isoler, amplifier et conserver ces cellules.

Notre objectif est à présent d'étudier le comportement des DP-MSCs dans l'hydrogel auquel elles devront être associées pour pouvoir être injectées dans la dent. Pour cela, nous allons utiliser un modèle animal aujourd'hui considéré comme le "gold standard" par la communauté scientifique. Ce modèle consiste à implanter sous la peau dorsale de souris immunodéficientes un cylindre de racine dentaire humaine dans lequel aura été injecté l'hydrogel contenant les cellules. L'utilisation d'un cylindre de dentine permet en effet de suivre la régénération pulpaire dans un environnement similaire à celui in vivo. L'hydrogel est constitué de deux composants déjà utilisés en clinique humaine, la fibrine et le chitosane, qui sont ici associés selon une formulation originale. Il est injectable, cytocompatible, gélifie sur des temps courts, cliniquement pertinents, sans ajout d'agents chimiques potentiellement dangereux. Après plusieurs semaines d'implantation chez la souris, les cylindres seront récupérés et analysés pour déterminer si les cellules qu'ils contiennent ont pu régénérer une pulpe dentaire similaire à celle d'origine.

Le nombre d'animaux nécessaires pour ce projet est de 66.

Remplacement : Aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation des animaux.

Réduction : Pour chaque expérience, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en ayant le maximum de chances d'obtenir des résultats satisfaisants et reproductibles.

Raffinement : Les animaux sont hébergés dans une animalerie avec un accès à l'eau et à la nourriture ad libitum. Un personnel qualifié s'assure du bien-être des animaux au quotidien. L'apparence physique, le comportement et la réponse à des stimuli externes seront observés quotidiennement. De plus, nous suivrons le poids corporel des animaux chaque semaine.

4975. Le Cancer du Poumon Non à Petites Cellules est la principale cause de décès par cancer dans le monde. La majorité des patients présentent un stade avancé de la maladie au moment du diagnostic, et sont traités par chimio/radiothérapie. Ces traitements sont de plus en plus souvent associés avec des thérapies ciblées. Toutefois, en dépit des traitements, la survie à cinq ans n'est que de 15%, ce qui est principalement dû aux métastases.

Des études épidémiologiques ont analysé un lien potentiel entre les infections respiratoires, l'inflammation chronique et le cancer du poumon. Dans plusieurs modèles de tumeurs, il a été montré que les récepteurs de la famille Toll-Like (TLR) sont liés à l'inflammation. Certains TLR reconnaissent des acides nucléiques, notamment le TLR7, qui est un récepteur de l'ARN simple brin. La reconnaissance des virus par le TLR7 peut ainsi induire une forte inflammation pulmonaire.

Parmi les virus respiratoires retrouvés en pathologie humaine, le virus influenza A et le virus respiratoire syncytial (RSV) sont fréquemment incriminés. Nous avons préalablement démontré que TLR7 est exprimé par les cellules tumorales pulmonaires dans des cohortes de patients ayant un cancer pulmonaire, et qu'une forte expression de TLR7 est de mauvais pronostic, et est corrélée avec une faible réponse à la chimiothérapie. Nous avons aussi montré que la stimulation de ce récepteur par un ligand synthétique à un effet pro-tumoral.

Sur la base de ces données, nous émettons l'hypothèse que les infections virales pulmonaires induisent une activation de TLR7, et par conséquent induisent un effet pro-tumoral et une résistance aux traitements anti-tumoraux. Nous suspectons ainsi que les infections virales peuvent avoir un impact sur le comportement de la tumeur (progression, métastases et réponse aux traitements) ainsi que sur la réponse immunitaire anti-tumorale (composition, activation et fonction des cellules immunitaires).

Le but de ce projet est mettre au point le modèle d'étude de la progression tumorale pulmonaire intra-pulmonaire en réponse à un agoniste de TLR7, afin de pouvoir caractériser par la suite l'influence des infections virales sur la progression tumorale, l'incidence des métastases et la réponse à la chimiothérapie.

Ce projet sera réalisé en utilisant des souris C57Bl/6 albinos. Le nombre total des souris utilisées sera de 1448: 98 souris dans la procédure 1 de mise au point du modèle de tumeur orthotopique, 540 dans la procédure 2 pour caractériser les effets des injections de virus sur la progression tumorale et l'apparition des métastases, et 810 dans la procédure 3 pour caractériser la réponse immunitaire anti-tumorale dans les souris ayant été infectées par les virus.

La règle des 3R sera appliquée:

Reduce (Réduire) le nombre d'animaux en expérimentation : Les expériences seront regroupées pour limiter le nombre des animaux des groupes contrôles.

Refine (Raffiner) la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") : des points limites ont été établis, pour définir à quel moment sacrifier les animaux au cours des expériences, si des signes de souffrances sont visibles.

Replace (Remplacer) les modèles animaux : pour ces expériences, les modèles animaux ne peuvent pas être remplacés car nous étudions les effets d'infections virales sur la progression des tumeurs pulmonaires dans un organisme ou le système immunitaire joue un rôle important. Ceci ne peut donc pas être étudié in vitro.

4976. L'hémolyse est un évènement pathologique conduisant au relargage de l'hème libre dans la circulation sanguine provoquant des effets cytotoxiques, pro-oxydants et pro-inflammatoires ainsi qu'un endommagement des cellules endothéliales. Cet évènement a été montré comme impliqué dans des complications fonctionnelles dans diverses maladies hémolytiques, dont lesquelles un tropisme rénal est observé précocement. L'activation du système du complément est constamment associée à l'hémolyse dans le cadre de cette pathologie. Le système du complément est constitué d'une quarantaine de protéines circulantes ou exprimées au niveau membranaire, intervenant en tant que première ligne de défense contre les pathogènes dans la circulation sanguine. Cependant, une suractivation du complément peut induire des dommages au niveau des tissus de l'hôte. L'activation de la voie alterne du complément est observée dans différentes pathologies à hémolyse, conduisant à une insuffisance rénale aigüe. Notre équipe a démontré in vitro qu'un contexte hémolytique peut activer le complément sur les cellules endothéliales (CE) rénales. Nos résultats non publiés démontrent que ce phénomène existe également in vivo.

D'un point de vue mécanistique, nous avons démontré que l'hème participe à l'activation du complément en se liant à un récepteur (TLR-4) à la surface des cellules endothéliales. Ces résultats conduisent à l'hypothèse que l'activation du complément à la surface de ces cellules se fait de façon TLR-4 dépendante en condition hémolytique. Nos résultats in vitro ont confirmé cette hypothèse, avec une diminution des dépôts de complément après blocage du TLR-4. L'ensemble de nos résultats in vitro suggèrent que l'hème peut être un facteur déclenchant l'activation du complément dans des maladies hémolytiques. En conséquence, l'inhibiteur de TLR-4 pourrait avoir un effet thérapeutique sur l'activation du complément induite en condition hémolytique pour prévenir les lésions vasculaires au niveau rénal.

Pour d'aller plus loin, il est nécessaire de tester cette molécule à potentiel thérapeutique sur un organisme vivant complet afin de tester et d'anticiper le bénéfice éventuel apporté, qu'un système in vitro cloisonné ne permet pas. Afin de prouver de manière irrémédiable l'implication de TLR4 dans l'activation du complément en contexte hémolytique, des souris invalidées pour

l'expression de TLR4 seront comparées au modèle de base C57BL6 au regard de l'activation du complément au niveau des organes. L'obtention d'un résultat similaire entre les souris traitées avec l'inhibiteur de TLR4 et les souris invalidées pour TLR4 permettra de démontrer l'impact et l'implication de ce récepteur dans l'activation du complément dans un contexte hémolytique in vivo. L'hémolyse constitue un facteur commun à un large panel de maladies. Les résultats de ce projet ouvriraient de nouvelles voies sur l'étude du complément dans d'autres modèles pathologiques, ainsi que l'utilisation d'un inhibiteur de TLR4 comme thérapeutique envisageable dans les pathologies hémolytiques dont les atteintes sont associées à l'activation du complément.

Conformément à la directive 2010/63/UE et des arrêtés du 1er février 2013, les règles de bien-être animal et la règle des 3R seront respectées. Les expériences menées in vitro nous ont permis de remplacer dans un premier temps le modèle animal, afin de prouver l'efficacité potentiel de cette molécule testée. Par ailleurs, une attention particulière sera portée au raffinement de l'environnement des animaux. Leur nombre ne dépassera pas les 5 souris par cage, et l'environnement sera complété avec du matériel afin de créer un environnement non stressant pour l'animal. Enfin, les doses efficaces testées par l'approche in vitro, et l'anticipation des doses adéquates à injecter par l'étude bibliographique permettent de réduire le nombre de souris utilisées. Cependant, afin de valider notre hypothèse et prouver l'efficacité de ces molécules dans nos conditions pathologiques, le nombre requis de souris est de 180.

4977. Le cancer du sein est le plus répandu des cancers féminin avec 53 000 nouveaux cas recensés chaque année en France ; 1 femme sur 9 développe un cancer du sein au cours de sa vie. Il provoque le décès de plus de 11 000 personnes par an, ce qui en fait le cancer le plus meurtrier chez la femme.

