



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

Résumés non techniques des projets autorisés (52)

5201. Le cancer du foie est un des cancers les plus mortels et les plus répandus dans la population humaine. Peu d'options thérapeutiques sont disponibles. Dans 9 cas sur 10, le cancer se développe dans les foies déjà malades des patients souffrant d'hépatites aggravées en cirrhose. Ces hépatites peuvent être d'origine virale, ou liées à la consommation excessive d'alcool ou encore de régime riche en graisses. Afin de pouvoir étudier le développement cette maladie, l'hépatite et le cancer du foie en particulier, une équipe japonaise a trouvé les conditions de traitement pour obtenir des souris malades d'hépatite et développant un cancer du foie comme chez l'Homme. Ce traitement combine l'administration d'un agent chimique à une alimentation très riche en lipides de souris mâle. Notre équipe a récemment obtenu des données qui suggèrent qu'une protéine impliquée dans le contrôle de la mort des cellules, la kinase RIPK1, pourrait être impliquée dans les processus de déclenchement et/ou de prolifération du cancer du foie. Notre projet est d'étudier le rôle de cette protéine dans le cancer du foie en comparant le développement de la maladie induite par le traitement/régime alimentaire riche en lipides chez des souris normales, des souris n'exprimant pas la kinase RIPK1 dans les cellules du foie, ou exprimant la protéine RIPK1 mutée qui a perdu une de ses fonctions. Pour atteindre le stade cancéreux, le protocole devra durer 27 semaines, les animaux seront étudiés après 4, 5, 7, 9, 12, 16, 20 et 27 semaines de traitement pour comparer les évolutions de la maladie chez les différents types d'animaux. Les organes prélevés seront analysés par différentes méthodes pour quantifier l'atteinte hépatique, les dysfonctionnements métaboliques et l'avancée du cancer. Le nombre de souris engagées dans ces expériences est évalué au nombre de 832, nous avons pensé ce protocole en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner » :

- Nous avons réduit le nombre de souris à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats, les congénères de la première lignée de souris déficientes sont considérées comme des contrôles pour les 2 lignées modifiées génétiquement.
- L'étude a été raffinée en développant un suivi rigoureux des souris tout au long du protocole en mesurant la quantité de nourriture absorbée ainsi que le poids de chacune des souris, il est attendu que les souris perdent jusqu'à 20% de poids corporel sans que ceci ne soit un indice de souffrance ou de danger pour les souris. Le bien-être des animaux sera donc évalué de façon complémentaire et hebdomadaire en observant leur comportement et les indices pouvant suggérer une douleur au moyen du score de grimace. A noter que dans le travail publié ayant utilisé ce traitement, aucune souffrance ou mortalité des souris n'est mentionnée.
- Il faut noter qu'il n'existe aucun moyen de remplacer de telles études qui englobent l'ensemble de l'organisme dans sa réponse physiopathologique, et que seule l'expérimentation animale permet un suivi complet de la maladie depuis ses phases les plus précoces.

Ce travail permettra de préciser le rôle de la molécule RIPK1 dans l'évolution de la maladie « hépatite » conduisant au cancer du foie chez la souris. A terme, les données de ce travail pourraient permettre de développer de nouvelles stratégies préventives du cancer basées sur l'utilisation de nouveaux inhibiteurs pharmacologiques de la molécule RIPK1.

5202. Les études précliniques permettent d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament, indispensable avant les essais chez l'homme. Le développement préclinique fait en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de l'administrer à l'homme. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacocinétique, de la toxicologie ou encore de l'efficacité. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament et sont donc indispensables.

L'ostéoartrite est une maladie inflammatoire chronique qui entraîne des douleurs persistantes au niveau des articulations causées par l'usure anormale du cartilage.

Cette pathologie affecte des millions de personnes chaque année et a donc des impacts sociaux et économiques majeurs sur les patients et le système de santé. Les thérapies actuellement disponibles pour traiter ces maladies ne réussissent pas à lever de façon adéquate la douleur chez beaucoup de patients, et les effets secondaires des traitements limitent considérablement leur utilisation. De plus, les traitements utilisés ne traitent que les conséquences de la maladie, c'est à dire l'inflammation et la douleur. Il y a donc un besoin urgent de trouver de nouvelles molécules efficaces. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet, le but étant d'étudier l'effet de nouveaux traitements potentiels sur la réponse à la douleur et l'inflammation dans des modèles animaux mimant l'ostéoartrite chez la souris.

Pour ce projet nous pensons effectuer 20 études avec pour chaque étude, l'utilisation de 50 souris (5 groupes de 10 animaux), soit 1000 souris sur 5 ans.

En conclusion, ce projet permet d'envisager des bénéfices cliniques et économiques évidents. Pour des groupes de 10 animaux, répartis sur 5 ans, le projet porte sur une estimation de 200 souris par an.

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes :

- « Remplacer » les modèles animaux : Notre projet se focalise sur un modèle expérimental nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.
- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation : Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant, afin de pouvoir conclure sur l'efficacité du traitement.
- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") : Les animaux feront l'objet d'une surveillance rapprochée afin de détecter les points limites de souffrance.

5203. Dans le cerveau les neurones communiquent par le biais de neurotransmetteurs au niveau de structures très petites, les synapses faites de 3 parties, les compartiments présynaptique, et post synaptique et la fente synaptique. Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur. Il est libéré au niveau des présynapses grâce à des vésicules de sécrétion. Les transporteurs vésiculaires de glutamate (VGLUT) permettent au glutamate d'entrer dans les vésicules de sécrétion et sont donc des protéines essentielles à la neurotransmission et au fonctionnement du cerveau. Trois ont été découverts à ce jour. Le transporteur VGLUT1 est le principal VGLUT dans le cerveau antérieur. Afin d'en étudier le fonctionnement et celui des neurones l'utilisant, nous souhaitons utiliser la souris VGLUT1KO, cad invalidée pour le gène de VGLUT1. Nous savons que les souris homozygotes montrent un phénotype nocif et que leur survie au-delà de 17 jours après la naissance est très difficile. Ce projet concerne le maintien de cette lignée et la production d'homozygotes et leurs contrôles sauvage pour un projet scientifique s'intéressant au rôle de VGLUT1 dans la transmission synaptique avec différentes approches de cultures cellulaires pour de l'imagerie, et de biochimie et de l'immunohistochimie. Le nombre d'animaux produits pour ces 5 ans, sera d'environ 980 (tous génotypes confondus). Pour réduire au maximum le nombre d'animaux, la production sera rationalisée par l'établissement de programmes d'élevage répondant au plus près à la demande réactualisée tous les 3 mois. Les homozygotes seront l'objet d'une surveillance particulière avec des mesures spécifiques afin de limiter leur souffrance