Les anticorps (Ac) jouent un rôle important dans la défense immunitaire contre les agents pathogènes. Les Ac monoclonaux sont des outils thérapeutiques efficaces pour le traitement du cancer et des maladies auto-immunes notamment grâce à leur forte spécificité vis-à-vis de leur cible et à leurs propriétés pharmacocinétiques uniques. La plupart des Ac du répertoire immunitaire d'un individu sain sont dirigés contre les agents pathogènes. Cependant, une partie de ces Ac ont la capacité de lier des petites molécules pro-inflammatoires, relarguées à l'extérieur des cellules lorsque celles-ci sont lésées. La capacité de ces Ac à interagir avec ces molécules pourrait être un mécanisme de régulation physiologique de l'homéostasie de l'organisme. Nous avons précédemment montré que la liaison de certaines de ces molécules aux Ac circulants a la capacité de conférer à ces Ac de nouvelles spécificités de liaison à l'antigène, et ainsi d'étendre leur potentiel de reconnaissance antigénique. Ce phénomène est corrélé à une augmentation de l'activité anti-inflammatoire des Ac. Le rôle physiologique de ce phénomène n'est pas élucidé.

Nous avons démontré in vitro que des Ac monoclonaux thérapeutiques utilisés actuellement en clinique pour le traitement de cancer peuvent se lier à ces molécules. Le Trastuzumab est un Ac humanisé anti-HER2, utilisé avec succès pour le traitement de cancer du sein HER2 positif. Nos résultats in vitro montrent que le Trastuzumab peut se lier à des petites molécules pro-inflammatoires et que cette interaction change son répertoire de reconnaissance antigénique. Nous avons également observé que cette liaison induit une oligomérisation de l'anticorps et que ce phénomène est corrélé à une augmentation de l'activité cytotoxique du Trastuzumab sur une lignée de cancer du sein HER2 positive in vitro. Nos résultats nous incitent à étudier leur pertinence in vivo.

Dans le but d'évaluer le rôle de la liaison des petites molécules pro-inflammatoire sur l'efficacité thérapeutique du Trastuzumab, nous utiliserons un modèle murin de cancer du sein : des cellules de cancer du sein humaines HER2 positives seront injectées chez des souris immunodéficientes qui seront ensuite traitées par le Trastuzumab. Nos données préliminaires in vitro indiquent que le Trastuzumab se lie à ce type de molécules pro-inflammatoires et que cette liaison induit une oligomérisation de l'Ac, faisant ainsi de cet Ac un candidat idéal pour étudier comment cette liaison peut moduler l'activité thérapeutique des Ac anti-cancer. Les résultats obtenus seront importants pour la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques avec les Ac monoclonaux.

Pour ce projet de 5 ans, nous aurons besoin de 150 souris Nude BALB/c. Pour la réalisation de cette étude, nous regrouperons les expérimentations dans le but de restreindre le nombre d'animaux pour les groupes contrôles. Nos études in vitro nous encouragent à poursuivre cette étude in vivo dans un modèle expérimental de cancer du sein, toutefois, l'étude sera interrompue si les expériences initiales invalident l'hypothèse de travail. L'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et de tunnels en cartons).

4978. Comme toutes les glandes endocrines, le pancréas synthétise des hormones, c'est-à-dire des molécules qui sont libérées dans la circulation sanguine où ils vont circuler pour agir à distance sur des tissus (ou cellules) cibles. Les produits synthétisés par le pancréas endocrine sont principalement les quatre hormones suivantes : l'insuline (seule hormone hypoglycémiante); le glucagon (hormone hyperglycémiante), la somatostatine et le polypeptide pancréatique.

Le glucagon et l'insuline sont deux hormones nécessaires à la régulation de la glycémie (concentration du glucose dans le sang). Ils sont produits au niveau d'îlots de cellules appelés îlots de Langerhans ; par les cellules « alpha » (pour le glucagon) et « bêta » (pour l'insuline). La distribution de ces cellules est particulière, chaque îlot de Langerhans étant constitué d'une masse centrale de cellules à insuline, les cellules à glucagon, les cellules à somatostatine et les cellules à polypeptide pancréatique se retrouvant à la périphérie. C'est parce qu'elles sont directement impliquées dans la production d'insuline (et indirectement dans l'apparition des diabètes de types 1 et 2) que les cellules bêta font l'objet de nombreuses recherches. Mieux comprendre les raisons premières de leur destruction (ou de leurs dysfonctionnements) apparaît donc comme une clef essentielle qui permettra de progresser dans le domaine des thérapeutiques curatives et préventives des diabètes. A ce titre, disposer à volonté en laboratoire de lignées de cellules pancréatiques β humaines est d'un intérêt majeur. Nous avons réussi à générer de telles lignées cellulaires grâce à un

protocole expérimental innovant qui utilise le transfert de gènes dans le tissu fœtal humain. Une de ces lignées cellulaires, EndoC-βH1, possède des propriétés moléculaires et fonctionnelles très proches d'une cellule β humaine adulte. Ces cellules représentent un outil unique pour fournir à la fois un modèle d'étude pour la découverte de nouveaux médicaments et une base préclinique pour développer des thérapies innovantes du diabète. Cette technologie pourrait être généralisée à d'autres types cellulaires du pancréas humain comme les cellules alpha.

L'obtention de chacune de nos lignées cellulaires endocrines humaines nécessite la greffe au total de 54 souris de laboratoire. Ce nombre d'animaux est considéré comme étant le minimum nécessaire pour l'obtention d'une lignée cellulaire humaine avec un taux de réussite élevé. Le nombre total de souris nécessaire à l'obtention des sept lignées cellulaires que nous souhaitons générer au cours des cinq années que durera le projet est estimé à 378. La fonctionnalité de chacune des lignées nouvellement créées sera testée in vivo dans un modèle de souris rendue diabétique. Nous estimons le nombre d'animaux nécessaires pour ce test in vivo à 126 souris. Soit un nombre total d'animaux utilisés dans le projet de 504 animaux. Afin que la réussite de ce projet soit totale, nous veillerons à augmenter autant que possible le bien-être de l'animal pour chacune de nos procédures expérimentales. Enfin, même si nos lignées de cellules nécessitent l'utilisation de souris pour leur obtention, elles représentent un modèle in vitro unique et majeur qui va permettre de tester de nombreuses hypothèses scientifiques concernant la physiologie des cellules bêta pancréatiques humaines.

De plus, Ces cellules représentent un modèle unique pour la découverte de nouveaux médicaments dans le domaine du diabète. Aujourd'hui l'absence de modèles cellulaires pour le diabète nécessite l'utilisation de modèles animaux. Les cellules que nous produirons représenteront une véritable solution de remplacement des modèles animaux par des modèles cellulaires.

4979. La plasticité du cerveau est élevée peu après la naissance et diminue chez l'adulte. Cependant, cette perte de plasticité au cours du développement n'est pas un phénomène progressif. Le cortex présente une période de plasticité accrue dite « période critique », pendant laquelle les circuits sont particulièrement susceptibles d'être remodelés en réponse à un changement de l'environnement. Ainsi, une maladie touchant la vision binoculaire pendant la période critique chez l'enfant aura des impacts irréversibles sur l'acuité visuelle. Cette période critique a été identifiée chez un grand nombre de mammifères. La compréhension des mécanismes de la période critique ouvre aussi la perspective, à plus long terme, de pouvoir « réinstaurer » une plasticité de type juvénile au cerveau adulte et lésé.

La période critique est généralement étudiée dans le cortex visuel en utilisant une fermeture d'un œil. Pendant la période critique, les neurones du cortex visuel répondent mieux à des stimulations de l'œil resté ouvert à la suite d'une fermeture transitoire (de 1 à 4 jours) de l'autre œil. Cette augmentation des réponses neuronales (plasticité) ne se produit pas si la fermeture de l'œil a lieu avant ou après la période critique, soit avant 21 ou après 35 jours après la naissance chez la souris. Des études récentes ont pu mettre en évidence le rôle d'un sous-type de neurones dans ce phénomène (les neurones à parvalbumine ou neurones PV), et plus précisément le rôle des connexions neuronales (synapses) qui excitent ces neurones PV.

Dans ce projet, nous allons étudier le développement des synapses excitatrices vers les neurones PV dans le cortex visuel, dans le but d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables du pic de plasticité au cours de la période critique du développement du cerveau.

(1)Le premier objectif est de caractériser les changements synaptiques et moléculaires dans les neurones PV du cortex visuel au cours du développement normal (c'est-à-dire sans fermeture de l'œil). A partir de souris transgéniques qui expriment les protéines fluorescentes GFP ou Tdtomato spécifiquement dans les neurones PV (lignées G42 ;PV-Cre; floxed stop Tdtomato; G42; floxed GRIP1 ; floxed GluA2), nous préparons des tranches de cerveau qui permettent l'analyse de la transmission synaptique dans des circuits neuronaux quasi intacts grâce à la technique du « patch-clamp ». La pipette de patch-clamp sera aussi utilisée pour aspirer le contenu intracellulaire des neurones et réaliser des travaux de séquençage ARN. Des travaux antérieurs nous ont permis d'ajuster le nombre d'animaux requis afin de comparer d'une manière statistique différentes conditions expérimentales. Ce protocole n'est pas décrit car il ne nécessite pas de manipulation sur l'animal vivant.

(2)Les neurones PV reçoivent trois types de synapses, une en provenance du cortex, et deux du thalamus (un dans chaque hémisphère). Les paramètres synaptiques observées dans le point (1) et qui présentent une modification spécifique de la période critique seront étudiées séparément au niveau de ces différentes synapses, grâce à l'expression d'une protéine activable par la lumière dans chacune de ces trois structures par vecteur viral.

L'injection stéréotaxique de vecteur viraux dans le cerveau de souris peu après la naissance a l'avantage d'être rapide et spécifique en terme de structure cible et de réduire le nombre de souris nécessaire par comparaison aux méthodes classiques de génération de lignées de souris mutantes. Nous utiliserons la même méthode stéréotaxique pour greffer des neurones PV immatures et étudier leur développement synaptique. Des travaux précédents nous ont permis de valider les techniques d'expression et de minimiser le nombre d'animaux requis. (72 souris).

(3)Le troisième objectif est de prouver l'implication des mécanismes moléculaires identifiés par séquençage de l'ARN (point (1)) dans les phénomènes synaptiques étudiés. Pour ce faire nous utiliserons des souris qui recevront des injections stéréotaxiques de vecteurs viraux pour ré-exprimer ou décroître l'expression (« knock-down ») de certaines protéines dans les neurones PV. Nous étudierons ensuite par électrophysiologie comment les synapses changent après ré-expression ou knock-down des protéines cibles (120 souris). Des travaux précédents nous ont permis de valider l'analyse des changements synaptiques et donc de minimiser le nombre d'animaux requis.

(4)Le quatrième objectif est de comprendre les mécanismes synaptiques par lesquels les filets périneuronaux (« perineuronal nets » ou PNN) contrôlent la période critique. Les PNN sont des structures qui se forment spécifiquement autour des neurones PV. Il a été montré que l'injection d'une enzyme (chondroitinase abc) qui digère les PNN dans le cerveau est suffisante pour ré-ouvrir la période critique chez le rongeur adulte. Cependant les mécanismes synaptiques ne sont pas compris. Nous allons injecter par

stéréotaxie l'enzyme dans le cortex visuel, ce qui n'entraîne pas de douleur spécifique. A l'aide des techniques d'électrophysiologie nous étudierons comment les synapses des neurones PV changent après injection de l'enzyme (24 souris).

(5) Le cinquième objectif est d'étudier comment les synapses changent en réponse à une fermeture d'un œil au cours de la période critique, en utilisant une déprivation monoculaire brève. Nous utiliserons des souris dont l'œil gauche sera suturé pendant 36 heures ou 72 heures (120 souris, dont 48 auront reçu au préalable des injections telles que décrites au point (3) ci-dessus)

Total des souris utilisées dans les procédures décrites : 288

Notre projet suit la règle des « 3R » (remplacement, réduction, raffinement). Le remplacement de l'expérimentation animale n'est ici pas possible, car la complexité des mécanismes de la période critique n'est pas reproductible in vitro. L'utilisation de la stéréotaxie (procédures 1 et 2) permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés, par rapport à la création de souris transgéniques. Enfin, nous utiliserons les protocoles d'analgésie, d'anesthésie et d'hébergement les plus poussés pour limiter au maximum l'inconfort des animaux.

4980. La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après l'étude multicentrique STAR*D, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement. En outre, les patients rétablis à la suite d'un premier épisode dépressif présentent un risque de récurrence dans les 6 mois évalué à 50% en cas d'arrêt du traitement et il a été montré qu'en l'absence de traitement 15% des patients succombent à la suite d'un suicide et qu'entre 60% et 80% des suicides (entre 10000 et 15000 par an en France) sont le fait d'individus fortement dépressifs. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements et la compréhension des mécanismes sous-jacents. Certains de ces mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant l'analyse d'échantillons cérébraux par exemple. Ces méthodologies ne peuvent être réalisées qu'au travers d'une approche préclinique.

Une restriction pour les recherches précliniques qui veulent étudier le mécanisme d'action des antidépresseurs (ADs) chez l'animal est qu'elles sont surtout réalisées chez des animaux normaux, qui ne sont pas dans un état « dépressif-like » (similaire à un état dépressif ou « depressed-like state »). Or les traitements aux antidépresseurs induisent très peu d'effets chez l'homme sain. Ces études ont été une première étape pour définir le spectre des actions possibles des ADs mais demeurent limitées pour déterminer les effets qui sont réellement nécessaires à l'action thérapeutique. C'est la raison pour laquelle nos travaux se basent sur l'utilisation du modèle du stress chronique léger imprédictible (SCI).

Le but de ce projet est de comparer les altérations sanguines et cérébrales associées à la résistance à deux antidépresseurs de référence : la desvenlafaxine et la nortryptine. Pour cette expérience, 72 souris réparties en 4 lots sont requises.

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

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

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

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité interindividuelle (n=12-24 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

4981. Les systèmes agroforestiers sont reconnus depuis quelques années dans le cadre de l'atténuation du changement climatique, notamment en climat tropical (accords de Kyoto par exemple). Les travaux menés sur ces systèmes sont considérés comme des options crédibles pour la lutte contre le changement climatique. L'importance de ces systèmes sur le volet adaptation en climat tempéré est par contre moins étudiée.

Sur le terrain, depuis la réforme des réglementations engagée en 2001, le nombre de projets récents progresse et leur surface dépasse les 10 000 ha en 2012. Cette augmentation pose la question de l'accompagnement sur le terrain et soulève surtout de nouvelles questions de recherche, notamment dans une perspective de prise en compte grandissante de l'agroécologie. L'agroforesterie est d'ailleurs citée comme un système de production adapté aux enjeux agro-environnementaux actuels, et devant faire l'objet d'une recherche approfondie.

Pour le secteur de l'élevage, dans un contexte de changement climatique, responsable en partie de la stagnation des rendements agricoles, les éleveurs doivent faire face à un contexte économique difficile : l'indice IPAMPA (Indice des prix d'achat des moyens de production agricole) montre une constante hausse depuis sa création, il est passé de 98 en 2005 à 134 aujourd'hui. Couplé à des sécheresses régulières qui affectent l'autonomie fourragère et plus globalement l'autonomie alimentaire, ces évolutions fragilisent les exploitations.

La fréquence des sécheresses impacte fortement le prix de la paille et des céréales, augmentant les charges des exploitations d'élevage. Les éleveurs doivent aujourd'hui anticiper les conséquences de ces évolutions. Cela passe entre autre par l'intégration de nouvelles dynamiques annuelles des productions fourragères : creux estival de plus en plus accentué, avance de la production printanière et une production hivernale non négligeable qui permettrait de limiter les conséquences du changement climatique.

Toutefois, à très long terme, d'ici la fin du siècle, une dégradation rapide des rendements des prairies est possible, avec pour conséquence l'obligation dans de nombreuses zones de devoir rentrer les animaux l'été, ou du moins les affourager à l'extérieur.

Dans un futur proche l'allongement des périodes de pâturage est considéré comme l'une des clés d'adaptation des systèmes d'élevage herbivores pour répondre aux évolutions de contexte qu'il soit climatique ou économique. L'allongement de la durée de pâturage, vers des périodes de moindre production fourragère, sur prairies ou sur parcours, permet des économies importantes en fourrages stockés et en concentrés sans dégrader les performances des animaux.

L'implantation d'arbres en prairie peut avoir une influence considérable en modérant la température de l'air et du sol, en accroissant l'humidité relative et d'autre part, en limitant l'évapotranspiration et le stress azoté des cultures. Ces effets bénéfiques à la croissance des cultures sont mis à profit dans de nombreux systèmes d'agroforesterie. Par transposition aux exploitations d'élevage herbivore, l'arbre serait un réel élément de soutien et d'adaptation au changement climatique pour les prairies pâturées par des ruminants mais également en assurant un rôle de protection des animaux vis-à-vis des intempéries ou du soleil durant les périodes hivernales et estivales.

L'expérimentation que nous voulons mettre en place a pour objectif de quantifier l'intérêt de l'arbre dans des prairies pâturée par des ovins. Elle durera 6 mois soit toute la période de pâturage et utilisera 30 brebis adultes suivies d'agneaux doubles soit 90 animaux qui seront subdivisés en 3 lots de 10 brebis, elle sera mise en œuvre sur deux ans. Les trois traitements seront (1) un lot témoin dit nu (une prairie avec un seul arbre isolé de façon à avoir un minimum d'abri pour les animaux), (2) traitement à densité moyenne (une parcelle avec 60arbres /ha) et (3) traitement à forte densité (parcelle avec 150arbres/ha). La taille des parcelles (traitements) est de 0.8ha pour permettre aux brebis d'y résider toute la période pâturage (de mai à novembre). Les brebis seront sorties 3 semaines après la mise-bas, au printemps. Les agneaux seront sevrés à 12 semaines d'âge et seront alors sortis du dispositif. L'utilisation de brebis suivies nous permet d'être dans un système productif et d'avoir des indications des performances des animaux (réalisations de pesées et de notes d'état corporel tous les 15 jours), de faire des observations comportementales (sociales et alimentaires) à différentes périodes et en conditions climatiques contrastées pour estimer le bien-être des animaux et d'avoir une indication sur l'état de santé des animaux (suivi de l'état parasitaire des animaux en même temps que les pesées). Les niveaux d'infestation et leurs conséquences sur les animaux seront contrôlés par des coproscopies qui nous permettront de rapidement identifier si un animal a une charge parasitaire trop importante qu'il conviendra alors de traiter avec un anthelminthique chimique.

Les animaux seront surveillés quotidiennement par du personnel qualifié pour déceler tout changement anormal de comportement (comportement général, apathie, boiterie). La taille des lots a été calculée afin que les groupes constitués soit suffisamment conséquents pour que les animaux expriment leur comportements sociaux normaux, tout en limitant le nombre d'animaux utilisé dans ce projet. Les prélèvements rectaux de fèces permettront de suivre l'état parasitaire des animaux mais aussi quantifier l'ingestion des animaux par des mesures de SPIR (spectre proche infrarouge), ceci afin de limiter le nombre et le type de procédures réalisées sur les animaux. Malheureusement l'utilisation d'animaux est indispensable compte tenu des objectifs du projet.