5204. Le projet de recherche fondamentale que nous mènerons pendant trois ans vise à comprendre comment le cerveau perçoit l'environnement extérieur et forme une représentation de celui-ci. Plus précisément, le but de notre projet est de comprendre, chez le rat, comment les odeurs sont encodées par le système nerveux central en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques et/ou de leur signification éthologique. La modalité olfactive constitue, chez les rongeurs, un modèle privilégié d'étude de la représentation d'un stimulus sensoriel au sein des aires cérébrales. En effet, les rongeurs sont des macrosmates qui utilisent principalement leur sens olfactif pour la perception de leur environnement (interactions sociales, recherche de nourriture, détection des prédateurs). Contrairement aux autres systèmes sensoriels dont les stimuli peuvent être décrits par un petit nombre de variables (fréquence d'un son, longueur d'onde d'une couleur, position dans l'espace...), le système olfactif doit discriminer et identifier des odeurs appartenant à un ensemble vaste et hétérogène de composés chimiques ne pouvant être classés par un nombre limité de caractéristiques. Cette difficulté à décrire et classer les odeurs explique sans doute la méconnaissance de leur représentation cérébrale. Plusieurs études suggèrent que les différentes structures constituant le « cortex olfactif » encodent différents aspects du stimulus comme sa qualité, son intensité, sa complexité ou sa signification (innée ou acquise). Une des difficultés pour aborder ces questions réside dans l'étendue de ces aires cérébrales, leur nombre et leur localisation ventrale les rendant difficilement accessibles. Pour pallier ces inconvénients, nous proposons de cartographier l'activité cérébrale grâce à la tomographie par émission de positons (TEP). Cette technique d'imagerie, initialement développée pour l'homme, a été adaptée à l'étude des petits animaux. Basée sur l'utilisation de radio-traceurs injectés à l'animal et captés par les neurones actifs, elle permet de cartographier la totalité des aires cérébrales activées lors d'une stimulation olfactive. La validation technique de cette méthode chez des rats naifs, en utilisant des odeurs neutres, nous permettra de constituer un groupe témoin. La deuxième série d'expériences visera à étudier les réseaux neuronaux impliqués dans l'encodage de la signification de l'odeur. Cette signification sera soit acquise, en utilisant le conditionnement de peur qui consiste à associer une odeur à un événement aversif, soit innée en utilisant l'odeur de prédateur.

Application de la règle des 3R et nombre d'animaux

Comme la peur ne peut être appréhendée que sur des individus réactifs, il est nécessaire d'utiliser des animaux éveillés pour ce type d'étude. 60 animaux au maximum seront utilisés sur les trois années que durera ce projet. Le projet ne nécessitant aucune intervention sur l'animal (hormis l'injection d'un traceur radioactif similaire à celui utilisé chez l'Homme) permet de réutiliser les animaux dans d'autres protocoles. De plus, les animaux seront leur propre témoin (avec ou sans odeur) afin d'utiliser des tests statistiques dit appariés permettant de réduire le nombre d'animaux. Enfin, comme le système olfactif est très conservé à travers les différentes espèces, les résultats de notre étude permettront de mieux extrapoler les mécanismes de représentation des informations sensorielles chez l'Homme.

En apportant de nouvelles connaissances sur les réseaux neuronaux impliqués dans la formation des mémoires de peur, cette étude permettra à plus long-terme de mieux comprendre les pathologies qui y sont associées chez l'homme, comme les troubles anxieux ou les syndromes de stress post-traumatiques.

Un raffinement continu des pratiques d'expérimentation sera pratiqué. Les rats seront hébergés dans des cages aux normes avec à disposition des formes d'enrichissement (nid végétal à base de coton et igloo) afin de réduire le stress.

5205. Afin d'améliorer le bien-être animal en élevage et simplifier les conditions de travail des éleveurs, ce projet a pour objet de tester les administrations par voie topique (VT) en alternative à celles réalisées en intra musculaire (IM).

La voie topique consiste en une administration externe sur la peau.

Nous allons tester l'administration d'une molécule x qui possède une autorisation de mise sur le marché AMM par voie intra musculaire chez le porc et une AMM par voie topique pour une autre espèce.

Les administrations seront réalisées sur des porcelets de 7 jours d'âge, il s'agit de la plus jeune tranche d'âge susceptible de bénéficier de l'administration.

Deux types d'administrations seront réalisées, l'une par voie topique et l'autre par voie intraveineuse (voie de référence pour mesurer la biodisponibilité de la molécule lors des tests de pharmacocinétique)

Les portées de 7 truies seront sélectionnées, dans chaque portée 3 ou 4 porcelets seront attribués au groupe voie topique et 4 ou 5 au groupe intra veineuse, soit 24 porcelets dans le groupe VT, 32 porcelets dans le groupe IV.

Le sang de chaque porcelet sera collecté après l'administration, afin d'évaluer la biodisponibilité de la molécule.

Le groupe VT (n= 24 porcelets) sera divisé en 3 sous-groupes et le groupe IV (n=32 porcelets) sera divisé en 4 sous-groupes correspondant aux délais entre le traitement et les prélèvements : soit 56 porcelets totaux

Avant traitement le sang de 2 porcelets par sous-groupe sera collecté, pour vérifier le niveau basal.

Après administration de la molécule x, le sang sera collecté 2 fois (de 5 minutes après administration jusqu'à 24 heures) pour l'ensemble des porcelets:

Les porcelets seront hébergés en cases individuelles de l'administration jusqu'à la seconde prise de sang (15 min, 8, 12, 24 h selon le sous-groupe).

Ils seront en contact visuel et olfactif mais pas en contact direct. Ils seront alimentés artificiellement avec un lait reconstitué.

La règle des 3rs a été prise en compte ;

Remplacement, cette étude est menée spécifiquement pour mesurer les effets d'e l'administration par application locale sur le porcelet, l'utilisation animale ne peut être évitée.

Réduction, nous avons réduit au maximum le nombre de porcelets par sous-groupe (n=8) pour avoir des données fiables par temps de prélèvement et le nombre de prélèvements de sang (n=2 ou 3 / max.3) par porcelet

Raffinement, pendant la période d'isolement nécessaire à l'expérimentation, les porcelets seront isolés en boîtes transparentes individuelles, confortables et chauffées.

5206. Les cholangiocarcinomes, cancers des voies biliaires, sont rares dans le contexte de la cholangite primaire biliaire (CPB), alors qu'ils sont fréquents dans le contexte de la cholangite sclérosante primitive (CPS). Nous explorerons la relation entre ces maladies auto-immunes /inflammatoires et l'immuno-surveillance contre le développement du cholangiocarcinome. Notre hypothèse de travail suggère que les réactions auto-immunes associées au CPB empêchent la transformation maligne ou la progression des cholangiocarcinomes, alors que la composante inflammatoire du CPS pourrait favoriser le développement de ces néoplasies. Nous explorerons ces connections dans des modèles animaux spontanés ou induits de CPB et de CPS. Primo, nous effectuerons des expériences de croissances et vaccinations tumorales pour déterminer l'implication du système immunitaire. Secundo, nous modulerons le microbiome intestinal en traitant les souris avec différentes combinaisons d'antibiotiques à large spectre pour altérer le cours de la cholangite. Dans ces modèles nous déterminerons la croissance de cellules de cholangiocarcinome haplo-compatibles qui seront inoculées par voie sous-cutanée. En utilisant ces approches, nous serons capables d'établir les relations causes/effets entre des facteurs environnementaux (microbiome), les voies cellulaires du stress et de la mort (mort cellulaire immunogène), des réponses auto-immunes délétères contre les cholangiocytes normaux et l'immuno-surveillance souhaitable contre le cholangiocarcinome. L'objectif de ce projet est d'éclaircir la relation entre auto-immunité délétère contre le soi normal (donnant lieu à une pathologie manifeste) et l'auto-immunité désirable contre les antigènes tumoraux (permettant l'immuno-surveillance anticancéreuse). Cette question ne peut être abordée qu'in vivo car il n'existe pas de modèles alternatifs pour étudier l'implication du système immunitaire dans les cholangiocarcinomes. Pour se faire, nous projetons d'utiliser des souris immunocompétentes (maximum n=3660). Dans la réalisation de ce projet, qui se dessine sur 5 ans, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement et permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Nous pourrions être amenés à utiliser moins de souris si l'effet observé s'avère significatif au cours des premières expériences. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales invalident l'hypothèse de travail. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés. 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 tunnel en carton). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

5207. Aujourd'hui, l'industrie des biomédicaments, tels que les anticorps monoclonaux est en plein essor. En effet leur utilisation a complètement modifié la prise en charge des patients atteints de cancers, de maladies auto-immunes et/ou inflammatoires. Ces

anticorps thérapeutiques offrent un vrai potentiel pour le traitement des maladies respiratoires, notamment des infections respiratoires qui représentent 13% des décès en Europe et un coût important pour la société avec 6 millions d'hospitalisations chaque année.