4982. La sclérose en plaques (SEP) est la maladie inflammatoire du système nerveux central (SNC) la plus fréquente. Apparaissant chez le jeune adulte, elle touche 2,5 millions de personnes dans le monde. Elle se présente sous deux formes cliniques principales : la forme dite récurrente-rémittente (SEP- RR) touchant environ 85% des patients au cours de laquelle les symptômes évoluent par « poussées » (apparition ou aggravation de symptômes) suivies de période de « rémission » (atténuation ou disparition des symptômes). Après 8 à 20 ans d'évolution une nouvelle forme de la maladie se développe, la forme dite secondaire progressive (SEP-SP) caractérisée par l'acquisition de déficits neurologiques continus et irréversibles en l'absence de poussée.

La SEP a longtemps été considéré comme une pathologie auto-immune démyélinisante provoquée par des lymphocytes T autoréactifs contre les protéines de myéline. Ce phénomène physiopathologique serait responsable des « poussées » dans la SEP-RR qui répondent la plupart du temps bien au traitement immunomodulateur, tandis que les « rémissions » seraient liées au phénomène de remyélinisation. Cependant, les patients développant une SEP-SP sont réfractaires à tout traitement, cette évolution serait vraisemblablement provoquée par l'accumulation de la dégénérescence ou de la perte axonale.

Les troubles moteurs sont les plus caractéristiques de la maladie mais ils sont également accompagnés de troubles cognitifs et de troubles sensoriels. Des études récentes rapportent que plus de 75% des patients présentent des symptômes douloureux : 51% rapportent des douleurs avec des caractéristiques neuropathiques et 46% des migraines. Bien que présent chez de nombreux patients, ses symptômes douloureux sont très peu étudiés d'un point de vue physiopathologique et sont la plupart du temps résistants aux médicaments disponibles.

Le projet proposé repose sur ce constat et a pour objectif général la compréhension des mécanismes physiopathologiques conduisant au développement des douleurs neuropathiques liées à la SEP avec pour perspectives d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin de réaliser cet objectif, nous proposons une approche innovante qui consiste à travailler en parallèle sur deux modèles murins ; le premier permettant d'évaluer l'impact de la composante immunitaire et inflammatoire de la maladie dans la SEP-RR, le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) et le second permettant d'évaluer les conséquences de la neurodégénérescence axonale dans la SEP-SP provoqué par l'inactivation du gène codant les protéolipoprotéines de myéline (souris KPLP).

Dans un premier temps, nous étudierons les symptômes douloureux présents dans ces modèles animaux en nous intéressant tout particulièrement aux douleurs neuropathiques qui peuvent être intermittentes ou permanente, spontanées ou provoquées. Elles sont associées à différentes anomalies sensitives incluant : des douleurs continues et des paresthésies (troubles de la sensibilité tactile) ainsi qu'une altération de la réponse aux stimuli que ce soit sous forme d'allodynie (sensation douloureuse suite à l'application

d'un stimulus non douloureux tel qu'un frottement), d'hyperalgésie (sensation douloureuse accrue lors de l'exposition à un stimulus douloureux) ou d'hypoesthésie (perte de sensation) dans certains territoires corporels. Dans un second temps, nous réaliserons des études neuropathologiques au niveau des centres de traitement de la douleur (ganglion de la racine dorsale (DRG), corne dorsale de la moelle épinière (DHSC) et substance grise périaqueducule (PAG)) afin d'identifier les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'apparition des symptômes douloureux. Une fois cette première étape de caractérisation physiopathologique qui conduira à l'utilisation dans 350 souris terminée, nous réaliserons une étude pharmacologique dirigée contre les cibles identifiées. Ces cibles ne sont pas encore formellement caractérisées, mais devraient concerner : 1) les agents responsables du stress oxydatif tels que les espèces oxygénées réactives ou les enzymes antioxydantes (glutathion peroxydase, superoxyde dismutase, ...) ; 2) les agents participant au phénomène de sensibilisation centrale tels que des agents pro-inflammatoires (facteur de nécrose tumorale α (TNF α), interleukine-1 β (IL-1 β), ...) ou des facteurs neurotrophiques (facteur neurotrophique issu du cerveau (BDNF), ...). En fonction du modèle animal étudié, et donc du facteur à l'origine des symptômes, il est très probable que les cibles pharmacologiques soient différentes. Nous prévoyons donc de tester au cours des 5 prochaines années, au maximum 3 cibles pharmacologiques pour chacun des modèles étudiés. Afin d'obtenir une puissance statistique suffisante, 12 animaux seront inclus dans chacun des 4 groupes : contrôles traités et non traités et malades traités et non traités. Ainsi seront utilisés pour tester 1 agent pharmacologique 48 animaux pour chacun des 2 modèles de SEP soit au maximum 320 animaux (pertes potentielles comprises).

Que ce soit pour la caractérisation physiopathologique ou pharmacologique des modèles, dès le début de l'expérimentation, les animaux seront observés et pesés quotidiennement afin de s'assurer qu'ils ne présentent pas une attitude inhabituellement traduisant un mal être (prostration, agressivité), qu'ils ne développent pas d'altération de l'état général (tumeur, excroissance, prolapsus...), qu'ils ne subissent pas de perte de poids supérieure ou égale à 20% de leur poids initial. Si l'un de ces événements intervient, les animaux seront alors mis à mort.

Ce projet est conforme aux exigences éthiques en matière d'expérimentation animale. En effet, (1) les expérimentations sont organisées de façon à ce qu'elles permettent l'obtention de résultats statistiquement exploitables avec le plus petit nombre d'animaux possible. (2) Les expérimentations et la méthodologie utilisées sont optimisées afin de réduire l'inconfort, la douleur ou l'angoisse subis par les animaux (soin porté à l'amélioration des conditions d'élevage et d'hébergement). De plus, les modèles animaux sont choisis avec pertinence afin de répondre à la problématique posée puisqu'ils miment les symptômes observés chez les patients. (3) Le recours à l'animal est indispensable afin de pouvoir évaluer les types de douleur dans les modèles murins de SEP. En effet, il n'existe pas d'alternative pour réaliser ces expériences. Enfin, (4) afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, après les études comportementales, les animaux seront prélevés afin que leurs échantillons biologiques soient étudiés en biologie moléculaire ou cellulaire permettant ainsi de mieux caractériser les modèles animaux ainsi que les conséquences des traitements pharmacologiques.

4983. L'ADN contenu dans chacune de nos cellules fournit toutes les instructions nécessaires à la fabrication de protéines. Ces protéines contrôlent tout ce qui passe au sein de notre corps. Quand une protéine est produite à partir d'une partie de notre ADN que l'on appelle gène, on dit que le gène est exprimé. Si toutes nos cellules contiennent la même information génétique, le même ADN, elles n'en font pas toutes le même usage : une cellule de la peau ne ressemble en rien à une cellule de l'œil. Ces différentes utilisations du code génétique font intervenir des mécanismes épigénétiques. L'épigénétique est l'étude des changements dans l'activité des gènes n'impliquant pas de modification de la séquence d'ADN et pouvant être transmis lors des divisions cellulaires. En d'autres termes, l'épigénétique s'intéresse à une "couche" d'informations complémentaires qui définit comment nos gènes vont être utilisés par une cellule... ou pas. Des études ont montré que les facteurs environnementaux tels que la nutrition, la température ou les polluants peuvent fortement influencer les marques épigénétiques des cellules. Les modifications épigénétiques induites par des polluants peuvent être à l'origine de l'apparition de cancer, de problèmes de diabète et d'infertilité. Ces changements pourraient même être transmis de générations en générations. Malgré cette prise de conscience, la recherche en épigénétique est étonnamment très limitée en écotoxicologie. L'écotoxicologie est une discipline à l'interface entre l'écologie et la toxicologie qui s'intéresse à l'effet des polluants sur les écosystèmes.

Dans ce contexte, le présent projet, associant une approche épigénétique et écotoxicologique, a pour objectif de mieux évaluer l'impact des polluants sur les populations de poisson en s'intéressant (i) aux modifications épigénétiques induites par une pollution chronique (faible concentration d'exposition et long terme, cas le plus fréquent dans la nature), (ii) à la transmission de ces modifications sur différentes générations et (iii) à l'impact de ces modifications sur différents marqueurs de l'état de santé des individus (croissance) et des populations (taux de fécondité, rapport mâles/femelles).

Dans ce projet, un total de 1000 poissons seront utilisés. Initialement, 110 poissons seront exposés toute leur vie au cadmium (Cd) dissous dans l'eau à une concentration non létale et écologiquement réaliste (5 $\mu\text{g/L}$). Le Cd est un métal non essentiel utilisé dans les batteries et peintures que l'on peut retrouver en forte concentration dans les milieux aquatiques en raison de l'activité humaine. En parallèle, 110 poissons seront élevés dans des conditions similaires mais en absence de Cd dans l'eau. Ces poissons, ainsi que leurs descendants, seront étudiés sur 3 générations successives non exposées au Cd (pour un total de 880 poissons). Dans le contexte du réchauffement global, l'effet combiné d'une exposition croisée au Cd et à une forte température (non létale) sera étudié sur un nombre limité d'individus (30 individus) et sur 2 générations (pour un total de 120 poissons). En effet, le sexe n'est pas déterminé à la naissance chez les poissons et la température est connue pour influencer la détermination du sexe via des mécanismes épigénétiques. L'objectif ici est de voir comment ces deux facteurs, Cd et température, peuvent interagir et modifier un paramètre fondamental pour la survie et le maintien d'une population, le rapport mâles/femelles. L'ensemble des expériences seront conduites dans le strict respect de la règle des 3 R. Le nombre d'animaux utilisé à chaque génération correspond au nombre minimum nécessaire aux analyses et à la production de la génération suivante. Les poissons seront maintenus dans des conditions

optimales d'élevage (90% et plus de saturation en oxygène, photopériode 14H/10H (J/N), présence de plantes aquatiques, faible densité) et seront nourris ad libitum avec des proies vivantes et de la nourriture artificielle. Pendant toute la durée de l'expérimentation, des observations quotidiennes permettront de suivre l'état de santé des individus. Dans le cas où les animaux présenteraient des signes anormaux de comportement (nage désordonnée, arrêt de la prise de nourriture) ou des signes externes de pathologies, ils seront euthanasiés dès l'apparition de ces premiers signes cliniques de souffrance.

4984. La médecine régénératrice s'est donnée pour objectif de régénérer ou d'aider les mécanismes de réparation naturelles des tissus endommagés dans l'organisme par la combinaison de différents domaines de recherche tels que les biomatériaux, la biologie cellulaire et les biotechnologies. Plus précisément, cette approche propose de reconstruire structurellement et fonctionnellement différents tissus en reproduisant et en combinant les composants primordiaux de ces tissus. Le développement de biomatériaux, formulés comme outils d'aide à la cicatrisation, permettent d'améliorer le traitement des plaies cutanées en conditions normales ou pathologiques. La valeur ajoutée ce projet repose sur la restauration d'un derme fonctionnel permettant au tissu de retrouver toute son intégrité et ses propriétés cutanées. Dans ce but, de nouveaux biomatériaux en tant que support actif de la cicatrisation sont élaborés depuis de nombreuses années. Pour cela, des polymères biocompatibles et biodégradables et des hydrogels composés de constituants biocompatibles sont préparés sous forme de matrices extracellulaire synthétique.

Dans le cadre de ce projet, l'objectif est de tester les propriétés de biocompatibilité et les propriétés biologiques pro-cicatricielles de biomatériaux innovants, formulés à partir de matériaux dont l'innocuité est connue et démontrée, dans le contexte de peaux saines et de peaux à la cicatrisation altérée (diabétique).

L'étude de la biocompatibilité et de l'efficacité biologique de ces biomatériaux nécessite une approche in vivo. Aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de ce projet car il requiert une approche intégrée de deux modèles de plaies. Le premier modèle consiste en une implantation sous-cutanée de ces biomatériaux, et le second en une perte cutanée chez des animaux sains et pathologiquement induits (diabétiques) qui sera comblée par ces biomatériaux.

Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Les souris seront suivies avec un soin particulier par des personnels compétents et une définition précise des points limites permettra de détecter et de limiter précocement tout signe de souffrance.

Ce projet concernera 575 souris au maximum.

4985. La population des pays économiquement développés vieillit. Ainsi, la proportion des 60 ans ou plus passera à 26 % en 2020 et à 35 % en 2050. Le vieillissement est caractérisé par le déclin de nombreuses fonctions biologiques réduisant la qualité de vie et augmentant la dépendance et la surmorbidity. Parmi ces altérations, la fonte musculaire (sarcopénie) se caractérise par une perte de la masse, de la qualité et de la force des muscles squelettiques. Jusqu'à présent, notre équipe utilisait exclusivement les rats mâles Wistar âgés pour modèle d'étude du vieillissement musculaire de l'Homme. En effet, ces animaux présentent plusieurs avantages pour les études de vieillissement, notamment une prévalence de développement tumoral et d'insuffisance d'organe (rein, foie, cœur) plus faible que les autres souches de rat, le rendant plus adapté à l'étude du vieillissement. De plus ces vieux animaux présentent des modifications anthropomorphiques et morphologiques proches de celles observées chez l'Homme avec l'avancée de l'âge (augmentation de la masse grasse, diminution de la minéralisation osseuse et réduction de la masse musculaire squelettique). Le développement et la mise à disposition par la communauté scientifique d'un nombre croissant de modèle de souris génétiquement modifiées (souris dont un des gènes a été supprimé ou dont un des gènes est surexprimé, par exemple) est un atout considérable pour comprendre puis lutter contre les différentes pathologies humaines. Notre équipe de recherche souhaite utiliser dans un avenir proche des modèles de souris génétiquement modifiées pour étudier le vieillissement musculaire. Mais avant d'utiliser de tels modèles, nous devons valider que la souris est un bon modèle d'étude de la sarcopénie. Même si plusieurs groupes internationaux ont déjà utilisé la souris mâle C57/B16 comme modèle d'étude du vieillissement musculaire, nous souhaitons vérifier que les techniques et les outils que nous avons développés ou que nous sommes en train de développer chez le rat Wistar âgé sont également adaptés au modèle souris. Nous utiliserons 10 souris mâles de 3 mois (jeunes) et 10 souris mâles de 20 mois. Nous comparerons différents paramètres entre ces souris de 2 âges différents notamment la synthèse protéique musculaire et la mobilité. En conformité avec la règle des 3R, le nombre d'animaux est limité à la quantité minimale suffisante pour atteindre les objectifs. Nous utiliserons au total 20 animaux.

L'ensemble du projet comporte 7 procédures dont le degré de gravité va de légère pour 6 d'entre elles à sans réveil pour la dernière. Un maximum de mesures sont prises afin de respecter la règle des 3R.

Les résultats obtenus nous permettront de déterminer si la souris âgée est un modèle adapté à l'étude de la sarcopénie.

4986. La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Elle se caractérise par une mort sélective des neurones moteurs situés dans le système nerveux central, par de l'atrophie musculaire et de la paralysie. Le décès des patients intervient trois à cinq ans après diagnostic.

Une partie des cas de SLA est d'origine familiale (SLAF), le plus souvent de transmission autosomique dominante. La SLAF est une maladie hétérogène, et des mutations dans plus de 10 loci sont actuellement connues pour provoquer la SLAF. Les formes les plus sévères de SLAF sont provoquées par des mutations du gène FUS. La protéine FUS est naturellement présente dans le noyau cellulaire, et les mutations liées à la SLA empêchent son entrée dans le noyau ce qui provoque son accumulation dans le cytoplasme cellulaire.

On ne sait actuellement pas si la maladie est provoquée par l'absence de FUS dans le noyau ou au contraire, par sa présence dans le cytoplasme.

Nous proposons ici de répondre à cette question.

Pour cela, nous utiliserons des techniques de génétique pour compenser la perte de FUS dans le noyau chez des souris qui n'expriment que de la protéine FUS dans le cytoplasme.

Si cette manipulation génétique empêche la mort de ces souris, nous aurons démontré que l'absence de FUS dans le noyau est en partie responsable de la maladie, ce qui a des conséquences importantes pour la conception de stratégies thérapeutiques.

420 animaux seront inclus dans ce protocole.

Les animaux seront suivis pour le développement de signes de SLA et mis à mort par injection intra-péritonéale d'une dose létale de pentobarbital de sodium à l'apparition de ces signes ou 12 mois après la naissance au plus tard.

Les données de comportement seront analysées par des ANOVA de mesures répétées.

Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation des protocoles. Les groupes expérimentaux ont été réduits au maximum pour permettre une robustesse statistique.

Le remplacement par des approches alternatives n'est pas possible car la complexité des unités motrices et l'implication de plusieurs types cellulaires excluent l'utilisation de modèles cellulaires et rendent incontournable l'utilisation de modèle animaux. Enfin, l'enrichissement de l'environnement des animaux, le maintien des interactions sociales et une surveillance quotidienne permettront de limiter la souffrance des animaux et de s'assurer de leur bien-être.

4987. La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Elle se caractérise par une mort sélective des neurones moteurs situés dans le système nerveux central, par de l'atrophie musculaire et de la paralysie. Le décès des patients intervient trois à cinq ans après diagnostic. Une grande partie des cas de SLA est sans histoire familiale associée, et de nombreux travaux suggèrent que des facteurs environnementaux, toxiques ou nutritionnels, sont associés au déclenchement et à la progression de la SLA.

Une partie des cas de SLA est d'origine familiale (SLAF), et des mutations dans plus de 10 protéines sont actuellement connues pour provoquer la SLAF. De nombreuses protéines mutées dans la SLA sont impliquées dans des voies de réponse au stress, qui sont aussi activées par des toxines environnementales, comme l'arsénite de sodium. Nous proposons ici de tester si l'arsénite de sodium à des concentrations retrouvées dans l'environnement modifie la maladie, très légère, développée par un modèle murin de SLA basé sur le gène FUS. Les animaux seront suivis pour le développement de signes de SLA et mis à mort à l'apparition de ces signes ou 6 mois après le début de l'administration d'arsénite au plus tard par injection intra-péritonéale d'une dose létale de pentobarbital de sodium. 300 animaux seront inclus dans ce protocole.

Les données comportementales seront analysées par des ANOVA de mesures répétées.

Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation des protocoles afin de limiter le nombre d'animaux et d'améliorer leur bien-être. Le nombre d'animaux par groupe a été calculé pour tenir compte des variations biologiques normales.