A l'heure actuelle, les anticorps (Ac) disponibles sur le marché sont majoritairement administrés par voie intraveineuse (i.v). Dans le contexte des pathologies respiratoires, la voie i.v n'est pas optimale pour que les Ac atteignent leur cible dans les poumons. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont donc nécessaires pour améliorer l'administration et in fine l'efficacité des Ac. Nos travaux antérieurs ont permis de démontrer que la voie pulmonaire permettait, pour les Ac entiers, d'obtenir une réponse thérapeutique efficace dans différents modèles animaux de pathologies respiratoires. Néanmoins, nos données préliminaires suggèrent que la voie pulmonaire serait associée à une immunogénicité accrue. Cette immunogénicité qui se caractérise par le développement d'anticorps contre les Ac thérapeutiques (anti-anticorps ou ADA), pourrait altérer le profil pharmacocinétique et l'efficacité des Ac, ce qui est particulièrement préjudiciable, notamment dans le cadre d'une administration répétée. Des études précliniques solides sont donc nécessaires pour mieux comprendre l'immunogénicité de la voie pulmonaire pour les anticorps thérapeutiques et la comparer à celles d'autres voies d'administration.

Pour notre projet, nous utiliserons un anticorps anti-infectieux dirigé contre la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (PsA), responsables d'infections pulmonaires, et nous nous attacherons à comparer l'administration par voie pulmonaire à la voie intraveineuse (i.v). Nous évaluerons l'immunogénicité, le profil pharmacocinétique et l'efficacité thérapeutique selon ces deux voies d'administrations. Le projet fait intervenir 5 procédures et un total de 8400 animaux sur 5 ans.

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

Remplacer : les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme entier, face à l'administration de thérapeutiques et l'impact de la voie d'administration. Ils sont aussi insuffisants pour envisager des essais cliniques chez l'Homme. Les modèles murins d'infection pulmonaire à PsA sont bien décrits et permettent de mimer le phénomène observé chez l'Homme.

Réduire : le modèle d'infection à PsA est maîtrisé par l'équipe et le porteur de ce projet, ce qui permet de limiter les étapes de mises au point. De plus, les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. La souris est l'espèce modèle la plus adaptée pour ces études précliniques et le couple modèle infectieux immunocompétent-anticorps thérapeutique de la même espèce permettent d'envisager des études d'immunogénicité pertinentes.

Raffiner : les souris seront élevées en communauté dans des cages comprenant des éléments d'enrichissement (sous la forme de papier, de fragments de boîte à œuf ou de tunnels en PVC). L'ensemble des procédures sera réalisée de manière à limiter la souffrance des animaux (anesthésie,...).

5208. L'utilisation d'agents de contraste iodés à des fins d'imagerie ont permis le développement de techniques chirurgicales courantes tel que comme l'angioplastie coronaire. Généralement bien tolérés, ils peuvent toutefois causer des complications rénales sévères particulièrement chez les sujets présentant une insuffisance rénale chronique. Ces complications sont rassemblées sous le terme de néphropathie de contraste (en anglais contrast-induced acute kidney injury, CIAKI).

L'incidence de CIAKI s'élève à 7% chez les patients ayant une fonction rénale normale mais peut monter jusqu'à 20-30% chez les patients ayant des niveaux de créatinine supérieurs à 2mg/dL avant intervention. La CIAKI est associée à un allongement significatif de la durée d'hospitalisation, à une augmentation du risque d'avoir recours à une dialyse voire même à une augmentation la mortalité post-intervention.

Les propriétés vasoconstrictrices des produits de contraste entraînent une ischémie rénale, affectant principalement la zone cortico-médullaire. De plus les produits de contrastes présentent une toxicité directe, affectant les cellules endothéliales, les tubules rénaux, les érythrocytes et augmentant le recrutement de leucocytes, causant un déclin, parfois irréversible, de la fonction rénale.

Des données expérimentales chez l'animal et des données cliniques chez l'homme suggèrent un effet bénéfique des bloqueurs du récepteur minéralocorticoïde (RM) au cours de l'ischémie reperfusion dans plusieurs organes, notamment le rein. Le mécanisme de cet effet demeure largement inconnu. Cependant il a été démontré par notre laboratoire que les bloqueurs du RM permettent de réduire la vasoconstriction survenant lors de l'ischémie rénale aiguë et réduisant ainsi les lésions tissulaires et préservant la fonction rénale, faisant des bloqueurs de RM des agents thérapeutiques pouvant potentiellement réduire le risque de développer une CIAKI. Selon cette hypothèse les antagonistes du RM pourraient prévenir les lésions rénales causées par l'administration de produits de contraste. Plus précisément, nous souhaiterions déterminer si les RM présent sur les cellules endothéliales, musculaire lisse et inflammatoires sont impliqués dans les effets délétères de la néphropathie de contraste.

Nous utiliserons deux approches. La première consistera à utiliser un antagoniste du RM nonstéroïdien, la Spironolactone, chez des animaux WT afin de déterminer les effets des RM en tant que médication. La seconde, consistera mesurer les effets des produits de contraste dans les reins de souris transgéniques invalidées pour le récepteur minéralocorticoïde dans le muscle lisse, les macrophages et l'endothélium vasculaire afin de disséquer les implications physiologiques des RM dans la CIAKI.

Les lésions rénales induites par la CIAKI peuvent avoir des effets aigus (à court terme) et chroniques (à long terme). C'est pourquoi nous prévoyons d'effectuer deux séries d'expériences. Dans la première, les souris seront sacrifiées le lendemain de l'induction de la CIAKI. Alors que dans la seconde, elles seront maintenues en vie pendant 30 jours avant d'être sacrifiées.

Modèle utilisé : Induction de la néphropathie de contraste conformément aux protocoles décrits dans la littérature, les animaux seront dans un premier temps sensibilisés comme suit : après 16h de restriction hydrique, ils se verront injectés 10mg/kg d'indométacine et de LNAME. Suivit 15 minutes plus tard de 6g d'iode/kg de produit de contraste (iohexol).

Animaux utilisés :

1. Evaluation de l'efficacité des bloqueurs du RM (spironolactone) en tant que traitement prophylactique et curatif de la CIAKI. 4 groupes seront nécessaires (contrôle, contrôle + sensibilisation, sensibilisation + produit de contraste, sensibilisation + produit de contraste + spironolactone).

160 souris.

2. Effet de la spironolactone sur l'hémodynamique rénale. 4 groupes de 6 rats (contrôle, contrôle + sensibilisation, sensibilisation + produit de contraste, sensibilisation + produit de contraste + spironolactone).

96 rats.

3. Evaluation de l'implication du RM présents sur les macrophages, cellules endothéliales et/ou musculaires lisses et dans la réponse physiologique à la CIAKI.

6 groupes seront nécessaires pour chaque souche de souris transgéniques (littermates contrôles, littermates + sensibilisation rénale, OGM contrôles, OGM + sensibilisation rénale, littermates + sensibilisation rénale + produit de contraste, OGM + sensibilisation rénale + produit de contraste).

480 souris

Mise en œuvre du raffinement (principe des 3R) :

- Nombre d'animaux contenu à 10 par groupe

- Enrichissement

- Nos modèles de souris intéressent d'autres équipes qui travaillent sur des sujets de recherche différents et qui pourront étudier l'impact du MR sur d'autres organes que nous n'allons pas étudier

Nous espérons que les résultats de ces travaux seront le préalable à des études cliniques au cours desquelles les antagonistes du RM seront utilisés, notamment lors d'interventions coronarienne percutanées.

5209. Au cours des dernières décennies, la résection et la transplantation hépatique ont été largement adoptées pour le traitement de maladies hépatiques. Ces actes chirurgicaux impliquent d'interrompre le flux sanguin irrigant le foie (phase d'ischémie) avant de le rétablir (phase de reperfusion). L'interruption et le rétablissement de la circulation sanguine conduit à une sous-oxygénation des tissus causant des lésions par différents mécanismes tels que le stress oxydatif, dysfonction de la micro-vasculature ou encore l'accumulation de calcium. Chacun pouvant avoir des effets délétères directs sur les cellules hépatiques ou participer au développement d'un phénotype inflammatoire massif (dans lequel les macrophages jouent un rôle prépondérant). Certains de ces mécanismes délétères dans l'I/R hépatique sont également actifs dans l'I/R rénale. A ce titre il est intéressant de noter que des données récentes suggèrent un effet bénéfique des bloqueurs du récepteur minéralocorticoïde (RM) au cours de l'ischémie reperfusion dans plusieurs organes, notamment le rein. Le mécanisme de cet effet demeure largement inconnu. Cependant il a été démontré par notre laboratoire que les bloqueurs du RM permettent de réduire la vasoconstriction survenant lors de l'ischémie rénale aiguë et réduisant ainsi les lésions tissulaires et préservant la fonction rénale. L'objet de cette étude sera donc d'évaluer les effets des bloqueurs de RM dans l'I/R hépatique.

Pour ce faire nous induirons des lésions hépatiques en appliquant un modèle d'I/R. Afin de produire des lésions reproductibles, une maîtrise suffisante du modèle est nécessaire. Après une période de mise au point du protocole expérimental, nous allons évaluer l'effet de l'administration d'antagonistes du RM (en tant que traitement prophylactique et curatif) sur la fonction et l'intégrité hépatique (vs un traitement contrôle) après I/R. Dans un second temps, nous allons disséquer les effets du RM présent sur les cellules endothéliales, musculaire lisse et inflammatoires dans la réponse physiologique du foie soumis à l'I/R.

Les lésions hépatiques induites par l'I/R peuvent avoir des effets aigus (à court terme) et chroniques (à long terme). C'est pourquoi nous prévoyons d'effectuer deux séries d'expériences. Dans la première, les souris seront sacrifiées le lendemain de la chirurgie. Alors que dans la seconde, elles seront maintenues en vie pendant 30 jours avant d'être sacrifiées.

Ce projet de recherche se déroulera en 4 phases :

1. Mise au point du modèle (et technique de chirurgie). Différentes techniques et durées d'ischémie seront testées ainsi que différentes durées de reperfusion. Une fois la meilleure combinaison trouvée, elle sera reproduite 3 fois afin d'en tester la reproductibilité.

Le modèle sera considéré comme au point lorsqu'il nous permettra d'induire des élévations hépatiques de manière reproductible.

Total 120 souris.

2. Evaluation de l'efficacité des bloqueurs du RM (spironolactone) en tant que traitement prophylactique et curatif de l'I/R hépatique.

Des souris WT seront traitées à la spironolactone avant et après avoir été soumise à l'I/R hépatique. Les effets sur les fonctions hépatique seront évalués 24h et 30jours après la chirurgie.

Total 160 souris.

3. Evaluation de l'efficacité des bloqueurs du RM (spironolactone) sur l'hémodynamique hépatique. L'hémodynamique hépatique sera mesurée chez des rats traités à la spironolactone et soumis à l'I/R hépatique.

Total : 96 rats

4. Evaluation de l'effet du RM des cellules endothéliales, musculaires lisses et macrophages dans la réponse physiologique du foie souris l'I/R. L'I/R hépatique sera appliqué à des souris transgéniques n'exprimant pas le RM dans les macrophages, les cellules endothéliales et/ou musculaires lisses.

Total 320 souris

Mise en œuvre pratique du raffinement (principe des 3R) :

- Les chirurgies se feront sous anesthésie générale.

- Utilisation systématique d'analgésie post opératoire

- Enrichissement

La phase de mise au point permet par la suite de réduire la taille des groupes expérimentaux (un modèle au point et maîtrisé permet d'obtenir une variation réduite au sein d'un même groupe). Par ailleurs, dans le cadre de la réduction, nos modèles de souris intéressent d'autres équipes qui travaillent sur des sujets de recherche différents et qui pourront étudier l'impact du MR sur d'autres organes que nous n'allons pas étudier.

Nous espérons que les résultats de ces travaux seront le préalable à des études cliniques au cours desquelles les antagonistes du RM seront utilisés, notamment lors d'interventions chirurgicales.

5210. Les vitamines B9 et B12 (donneurs de méthyles) jouent un rôle essentiel dans la production du matériel génétique (ADN, ARN) et des acides aminés nécessaires à la croissance cellulaire, ce qui explique leur caractère indispensable aux cours du développement. Elles sont importantes pour la formation des globules rouges, le fonctionnement du système nerveux (synthèse de neuromédiateurs) et du système immunitaire. Elles sont nécessaires à la production de nouvelles cellules, ce qui les rend particulièrement importantes durant les périodes d'activité métabolique intense comme la grossesse (développement du fœtus), l'enfance et l'adolescence. Des observations faites en 1986 ont montré que les individus nés avec un petit poids de naissance ont un taux de mortalité cardiovasculaire plus élevé une fois atteint l'âge adulte. Cela a abouti à une théorie qui postule qu'une carence protéique pourrait agir durant les phases précoces de la vie et définir en partie le risque d'avoir une maladie chronique à l'âge adulte. De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence une relation entre des événements pathologiques durant la grossesse et le développement, plus tard au cours de la vie, de maladies chroniques et métaboliques comme l'obésité et ses complications (stéatose hépatique « foie gras »). A condition d'une exposition particulière (sédentarité, régime gras, exposition à toxines, etc.). Ce phénomène porte le nom de « programmation fœtale ».

Une carence en vitamines B9 et B12 aboutit donc à un petit poids à la naissance et une obésité plus importante si les animaux sont soumis à un régime gras. Nous voulons tester l'hypothèse d'une programmation fœtale avec la question suivante : la combinaison de la carence précoce en donneurs de méthyles, surnutrition et exposition à toxines dans la vie adulte provoque-t-elle une majoration des altérations métaboliques dans différents organes?

1. Remplacement : Il n'existe aucune alternative d'approche in vitro car notre étude porte sur le développement et le vieillissement des individus dans des conditions de nutrition et exposition à toxines bien précises.

2. Réduction : notre étude portera sur 325 rats de laboratoire (105 géniteurs et 140 à 180 descendants, selon le nombre de naissances) répartis en 8 groupes d'études. Au final, ce seront 220 rats (maximum) qui risquent de subir les effets nocifs de ces traitements, et donc qui entreront dans le cadre de cette saisine. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum, à savoir 10 animaux par groupe à chaque étape, permettant ainsi l'interprétation scientifique des résultats par des tests statistiques appropriés.

3. Raffinement : Nous commençons chaque procédure expérimentale par une période d'acclimatation de 2 semaines à ce nouvel environnement. L'exposition aux toxines sera le minimum indispensable selon les données de la littérature : les animaux issus des portées et inclus dans le protocole d'étude seront traités par injection intra-péritonéale une fois par semaine à partir du 60^{ème} jour de vie, jusqu'à 180 jours où ils seront mis à mort selon les conditions réglementaires. Les animaux sont surveillés quotidiennement et une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place. Le point limite est fixé à 20% de perte du poids corporel (chez les adultes) avec repérage des signes de mal-être définis au préalable par notre vétérinaire référent. Afin d'évaluer les effets du changement de la flore intestinale produite par l'injection de toxines, les animaux seront placés temporairement dans de cages dites métaboliques 1 fois par mois à partir du 60^{ème} jour de vie, jusqu'à 180 jours. En fin de protocole les animaux seront euthanasiés et des prélèvements seront effectués (sang, cerveau, foie, cœur, estomac, intestin, graisses viscérales) pour permettre des analyses biochimiques et établir les changements métaboliques dans chaque organe.