Le remplacement par des approches alternatives n'est pas possible car la complexité des unités motrices et l'implication de plusieurs types cellulaires excluent l'utilisation de modèles cellulaires et rendent incontournable l'utilisation de modèle animaux. Enfin, l'enrichissement de l'environnement des animaux, le maintien des interactions sociales et une surveillance quotidienne permettront de limiter la souffrance des animaux et de s'assurer de leur bien-être.

4988. La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Elle se caractérise par une mort sélective des neurones moteurs situés dans le système nerveux central, par de l'atrophie musculaire et de la paralysie. Le décès des patients intervient trois à cinq ans après diagnostic.

Les recherches les plus récentes suggèrent que la SLA se propage dans le système nerveux central par les connexions anatomiques, à la manière d'un prion. Ainsi, les inclusions protéiques de la SLA, comme les agrégats de TDP43 se propageraient le long des axones et se transmettraient de cellule à cellule, expliquant à la fois la progression des symptômes et les lésions anatomopathologiques observées. Cette hypothèse « prion-like » a été testée dans d'autres maladies neurodégénératives, telles que les tauopathies ou la maladie de Parkinson, mais les preuves d'un tel mécanisme dans la SLA restent limitées et le plus souvent corrélatives.

Nous proposons ici de tester cette hypothèse d'une propagation prion de la SLA dans un modèle murin basé sur une mutation de la protéine FUS.

Nous "ensemencerons" des fibrilles de la protéine FUS chez des souris porteuses d'une mutation FUS et déterminerons si cet ensemencement provoque une SLA.

Les animaux seront suivis pour le développement de signes de SLA et mis à mort à l'apparition de ces signes ou 6 mois après l'ensemencement au plus tard.

Les animaux seront mis à mort par injection intra-péritonéale d'une dose létale de pentobarbital.

Les données seront analysées par des ANOVA de mesures répétées.

Ce protocole inclut 315 animaux au total. Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation des protocoles afin de limiter le nombre d'animaux et d'améliorer leur bien-être.

Le remplacement par des approches alternatives n'est pas possible car la complexité des unités motrices et l'implication de plusieurs types cellulaires excluent l'utilisation de modèles cellulaires et rendent incontournable l'utilisation de modèle animaux.

Enfin, l'enrichissement de l'environnement des animaux, le maintien des interactions sociales, une surveillance quotidienne, ainsi que le recours à une analgésie post-opératoire permettront de limiter la souffrance des animaux et de s'assurer de leur bien-être.

4989. Le présent projet porte sur la mise en évidence d'anomalies du développement embryonnaire et néonatal des réseaux moteurs spinaux chez la souris SOD1G93A, modèle murin de la maladie sclérose latérale amyotrophique (SLA). La SLA est une maladie caractérisée par une dégénérescence des neurones moteurs qui survient pendant la vie adulte et qui conduit à une paralysie fatale. La plupart des études se sont focalisées sur les périodes symptomatiques ou pré-symptomatiques et non sur les mécanismes initiaux conduisant fort probablement à la survenue de la maladie. Dans le présent projet de recherche, nous proposons d'analyser la maturation des réseaux neuronaux moteurs embryonnaires chez la souris SOD1G93A au moment où ces réseaux locomoteurs acquièrent leurs caractéristiques adultes et lorsque la maturation de la transmission inhibitrice GABAergique/glycineergique survient. Nous proposons également d'agir, pendant la vie embryonnaire, sur les mécanismes impliqués dans la mise en place de la transmission synaptique et de tester si la survenue de la maladie est modifiée lors de la vie adulte.

Un développement anormal du réseau motoneuronal pourrait avoir des conséquences tardives conduisant à la dégénérescence des motoneurones pendant la vie adulte et à la paralysie fatale chez les patients SLA. Notre programme est un premier pas vers de nouvelles stratégies de recherche qui seront essentielles pour diagnostiquer la SLA à des stades précoces.

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

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

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

- Raffinement: le maximum d'attention est porté afin de diminuer l'incapacité des animaux à se nourrir en fin de vie.

Dans son ensemble, notre projet est basé sur l'utilisation de 480 animaux sur 5 années de recherche, soit 96 souris / an.

4490. La ricine, une protéine d'origine végétale, est un composé majeur de la menace bioterroriste : elle est très toxique, relativement facile à obtenir et peut être diffusée sous forme d'aérosol.. Aucun test ne permet aujourd'hui de détecter la présence de cette molécule après une intoxication. Or il est crucial que le diagnostic d'une intoxication à la ricine soit réalisé très rapidement et avec certitude afin de pouvoir mettre en œuvre tous les moyens disponibles pour traiter les sujets. Une stratégie rapide et sensible de détection de l'intoxication par la ricine par inhalation a été développée avec succès chez le rongeur. Cependant, cette méthode de diagnostic doit maintenant être validée chez une espèce animale proche de l'Homme.

Le primate non humain (PNH) a été choisi. Il constitue en effet un modèle d'exposition du tractus respiratoire bien maîtrisé car anatomiquement comparable à celui l'homme. Il fournit également une réponse moléculaire, biologique et clinique quantifiable à l'aide d'outils transposables immédiatement chez l'Homme.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 12 animaux nés et élevés en captivité et provenant d'élevages agréés. Afin de réduire ce nombre à un minimum nécessaire compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour l'interprétation des résultats, les animaux seront au préalable exposés à un placebo (groupe control) puis seront ensuite exposés à la toxine. Une partie des animaux du groupe expérimental recevra une même et unique dose de ricine. L'autre partie des animaux sera exposée à une autre molécule afin de confirmer la spécificité des résultats obtenus avec la ricine. Ce protocole reproduit à l'identique ce qui a été préalablement réalisé chez les rongeurs.

Les méthodes expérimentales ont été conçues de façon à éviter toute souffrance lors des interventions (prélèvements de sang, intoxication expérimentale) sur les animaux : elles seront réalisées sous anesthésie générale, et les volumes de sang prélevés seront réduits au minimum pour obtenir des résultats fiables.

Une attention particulière sera apportée à l'hébergement des animaux en groupe. Des critères d'arrêt, basés sur l'observation de signes cliniques d'intoxication, sont prévus afin de prendre en compte les effets éventuels liés à l'intoxication. Dans ce cas, le vétérinaire en charge de l'installation sera sollicité afin de prescrire un traitement approprié. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure de « bien-être animal » de l'établissement.

4991. Si les antibiotiques ont profondément transformé la médecine du 20ème siècle, leur utilisation généralisée a conduit à l'apparition puis à la dissémination de bactéries résistantes. Dans le même temps, l'effort de recherche de nouveaux antibiotiques s'est effondré. Apparaissent ainsi aujourd'hui des bactéries résistantes à tous les antibiotiques disponibles. Les infections sont donc de plus en plus difficiles à contrôler, et les traitements standards de moins en moins efficaces. Dans ce contexte, la mise au point de nouveaux composés anti-infectieux est critique et encouragée par les organisations telles que l'OMS, et les Center for Disease Control and Prevention américain et européen. De tels composés sont préalablement conçus et caractérisés in vitro afin de ne retenir que les composés suffisamment puissants et les moins toxiques. Mais ces données ne suffisent malheureusement pas pour prédire l'efficacité de ces composés chez l'homme.

Ce projet vise à caractériser, plus particulièrement, un des paramètres important de la pharmacocinétique qu'est l'élimination de ces composés anti-infectieux dans les urines et les fèces. Ce paramètre est important car il permet de préciser le potentiel d'un antibiotique dans le traitement des infections urinaires.

La pharmacocinétique (PK) c'est l'étude du devenir d'une substance active contenue dans un médicament dans l'organisme après son ingestion ou son administration. Ainsi, la détermination des paramètres pharmacocinétiques d'un médicament apporte les informations qui permettent de choisir les voies d'administration et d'adapter les posologies pour son utilisation future. L'étude de ces paramètres chez l'animal est très importante et ne peut pas être réalisée in vitro faute de modèle suffisamment complet pour prendre en compte les nombreux paramètres qui entrent en jeu dans l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination d'un composé chez un animal ou un homme.

Les études d'efficacité des antibiotiques étant réalisées principalement chez le rongeur (souris, rat ou hamster) nous avons besoin de modèles qui nous permettent de relier le devenir d'un composé anti-infectieux dans un organisme à son activité observée in vivo (pharmacodynamie).

Pour cela, nous étudierons donc l'élimination de ces nouveaux composés dans les urines et les fèces chez la souris, le rat ou le hamster adultes élevés en captivité et issus de trois fournisseurs agréés. Sur les 5 ans, nous prévoyons d'utiliser au maximum 1000 animaux à raison de 600 souris, de 300 rats et 100 hamsters.

Afin de calculer l'élimination rénale de ces composés, la production d'urine des animaux pourra être suivie sur 24h et des prélèvements sanguins pourront être réalisés à intervalle régulier.

Afin de permettre une analyse fiable des données, 6 à 12 animaux seront utilisés suivant les cas et les paramètres analysés.

Cet effectif est basé sur notre expérience en matière de recherche sur les composés anti-infectieux, la littérature dans ce domaine, et l'analyse statistique. Le nombre d'animaux par groupe est réduit au minimum et prend en compte la variabilité entre les animaux que l'on observe dans l'analyse des données pharmacocinétiques. Le nombre total d'animaux utilisés doit permettre de caractériser sur les 5 années de la durée du projet les candidats antibactériens issus de notre recherche, et de sélectionner les meilleurs pour les faire progresser vers les phases cliniques.