5211. Le système noradrénergique permet la modulation de l'activité d'un grand nombre de neurones et est impliqué dans des fonctions les plus diverses depuis le contrôle de la pression artérielle, les mécanismes de l'attention, du cycle veille/sommeil, jusqu'à la plasticité cérébrale. C'est également la cible de plusieurs drogues ou de médicaments.

L'objectif de cet atelier est de former les étudiants à des techniques de biologie moléculaire pour répondre à une question scientifique propre aux Neurosciences. Il constitue une partie essentielle de leur formation de Master.

Dans la mesure du possible, le remplacement des animaux par des méthodes alternatives (modèles mathématiques, méthodes in vitro..) est préféré. Toutefois, vue la nature de la formation délivrée aux étudiants, l'utilisation de rongeurs reste nécessaire. Le nombre d'animaux a été ajusté au mieux, chaque binôme utilisant du tissu prélevé de deux rats (un rat témoin et un rat expérimental), et un rat fournit des échantillons à 5 binômes. Ainsi 10 rats au maximum sont utilisés tous les ans pour 40 étudiants, soit 50 rats pour la durée du projet. Les expérimentations sont menées sous le contrôle de formateurs expérimentés dans le respect des règles de l'expérimentation animale, en particulier de la règle des 3R.

Le raffinement des méthodes expérimentales afin de réduire au maximum la souffrance animale est mis en œuvre grâce à l'utilisation de points limites clairement établis. L'ensemble des expériences est mené par des personnels qualifiés, dans des locaux d'hébergement respectant les standards en vigueur (enrichissement partiel des cages par du nid végétal et des copeaux de bois, par exemple).

5212. L'objectif de cette étude est d'évaluer in vivo chez la souris, le potentiel de minéralisation et de transduction de gènes de la minéralisation induite par un biomatériau à base phospho-calcique (brushite) dans le cadre de la mise en place d'implants dent/matériau.

Ces implants permettront d'évaluer l'aptitude de ce biomatériau à recruter des cellules progénitrices selon le concept du « cell homing » dans le but de réorganiser un tissu biologique au sein de la dent traitée en remplacement du matériau qui disparaîtra sous l'effet de la résorption.

Afin de respecter au mieux la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer), nos études préliminaires ont été réalisées in vitro (remplacer) et elles ont permis de montrer l'aptitude biomimétique de la brushite. Nos investigations in vitro ont donc montré une capacité de ce matériau à stimuler la minéralisation. La poursuite de ce travail nécessite de tester ce matériau en conditions physiologiques.

Ces investigations imposent une expérimentation animale afin de confirmer les résultats obtenus in vitro et d'évaluer l'aptitude de ce matériau à recruter des cellules progénitrices de la voie circulante. Le modèle murin immunodéficient est le plus adapté pour cette étude. Afin de respecter au mieux la règle des 3R, et réduire le nombre d'animaux, nous avons choisi de réaliser le traitement expérimental et le traitement contrôle sur le même animal (deux implants seront placés chez le même animal), permettant ainsi de diminuer par deux le nombre d'animaux incubateurs.

Dans le but d'améliorer (raffiner) la procédure expérimentale pour anticiper l'apparition de douleurs post opératoires possibles après ce type de traitement, l'utilisation d'antalgique sera prévue. Cette étude portera sur 10 souris immunodéficientes (nombre minimum d'animaux nécessaire pour que l'analyse soit menée de manière statistiquement significative). Nous aurons 2 lots de 5 animaux soit 10 animaux immunodéficients. Un groupe sera sacrifié à 5 semaines et le deuxième à 11 semaines. Puis les coupes de dents seront analysées en histologie avec des colorations histochimiques et histoenzymologiques et en immunohistochimie puis au microscope électronique à balayage et/ou en microscopie confocale pour déterminer la nature du tissu à l'intérieur des coupes de dents, et par qPCR.

Si les résultats obtenus in vivo avec la Brushite confirment l'effet biomimétique observé in vitro, ce matériau déjà commercialisé en tant que substitut osseux, pourra alors voir ses domaines d'indications étendues à des situations cliniques (procédures endodontiques régénératives) qui tendent à devenir un véritable problème de santé publique.

5213. L'alimentation des vaches laitières conduit aujourd'hui à utiliser des quantités importantes (près de 3 millions de tonnes en France chaque année) de compléments protéiques comme les tourteaux d'oléagineux ou les graines de protéagineux. Ces ressources sont aujourd'hui largement importées et la réduction de leur utilisation est un enjeu de durabilité de l'élevage. Les études sur l'environnement montrent également tout l'intérêt qu'il y a à réduire leur utilisation et à accroître l'autonomie protéique des territoires d'élevage. Ce travail expérimental a donc pour objectif d'essayer de mettre au point et à évaluer de nouvelles technologies de traitement des compléments protéiques pour accroître leur valeur alimentaire. Les hypothèses sous-jacentes reposent sur l'exploitation des propriétés de transit digestif des aliments pour améliorer cette valeur alimentaire et sur la meilleure connaissance de l'efficacité d'utilisation des protéines pour améliorer et évaluer ces aliments protéiques. Ces traitements doivent contribuer à améliorer cette valeur alimentaire sans risques pour l'animal ni pour le consommateur tout en réduisant l'utilisation de ces intrants et les rejets azotés associés. Ces travaux doivent donc conduire à mener des essais de digestion et d'alimentation sur des vaches laitières en production, représentatives de celles rencontrées dans les élevages aujourd'hui. Au total, 42 vaches laitières en lactation seront nécessaires pour ces travaux. En améliorant l'efficacité digestive des aliments, les rations de vaches laitières pourraient demain utiliser moins de compléments protéiques et les vaches devraient rejeter moins d'azote dans l'urine, réduisant ainsi les risques de pertes vers l'air (ammoniac et protoxyde d'azote) et vers l'eau (nitrates).

Ces travaux obligent cependant à utiliser des expérimentations in vivo car les solutions de protection envisagées sont systémiques (action sur les fermentations ruminales, transit des particules alimentaires) et reposent sur la digestion très complexe des ruminants qu'il n'est pour l'instant pas possible de mesurer avec des techniques de laboratoire. Les essais seront menés en carré latin pour que l'animal soit son propre témoin et pour réduire le plus possible le nombre d'animaux en gardant une puissance statistique suffisante pour montrer l'efficacité des méthodes de traitement des aliments. Une expérimentation vise à évaluer les valeurs des aliments de manière totalement non invasive, contrairement aux méthodes de référence actuelles, dans des conditions de conduite proche de celle d'un élevage classique via la mesure de l'efficacité protéique, ce qui constitue un raffinement important de ce domaine si la méthodologie expérimentée s'avère performante.

5214. Cette étude a pour but de valider l'existence d'une empreinte sensorielle alimentaire chez le nouveau-né, par le biais de l'alimentation maternelle durant la gestation et l'allaitement, et de mettre en évidence son influence sur la prise alimentaire et les performances zootechniques de porcelets en croissance. L'hypothèse est qu'un continuum sensoriel (ex : goût et odeur) entre ce qui est perçu par le fœtus dans le liquide amniotique, par le nouveau-né lors de la consommation du lait maternel, puis par le jeune animal dans son alimentation solide peut accroître le bien-être et la consommation alimentaire. Deux additifs sensoriels alimentaires seront utilisés dans cette étude et ajoutés à l'alimentation des truies gestantes/allaitantes (N=40) et/ou à l'alimentation des porcelets (N=160). Trois groupes de truies seront constitués : groupe contrôle (C), groupe additif 1 (FA1), groupe additif 2 (FA2). Quatre porcelets par portée seront conservés de manière à constituer huit groupes de 20 porcelets afin de croiser l'expérience sensorielle périnatale (via le régime maternel) avec l'expérience sensorielle post-sevrage : C/C (animaux issus de mères C et nourris avec aliment contrôle C) ; C/S (animaux issus de mères C et nourris avec aliment contrôle + édulcorant S) ; C/FA1/S (animaux issus de mères C et nourris avec aliment FA1 + édulcorant S) ; C/FA2/S (animaux issus de mères C et nourris avec aliment FA2 + édulcorant S) ; FA1/S (animaux issus de mères FA1 et nourris avec aliment contrôle + édulcorant S) ;

FA1/FA1/S (animaux issus de mères FA1 et nourris avec aliment FA1 + édulcorant S) ; FA2/S (animaux issus de mères FA2 et nourris avec aliment contrôle + édulcorant S) ; FA2/FA2/S (animaux issus de mères FA2 et nourris avec aliment FA2 + édulcorant S). Des prélèvements de lait (60 mL) seront réalisés sur les mères à J1 (J0 étant le jour de mise-bas), à J14 et J28, le matin après une injection de 1-2 mL d'ocytocine. Ces prélèvements seront analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) pour identifier la présence de composés actifs des additifs alimentaires dans le lait maternel et valider l'existence d'une transition sensorielle entre la période in utero et la période d'allaitement. La consommation alimentaire des porcelets, leur gain de poids et leur efficacité alimentaire seront calculés pour chaque semaine de J0 à J160, de manière à mettre en évidence les effets croisés des expositions sensorielles périnatales et post-sevrage sur les performances zootechniques des animaux. Concernant la règle des 3R, l'objectif finalisé étant d'accroître les transitions alimentaires chez le porcelet pour favoriser son bien-être et sa croissance, cette étude ne peut être réalisée que sur l'espèce animale concernée, le porc. Il n'est donc pas possible de remplacer l'animal cible par une autre espèce (e.g. rongeur) ou technique d'investigation (ex : in vitro ou silico) (REMPLENER). Nous avons calculé les effectifs de manière à garantir une fiabilité statistique suffisante tout en réduisant au mieux le nombre d'animaux au vu des variables étudiées (REDUIRE, 20 porcelets par groupe). En termes de raffinement, la technique GC-MS choisie pour les analyses de lait est le standard reconnu pour le genre de dosage prévu (RAFFINER).

5215. Actuellement, les avancées de la recherche sur les conséquences de stress fœtal montrent que ce stress laisse des traces durables sur le cerveau en développement qui affectent le développement psycho-moteur et affectif. Les mécanismes de conservation de ces traces restent à ce jour inconnus. L'altération du processus de développement pourrait être à l'origine de nombreuses maladies neurologiques et psychiatriques.

Pour comprendre ces mécanismes, l'interaction de trois facteurs est importante à considérer : le programme du développement neurologique, les facteurs de réponses au stress et la mise en évidence des événements épigénétiques (modification du patrimoine génétique par l'environnement). Les facteurs de choc thermique (HSF pour Heat Shock factor) répondent à cette interaction. Les HSFs déclenchent l'expression des gènes répondant au choc thermique et protègent en cas de fièvre ou d'agressions neuronales. Ils sont impliqués dans des processus épigénétiques et tiennent également des rôles physiologiques cruciaux dans le développement normal du cerveau et de son intégrité.

Ce programme est une collaboration avec un laboratoire ayant reçu une autorisation du Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche.

Dans ce projet, nous nous intéressons au stress induit par l'alcoolisation fœtale et l'implication de la protéine HSF2 dans la réponse à ce stress. Pour cela, nous utilisons des souris dépourvues de HSF2 (HSF2KO). Ces souris sont obtenues par invalidation du gène HSF2 (modèle knock-out). Les conséquences physiologiques, motrices et cognitives sont étudiées dès la naissance.

Notre hypothèse est que ce stress d'alcoolisation fœtale perturbe le développement normal du cerveau. Le fœtus naîtrait ou développerait précocement des troubles psychomoteurs et/ou affectifs.

Ce projet se déroule sur quatre années et prévoit d'utiliser 5 procédures expérimentales. Pour réduire le nombre de souris utilisées, nous effectuerons le bilan physiologique et le bilan moteur sur les mêmes portées (procédures 1 et 3), le bilan cognitif sur deux âges et sur les mêmes portées (procédures 2 et 4). La procédure d'alcoolisation fœtale est la même et a déjà été approuvée et publiée. Nous estimons un effectif total de 520 souris. Les techniques utilisées sont non invasives. La durée de séparation maternelle occasionnée par les mesures n'excède pas une heure. L'euthanasie est précédée d'anesthésie.

Les variables mesurées sont comparées par une analyse de variance avec mesures répétées (ANOVA) entre les différents groupes (traitement, génotype, âge)

Toutes les données sont analysées en aveugle, les groupes sont identifiés a posteriori de l'analyse statistique. Le nombre d'animaux par lot devra être de 25 environ afin d'obtenir une valeur statistique adéquate.

Les retombées de ce travail sont directement utiles en termes de prévention et d'implications thérapeutiques.

5216. Notre projet de recherche porte sur de nombreux petits ARN non-codant (ARNnc) appartenant à la famille des snoARN C/D et des microARN. Ces ARNnc régulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel via des appariements de base avec d'autres ARN cellulaires: les snoARN C/D introduisent des modifications chimiques sur des positions nucléotidiques précises (ajout d'un groupe méthyle en 2'-O-ribose) alors que les microARN bloquent la traduction des ARNm.

Dans le cadre de cette demande, nous proposons d'étudier un modèle murin «perte-de-fonction» (souris Knock-Out, KO) généré par le système innovant CRISPR/Cas9, pour une portion du génome de la souris qui héberge deux groupes de snoARN C/D - SNORD115 et SNORD116. La contrepartie humaine de ce locus est positionnée dans un intervalle cytogénétique (15q11q13) lié au syndrome de Prader-Willi, une maladie rare associée à de graves troubles de comportement (hyperphagie) conduisant le plus souvent à de nombreux dysfonctionnements métaboliques dont une obésité morbide. Fait remarquable, de récents travaux laissent entendre que la perte d'expression des snoARN C/D au locus 15q11q13—particulièrement SNORD116 mais aussi vraisemblablement SNORD115—joue un rôle crucial dans l'apparition de nombreux traits cliniques liés à cette maladie.

Nos travaux de recherche fondamentale permettront de disséquer la fonction moléculaire et physiologique du SNORD115, mais aussi contribueront vraisemblablement à améliorer notre compréhension de l'étiologie du syndrome de Prader-Willi.

Au cours de notre programme de recherche qui porte sur un total estimé de 250 souris, nous veillerons en permanence à réduire le nombre d'animaux étudiés en respectant l'esprit de la règle des 3Rs (Réduire, Raffiner, Remplacer). Nous prélèverons et archiverons un maximum de tissus à partir d'un même individu, et ce, en prévision de futures expériences. Une lignée non utilisée sera congelée. En ce qui concerne l'étude comportementale, les individus seront réutilisés puisque les tests envisagés ne sont pas considérés comme invasifs. En d'autres termes, un individu va successivement passer plusieurs tests selon une séquence

déterminée. Des séances de «handling» avec l'expérimentateur et de familiarisation des dispositifs expérimentaux seront réalisées systématiquement afin de réduire le stress de l'animal. Les tests de comportement envisagés sont bien caractérisés dans le fond génétique C57BL/6J, et ceci participe à la réduction de la taille des cohortes analysées. Le caractère ouvert et exploratoire de notre recherche ne permet pas d'anticiper les phénotypes des souris KO générées. Cependant, nous limiterons le nombre des animaux étudiés en fonction de la pénétrance des phénotypes et de leurs reproductibilités. Si les questions scientifiques le permettent, nous privilégierons des modèles cellulaires *in vitro* tels que la culture primaire de neurones embryonnaires (hippocampes, hypothalamus, cortex).