Les animaux sont hébergés en fonction de leurs besoins avec un milieu enrichi avant la mise en cage métabolique. De plus, le maintien en cage métabolique n'excédera jamais 3 jours y compris la période d'acclimatation. Une grille d'observation des signes cliniques et un arbre décisionnel correspondant sont mis en place afin de limiter le stress ou la douleur et d'optimiser le bien-être animal.

4992. Le cancer est à l'heure actuelle un enjeu de santé publique mondiale. L'incidence des nouveaux cas de cancers dans le monde est estimée à 14,1 millions de personnes et le taux de mortalité associé est porté à 8,1 millions de personnes. Les pays développés sont particulièrement touchés par ce fléau, ils comptabilisent environ 64% des décès liés au cancer dans le monde. Parmi les différentes stratégies actuellement en développement pour lutter contre ce fléau, la vaccination anti-tumorale apparaît comme prometteuse. Cette dernière, permet de stimuler ou de renforcer l'action naturelle du système immunitaire de l'organisme afin de lutter contre le cancer. Dans ce contexte, ce projet de pharmacologie s'inscrit dans une phase de développement préclinique de différents vaccins destinés à lutter contre les différentes formes de cancer. Il aura pour but de valider le mécanisme d'action et l'activité anti-tumorale de plusieurs candidats vaccins. Néanmoins, il n'est actuellement pas envisageable d'administrer un nouveau vaccin aux patients (cancéreux) sans qu'il ait été préalablement testé et évalué (efficacité, toxicité,...) chez l'animal. Ainsi, l'évaluation de l'efficacité anti-tumorale de nos vaccins sera réalisée dans des modèles expérimentaux tels que la souris. Il est important de noter que l'expérimentation animale sera utilisée de manière rationnelle et selon les réglementations en vigueur qui garantissent un traitement éthique de l'animal de laboratoire. De plus, les agents thérapeutiques utilisés au cours de ce projet ayant déjà montré leur innocuité chez la souris et l'Homme, aucun dommage majeur / effet secondaire n'est attendu dans le cadre de nos études.

D'une part ces études, nous permettront d'obtenir l'accord de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) pour évaluer l'efficacité de nos candidats vaccins dans des phases cliniques sur des patients atteints de cancers. D'autre part, elles seront constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché « AMM ». En effet, ces futurs vaccins devront répondre à des normes internationales de qualité scientifique et clinique qui seront étroitement évaluées par les autorités de santé pour la délivrance de l'AMM.

Ce projet s'échelonnera sur 5 ans, avec un nombre d'animaux compris entre 3360 et 6300 souris. Conscients du nombre élevé d'animaux prévus pour ce projet, nous allons tous les ans, réévaluer et réduire autant que possible le nombre d'animaux à utiliser en fonction des résultats. En effet, un screening in vitro puis in vivo chez l'animal nous permettra de réduire le nombre de candidats vaccins. Le but étant au fur et à mesure d'éliminer les vaccins les moins pertinents afin d'aller au bout du projet avec un nombre restreint de candidats vaccins. Cette réévaluation annuelle nous permettra ainsi de réduire le nombre de souris prévu initialement.

4993. La dépendance à la cocaïne, et aux drogues en général, est une pathologie chronique du cerveau qui se caractérise par une perte du contrôle de la consommation et une recherche extrêmement motivée du produit, pouvant être réactivées même longtemps après un arrêt de la consommation. Le développement de ce comportement non adapté provient de modifications à long terme du fonctionnement de neurones situés dans plusieurs régions cérébrales constituant collectivement un système fortement impliqué dans les processus émotionnels et motivationnels. Au sein de ce circuit, les voies intracellulaires conduisant à l'activation d'un facteur de transcription traditionnellement mis en jeu dans la réponse immunitaire, le NF- κ B, semble impliqué dans les processus de récompense liés à la cocaïne et pourraient participer au développement d'un comportement motivé et donc celui caractérisant l'état de dépendance aux drogues, y compris la vulnérabilité à la rechute après sevrage. Dans ce cadre, nous proposons d'étudier l'effet d'un inhibiteur sélectif de l'activation du NF- κ B, le parthénolide. Maîtrisant la technique d'auto-administration intraveineuse (AAiv) de cocaïne chez le rat, nous mesurerons l'impact de l'administration du parthénolide sur le comportement de

consommation et de recherche de cocaïne via divers protocoles. Cette étude sera réalisée chez le rat mâle jeune adulte. Le nombre d'animaux par condition pharmacologique sera de 12 en tenant compte de pertes éventuelles liées à la chirurgie, à la non-conformité de certains animaux vis-à-vis des critères comportementaux, et en considérant la variabilité interindividuelle. Au total, nous estimons devoir utiliser, pour cette étude, un maximum de 180 animaux. Concernant la règle des 3R, nous apportons les précisions suivantes : (i) REMPLACEMENT. Dans le domaine de la dépendance aux drogues, pathologie éminemment complexe nécessitant l'intégrité du cerveau en fonctionnement normal, il est impossible de s'affranchir de l'utilisation d'animaux vivants. (ii) RAFFINEMENT. Il est important de noter que la chirurgie nécessaire à ce type d'expériences est plutôt légère et n'induit pas, sauf cas exceptionnel, de souffrance détectable chez le rat. Par la suite, toutes les administrations de produits se font sans piqure, par le biais du cathéter intraveineux, ce qui réduit considérablement stress et/ou douleur. Un suivi sanitaire méticuleux est néanmoins assuré, veillant au bien-être de l'animal. Par ailleurs, la chronicité des expériences, inévitable dans la modélisation d'une pathologie au développement lent mais tenace, est réduite au maximum dans le sens où les expériences sont arrêtées dès qu'une modification significative du comportement est apportée par l'intervention pharmacologique. Si aucun effet n'est observé après 15 jours d'AA quotidienne, l'expérience est interrompue. (iii) REDUCTION. Nous avons réduit au maximum le nombre de rats nécessaires aux analyses statistiques en tenant compte (notamment) de la variabilité interindividuelle dans le comportement (12 rats/conditions pharmacologiques) et dans la biologie moléculaire (6 rats/conditions pharmacologique pour les groupes témoins non soumis au comportement).

4994. Le présent projet a pour objectif de mieux comprendre la mise en place de l'architecture du muscle cardiaque et ses capacités de régénération. Le muscle cardiaque ou myocarde est le tissu principal du cœur. Sa taille et son architecture orientée sont nécessaires à la contraction efficace du cœur et à la mise en place de la circulation sanguine. Par l'étude de modèles déficients pour des voies de signalisation, nous voulons mettre en évidence les mécanismes de croissance du myocarde.

Nous utilisons la modélisation mathématique et des cultures cellulaires, pour préciser des mécanismes possibles de la morphogenèse ou préciser des voies moléculaires de signalisation. Cependant, les lignées cellulaires immortalisées ont dérivé de leur état initial et nous leur préférons des cultures primaires, correspondant à des cellules fraîchement dissociées d'un tissu. En général, ces expériences de remplacement ne peuvent pas reproduire la complexité des mécanismes mis en jeu au cours du développement embryonnaire pour générer la forme tridimensionnelle du cœur, comme l'intégration d'une multitude de signaux et d'interactions cellulaires. C'est pourquoi nous aurons recours à l'étude d'embryons de rats et de souris porteuses de mutations dans différents gènes dont la fonction est importante au cours du développement.

Les mutations étudiées, à l'état homozygote, provoquent la mort au premier jour de la naissance, en raison d'insuffisances respiratoire ou cardiovasculaire, mort qui ne sera jamais le point limite car l'analyse des animaux sera effectuée avant la mort.

Le nombre de souris génitrices génétiquement modifiées – mais ne présentant pas d'anomalie clinique- utilisé est basé sur un plan expérimental stéréotypé permettant d'obtenir la puissance statistique nécessaire à l'obtention de conclusions biologiquement pertinentes. Lors de la génération d'une nouvelle lignée génétiquement modifiée ou d'une expérience d'injection sera mise en œuvre une surveillance accrue des animaux afin de repérer la survenue éventuelle d'un signe clinique pouvant indiquer une souffrance ou un mal-être des animaux (dos vouté, poils hérissés...). Les expériences sont principalement menées sur des tissus fixés, après mise à mort des animaux. Sur les 5 années de ce projet, nous prévoyons l'utilisation de 300 souris adultes, 8875 fœtus ou souriceaux nouveau-nés. dans une procédure de gravité « légère ».

Ce projet de recherche fondamentale sur la morphogenèse du cœur et les mécanismes de croissance du myocarde a des retombées pour la compréhension des malformations cardiaques, qui affectent près de 1% des naissances, ainsi qu'en médecine régénérative, pour trouver des stratégies de réparation du cœur.

4995. Les diarrhées à *Clostridium difficile* constituent un problème de santé publique, notamment du fait des infections récidivantes résistantes aux antibiothérapies conventionnelles. La transplantation de microbiote fécal (TMF) donne de très bons résultats dans le traitement de ces récurrences mais l'accès à cette thérapie est limité du fait de l'utilisation de selles fraîchement émises par le donneur. Notre objectif est de définir des conditions de conservation des préparations fécales congelées à -80°C permettant de maintenir l'efficacité du traitement et facilitant l'accès de ce traitement aux patients.

L'impact de la TMF sur le microbiote intestinal et sur le dialogue microbiote-hôte, notamment le dialogue microbiote-système immunitaire, est extrêmement complexe et seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement possible les infections à *C. difficile* permettra d'évaluer la meilleure condition de conservations des selles permettant une TMF efficace.