5217. Chez les mammifères, la glycémie est maintenue entre deux repas ou au cours d'un jeûne par la production endogène de glucose réalisée par le foie, le rein et l'intestin. La régulation de cette fonction nécessite une coordination entre les organes producteurs de glucose et consommateurs de glucose.

Le but de ce projet est d'étudier le rôle de la production de glucose par les reins dans le maintien de l'homéostasie glucidique pendant les périodes de jeûne ou en réponse à une hypoglycémie. L'hypoglycémie est une des complications les plus sévères développée chez les patients diabétiques suite à l'injection d'insuline.

Un modèle de souris unique et viable ne produisant plus de glucose par les reins a récemment été obtenu par transgénèse. Le maintien de la glycémie chez ces souris, même au cours d'un jeûne prolongé, peut être expliqué par une augmentation de la production de glucose par le foie. Ce maintien de la glycémie est donc lié à une communication rein-foie, probablement par un signal circulant.

L'inhibition de la production rénale de glucose est également parallèle à une diminution plasmatique du calcitriol, forme active de la vitamine D. Cette activation est réalisée dans le rein à partir de son précurseur. La vitamine D est connue pour contrôler le métabolisme du glucose.

Notre hypothèse est que la production rénale de glucose régule la glycémie au cours du jeûne en contrôlant le taux plasmatique de vitamine D active.

Ce projet a été élaboré en accord avec les 3R :

La régulation de la glycémie fait intervenir l'ensemble des organes et un système de détection central du taux de glucose dans le sang. L'intégration de ces signaux permet d'induire la production endogène de glucose en cas d'hypoglycémie. Ce projet sera donc réalisé *in vivo* dans des modèles de souris transgéniques invalidées pour la production rénale de glucose.

La réduction du nombre d'animaux a été réalisée tout en permettant au projet d'obtenir le nombre suffisant de données pour répondre à la problématique. Le nombre total d'animaux a été calculé au plus juste à partir de nos connaissances sur le métabolisme glucidique et sera limité à 64 souris sur une période d'étude d'un an.

Concernant le raffinement, des procédures analgésiques et des suivis cliniques ont été intégrés au protocole expérimental permettant de suivre et de prévenir tout signe de mal-être chez l'animal. Les animaux seront élevés par groupe de 4 dans un environnement enrichi pour favoriser la nidation et seront suivis quotidiennement. Le comportement des animaux sera contrôlé régulièrement au cours des périodes de mise à jeun. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever les organes d'intérêt.

En conclusion, ces expériences réalisées *in vivo* chez la souris pourront permettre de mieux comprendre le rôle de la production de glucose par les reins pour le maintien de la glycémie en situations physiopathologiques.

5218. Le cancer colorectal (CCR) est le 3^{ième} cancer le plus fréquent. Seule la moitié des patients sont encore vivants 5 ans après diagnostic. Une meilleure connaissance de la carcinogenèse colorectale, du développement des tumeurs primaires à l'établissement de leurs métastases, est nécessaire pour trouver de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques. Les cellules tumorales collaborent avec leur microenvironnement et modulent l'immunité afin de persister et se développer. La glycosylation des cellules tumorales reconnue par les lectines micro-environnementales jouent un rôle clef dans ces processus biologiques. Notre objectif est d'étudier le rôle des lectines immunitaires des macrophages dans la reconnaissance des cellules tumorales d'origine colorectale et l'impact sur le développement de la tumeur. Or, dans le cas du CCR, aucun modèle transgénique murin n'est relevant de la pathologie humaine, les souris développant les tumeurs au niveau intestinal et non colorectal. Ainsi les modèles précliniques décrits ici, reposant sur l'utilisation de lignées colorectales épithéliales murines greffés chez la souris, nous permettront de caractériser la collaboration entre les cellules tumorales et leur microenvironnement, en particulier les macrophages, et d'évaluer *in-vivo* le rôle des lectines macrophagiques dans la rejet ou l'établissement de la tumeur. Nous utiliserons 648 souris pour ce projet. L'évolution du cancer dans les modèles précliniques sera suivie par des mesures des tumeurs sous-cutanées (à l'aide d'un caliper) et de l'imagerie *in vivo* par bioluminescence pour les tumeurs localisées en profondeur dans l'animal. Enfin, une attention particulière sera portée sur les conditions d'hébergement des animaux soumis au stress expérimental avec l'ajout de complément alimentaire riche et sucré en post-opératoire et des injections intrapéritonéales de sérum physiologique si une déshydratation est observée.

Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 4 étapes dans notre raisonnement. Tout d'abord, notre étude vise à mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires et interactions complexes avec le système immunitaire influençant le développement des tumeurs colorectales et les métastases. Le modèle d'étude doit nécessairement refléter cette complexité impliquant plusieurs types cellulaires du microenvironnement entourant les cellules souches tumorales. Dans ce cadre, des expériences préliminaires *in vivo*, réalisées par nos collaborateurs, ont fourni des données suffisamment prometteuses pour valider l'utilisation du modèle murin. Ensuite, certaines étapes de nos projets (clairement identifiées dans les procédures détaillées) pourront en effet être suivies de décisions de poursuite ou d'arrêt de l'étude en fonction des promesses offertes par les résultats.

De plus, nous avons développé des approches expérimentales permettant d'analyser sur un même lot d'animaux, des paramètres qui étaient avant mesurés sur des lots d'animaux séparés (exemple : préparation d'ARN, cytométrie de flux, peuvent maintenant être réalisées sur le même échantillon).

Enfin, les expériences réalisées par nos collaborateurs dans les années précédentes, nous ont fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir en première intention des résultats statistiquement significatifs.

La souffrance et/ou le stress animal sont présents à trois niveaux dans nos expériences : i) lors de l'implantation de la tumeur en sous-cutanée ou dans le colon ; ii) lors de l'inflammation induite par la tumeur et iii) lors de l'injection de luciférine nécessaire pour l'imagerie in vivo. Ces trois niveaux de douleurs font l'objet d'une prise en charge spécifique indiquée dans les procédures respectives et déjà appliquées dans nos projets antérieurs.

5219. Le méthane est un puissant gaz à effet de serre qui contribue au niveau mondial pour 39% aux émissions de gaz à effet de serre liées à l'élevage (FAO, 2013). L'essentiel du méthane (80% environ) provient des fermentations entériques par les ruminants. Ce dernier représente en outre une perte moyenne de 7 % de l'énergie ingérée par l'animal. Il est donc très important, dans un souci de protection de l'environnement, de trouver des moyens de réduire les émissions de méthane entérique dans l'ensemble des pays du monde. Parmi les voies possibles, les plantes riches en tanins sont envisagées mais leur exploration est encore insuffisante.

Cet essai vise à évaluer l'intérêt de plantes tropicales riches en tanins pour réduire les émissions de méthane, par une méthode in sacco. La méthode in sacco consiste à incuber dans le rumen des animaux ruminants des sachets de dacron contenant les fourrages à étudier, grâce à la présence d'une canule du rumen. L'incubation dure de 3 à 96 h, et permet de réaliser une cinétique de dégradation des fourrages, qui estime leur digestibilité sans recourir à une mesure in vivo, et d'analyser la composition du fourrage avant et après incubation. Elle est réalisée sur vaches, ce qui permet d'introduire simultanément un grand nombre de sachets dans le rumen et donc de limiter le nombre d'animaux expérimentaux et la durée de l'expérience.