Les souris seront tout d'abord traitées par un antibiotique pendant 10 jours pour perturber le microbiote intestinal puis elles seront infectées par *C. difficile* (modèle ICD). Deux jours après l'infection, elles seront traitées par TMF. La colonisation par *C. difficile* et le microbiote intestinal seront suivis par des prélèvements fécaux. Après 10 jours, les souris seront euthanasiées pour prélever des organes afin d'étudier les lésions intestinales et l'immunité. L'impact de la TMF sur l'équilibre du microbiote intestinal et la physiologie du colon sera aussi étudié hors infection.

Le nombre de souris sera de 704.

Principe des 3 R : nous sélectionnerons préalablement *in vitro* 2 cryoprotecteurs à tester *in vivo*. Une surveillance quotidienne des animaux est prévue. Des points-limites ont été établis, entraînant la mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme nous aurons sélectionné les conditions de conservation des selles permettant une transplantation de microbiote fécal congelé aussi efficace qu'avec des selles fraîches pour une application thérapeutique chez l'homme.

4996. Le retard de croissance intra-utérin (RCIU) est une problématique tant dans la compréhension de sa physiopathologie que dans l'établissement du diagnostic. C'est un enjeu de santé publique : son impact en termes de suivi de la grossesse, de pronostic fœtal et néonatal en fait un sujet majeur de préoccupation. Une des causes principale de RCIU est un défaut de vascularisation utéroplacentaire. Actuellement, l'échographie est l'examen de référence dans le dépistage du RCIU mais il présente de nombreuses limites.

Le système vasculaire utéroplacentaire est très complexe et sa physiopathologie est encore mal connue. D'autres techniques d'imagerie sont actuellement à l'étude comme l'écho-angiographie 3D, l'échographie de contraste ou l'IRM fonctionnelle. L'IRM est actuellement la technique la plus prometteuse dans la compréhension et l'évaluation de la vascularisation utéroplacentaire. L'imagerie de perfusion avec injection de produit de contraste semble être la technique la plus intéressante pour comprendre et apprécier la perfusion placentaire. L'étude de la fonction placentaire et d'utiliser ces nouvelles techniques d'imagerie pour comprendre au mieux la physiologie vasculaire placentaire.

Le modèle d'hypo perfusion placentaire chez le lapin a déjà été étudié par le passé et semble donner satisfaction. Cependant il n'existe pas aujourd'hui de travail évaluant en IRM l'évolution de la perfusion placentaire au cours d'une gestation physiologique ainsi que la corrélation entre ces données d'imagerie à l'histologie.

Nous avons déterminé le nombre de lapines à inclure dans notre protocole pour envisager des résultats significatifs. 30 lapines au total seront donc inséminées artificiellement. Nous réaliserons à G14, G21 et G28 de la gestation une IRM sous anesthésie générale et ventilation artificielle. Après la dernière IRM nous réaliserons une échographie 2D et de contraste (par injection de produit de contraste échographique en intra vasculaire).

Enfin les lapines seront euthanasiées, nous prélèverons les unités fœto-placentaires pour réaliser une analyse histologique afin de comparer les données imagerie-histologie.

Pendant toute la gestation les lapines seront placées dans des cages séparées à l'animalerie de la faculté de médecine. Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement pendant la gestation. Le milieu de vie des lapines sera enrichi par du foin, des bâtonnets à mâcher et des balles en plastiques.

Les lapines seront inséminées dans une pièce différente que celle des cages. Elles seront également euthanasiées dans une pièce différente.

4997. Le tissu adipeux est constitué d'un ensemble de cellules de tous types, notamment certaines liées à l'inflammation ou à la vascularisation. Il est classé en deux groupes : le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. Alors que la graisse blanche (WAT) est composée d'adipocytes à larges vacuoles permettant le stockage des lipides, la graisse brune (BAT) présente de petits adipocytes riches en mitochondries permettant de jouer un rôle dans la production de chaleur.

Au niveau de la graisse blanche, celle-ci peut être retrouvée au niveau périvasculaire (PVAT). Elle a ainsi été présentée pendant de nombreuses années comme un simple tissu de soutien des vaisseaux. Cependant, de récents travaux ont pu mettre en évidence un rôle actif de la graisse périvasculaire et ainsi démontrer son implication dans plusieurs pathologies vasculaires.

En effet, la lipodystrophie congénitale de Berardinelli-seip (BSCL), aussi connu sous le nom de lipodystrophie congénitale généralisée, est une pathologie autosomale récessive observée dès la naissance. Dans 95% des cas, la cause est une mutation du gène BSCL2 codant pour la Seipine. Elle se caractérise par une absence totale de tissu adipeux déclenchant une hypertryglycémie, une déficience hépatique ainsi qu'une hypertrophie cardiaque généralement fatale. Cependant, l'effet d'une absence de graisse périvasculaire sur la réactivité des vaisseaux reste encore inconnu.

Cette étude a donc pour but de décrire l'influence de la graisse péri-vasculaire sur la réactivité de vaisseaux de compliance ou de résistance grâce à l'utilisation de souris Bsc12 $+/+$ ou $-/-$. Par l'utilisation d'un système de ligature, nous allons ainsi tenter de discriminer les voies de signalisation graisse-dépendante responsables de la mise en place du remodelage flux-dépendant. Nous observerons également l'effet d'un traitement hypertensif par L-NAME ou Angiotensine II sur les souris Bsc12 $+/+$ et Bsc12 $-/-$ pour comprendre l'influence d'une absence de graisse sur une pathologie présentant une composante inflammatoire forte.

Pour l'étude de fonction vasculaire un total de 400 Souris avec 200 souris Bsc12 $+/+$ et 200 souris $-/-$ sera nécessaire. Seules les expériences indispensables seront réalisées. Il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience. Les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale complétée par une analgésie. Une analyse statistique des résultats sera réalisée (analyse de variance ANOVA suivie d'un test post hoc LSD).

4998. Nous travaillons sur l'activation des cellules souches musculaires chez les poissons, et nous avons mis au point un protocole d'extraction de ces cellules à partir de muscle de truites. Ces cellules sont en quantités plus importantes dans les jeunes stades (entre 2 et 25g). Dans le cadre d'un projet de thèse, nous avons pour objectif d'identifier les gènes impliqués dans l'activation continue des cellules souches chez la truite. Notre projet nécessite l'obtention de cellules souches non activées (quiescente) au moyen d'une mise à jeun de truite pour les comparer avec des cellules activées. Ces analyses nous permettront d'identifier les gènes spécifiquement impliqués dans l'activation continue des cellules souches chez la truite.

R1 : Le muscle de truite est la seule source de cellules souches musculaires et il n'existe aucune lignée musculaire chez les poissons.

R2 : Nous limiterons le nombre de poissons à 70 pour l'expérience, ce qui nous permet d'obtenir suffisamment de cellules pour conduire nos analyses.

R3 : Des expériences passées, ont montré que le jeûne chez la truite n'entraînait aucune mortalité et une faible perte de poids. En effet, de par leur cycle biologique naturel, les salmonidés sont adaptés à subir des périodes de jeûne.

4999. Pendant des millions d'années, la gravité a façonné tous les organismes aussi bien animaux que végétaux. Elle a été le facteur majeur dans l'évolution. Il n'y a qu'à considérer les différents tissus, leur structure et leurs fonctions pour s'en rendre compte : tissu osseux (dont nous n'aurions pas besoin si la gravité n'existait pas), musculaire, système nerveux et cardiovasculaire. Le rôle de la gravité sur ce dernier système est évident surtout chez l'Homme. L'absence de gravité lors des vols spatiaux perturbe ces systèmes. Par exemple, lors des retours des vols spatiaux une hypotension orthostatique est notée avec diminution de l'épaisseur des parois cardiaques. Au niveau musculaire, une atrophie majeure est observée dès les premiers jours d'un vol spatial. L'exercice musculaire est la technique la plus utilisée pour contrecarrer ces effets. Cela posera des problèmes pour les voyages spatiaux longs (1 à 3 ans) envisagés actuellement sur Mars.

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

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

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

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

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

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

5000. L'épilepsie de la face mésiale du lobe temporal (MTLE) est une des formes d'épilepsies parmi les plus réfractaires aux traitements antiépileptiques actuels. En effet, cette forme d'épilepsie représente à elle-seule la moitié des patients épileptiques en échec thérapeutique.

Le modèle dit kainate constitue un modèle validé de cette forme d'épilepsie chez la souris. Il consiste en l'injection d'une micro-goutte d'acide kainique dans le cerveau d'un animal sain, rendant l'animal épileptique dans le mois qui suit, avec les mêmes symptômes que ceux observés dans le cadre des MTLE humaines.

Jusqu'à présent, le modèle n'a été étudié que sur une seule lignée de souris ne permettant pas d'envisager l'importance de l'influence génétique. Le but de cette étude est d'étudier ce modèle MTLE sur huit lignées de souris consanguines (n=12 souris par lignée), permettant d'évaluer l'impact du patrimoine génétique sur cette épilepsie. L'élaboration des procédures a objectivé la minimisation d'une hypothétique souffrance des animaux avec une détermination précise des points limites. Il n'est pas envisageable d'utiliser une approche in vitro en suppléance à l'approche in vivo. Le nombre d'animaux inclus dans le projet a été minimisé pour permettre une approche statistique pertinente pour l'évaluation de nos hypothèses.