Dans cet essai nous comparerons au maximum 8 fourrages riches en tanins condensés, en tanins hydrolysables ou en ces deux catégories de tanins, afin de différencier l'effet de chacun d'eux, ce qui n'a jamais été réalisé jusqu'à présent. La retenue sera un essai in sacco et mobilisera 3 vaches porteuses de canules ruminales, au printemps 2017.

5220. Lors de la pose d'implants sous forme polymérique ou métallique, il y a toujours un risque de rejet car ils sont reconnus comme corps étranger par le système immunitaire de l'hôte. En effet l'introduction d'un corps étranger engendre une réaction inflammatoire et si cette dernière n'est pas contrôlée elle peut devenir excessive voir chronique et cela peut aboutir au rejet de l'implant. L'échec d'implantation a des répercussions tout d'abord au niveau de la qualité de vie des patients et ensuite au niveau socio-économique car ces rejets impliquent des surcoûts en terme d'hospitalisation et de chirurgies itératives. Nous avons développé des revêtements à appliquer directement à la surface des implants visant à contrôler la réponse inflammatoire et favoriser la phase de cicatrisation pour éviter les risques de rejet d'implant. Ce projet comprend une première phase d'expérimentation animale sur le modèle de la souris permettant de tester l'implantation en sous-cutanée d'implant en silicone avec à leur surface des revêtements immunomodulateur/anti-inflammatoire en matrice polymère et de mesurer la réponse inflammatoire induite localement. Ce projet de recherche médicale appliquée vise les objectifs suivants:

- Identifier la réaction immunitaire des implants en silicone

- Développer une nouvelle stratégie thérapeutique d'implantation personnalisée afin de contrôler le type de réaction immunitaire.

L'application de ces revêtements immunomodulateur/anti-inflammatoire sur des implants permettrait d'améliorer l'intégration des implants et ainsi de réduire la morbidité voire mortalité. Une analyse histologique et cytokinique de la réponse aux revêtements immunomodulateur, en comparaison à des groupes contrôles, seront réalisées pour valider ces implants. Ce projet est une première étude pour valider l'implantation chirurgicale et étudier la réponse inflammatoire locale. Il est donc prévu d'utiliser 110 souris. Nous veillons à appliquer la règle des 3R : (i) seul le modèle in vivo pertinent pour valider la pose d'implants (Remplacer), (ii) nous utilisons des tests statistiques non paramétriques spécialement conçus pour comparer des groupes de petits effectifs. Nos groupes expérimentaux sont donc de 8 animaux de même âge et même sexe (Réduire) et (iii) nous réduisons, et limitons au maximum l'inconfort, la douleur, pouvant être subie par les animaux durant ce projet. Le contact social entre les animaux est maintenu, un enrichissement du milieu est effectué et des mesures d'analgésie sont appliquées (Raffiner).

5221. Suite à un traumatisme (hémorragie, traumatisme crânien,...), un phénomène d'immunosuppression apparaît chez les personnes admises dans les services de réanimation aboutissant à une augmentation de la probabilité de survenue d'une infection secondaire comme une pneumopathie.

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sont les 2 bactéries fréquemment responsables de ces infections. Ces bactéries expriment différents systèmes de virulence qui affectent la réponse immunitaire de l'hôte et sont responsables des dommages tissulaires observés. *P. aeruginosa* possède un système de virulence appelé Système de Sécrétion de Type-III (SST3) qui consiste à l'injection de toxines bactériennes (exoenzymes) directement dans les cellules cibles de l'hôte aboutissant à la mort de ces dernières. *S. aureus*, de son côté, est capable de produire des toxines ; l' α -hémolysine et la leucocidine de Pantan-Valentine (PVL) ; responsables de la mort des cellules immunitaires ciblées. Au cours d'une infection bactérienne, une réponse de l'hôte se met en place avec le recrutement de cellules immunitaires ainsi que la production de molécules inflammatoires dans le but de contrer cette infection. Cette réponse doit être mesurée afin d'éliminer l'agent pathogène sans créer de lésions trop importantes dans l'organisme. Il a été découvert récemment une protéine, la cytokine interleukine-(IL)

22 qui joue un rôle primordial dans la régulation de la réponse inflammatoire et dans la protection des épithélia au cours des phénomènes inflammatoires ainsi qu'au cours des processus de cicatrisation et de réparation.

Le but de notre étude est :

- 1- d'évaluer le rôle de l'interleukine-22 dans un modèle de pneumonie aiguë chez la souris ;
- 2- d'évaluer l'impact des facteurs de virulence de *P. aeruginosa* et *S. aureus* sur la production et l'action de l'IL-22

Pour cela, 2168 souris Swiss femelles vont être utilisées. Après avoir induit une pneumopathie (infection des poumons), les poumons des souris sont prélevés afin de réaliser diverses analyses (bactériologiques et inflammatoires).

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'utilisation d'animaux pour l'évaluation du rôle de la cytokine IL-22 et de la protéine IL-22BP nous permettra d'appréhender son rôle dans son environnement complexe multicellulaire. Ce travail permettra d'isoler les cellules d'intérêt quant à l'action de ces protéines et servira de travail préparatoire pour des travaux impliquant de la culture cellulaire *in vitro* dans le futur. Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable et le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude.

5222. En élevage intensif, les volailles de chair sont soumises à des programmes lumineux avec une longue période de jour (18 h de lumière / 6h de nuit). Ces programmes augmentent le temps d'accès de ces animaux diurnes à la nourriture ce qui accélère leur croissance et augmente la productivité. Néanmoins, de tels programmes lumineux ont des effets délétères bien établis sur la santé des animaux. L'exposition continue à des jours longs apparaît comme une source potentielle de stress ; de tels programmes lumineux impactent donc négativement le bien-être de l'animal. D'ailleurs, de récentes études chez des mammifères démontrent que la photopériode modifie les comportements émotionnels, les comportements agressifs et les capacités cognitives des individus. De telles études sont inexistantes chez les oiseaux, qui sont pourtant très sensibles à la photopériode.

Notre projet a donc pour objectif de caractériser l'impact de la photopériode sur des comportements clés de l'adaptation de l'animal à son environnement. Pour nos expériences, nous utiliserons la caille japonaise. Tout d'abord la caille japonaise est phylogénétiquement très proche des espèces cibles d'élevage (volailles de chair). Ensuite, les effets de la photopériode chez la caille sont très bien connus : la caille est un modèle d'étude des mécanismes modulés par la photopériode depuis un demi-siècle.

Des cailles japonaises adultes seront élevées pendant 5 semaines dans 2 conditions de photopériode contrastées: (i) jours longs avec 16h de lumière et 8h de nuit, (ii) jours courts avec 8h de lumière et 16h de nuit. A l'issue des 5 semaines, divers comportements qui témoignent de la capacité d'adaptation des animaux seront évalués. Il s'agit essentiellement de caractériser les comportements émotionnels, la motivation sociale et les capacités cognitives. Nous disposons déjà de tests validés pour tous ces critères chez la caille japonaise. A l'issue de ces tests, des analyses seront faites sur les cerveaux des oiseaux. D'autres analyses seront également conduites pour apprécier le fonctionnement des structures impliquées dans les comportements étudiés.

Ce projet ne peut s'entreprendre que chez l'animal entier dans la mesure où il est impossible de remplacer la complexité des régulations physiologiques observées chez l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

Réduction : 60 cailles mâles seront requises ce qui constitue un nombre minimal compte tenu des aléas expérimentaux pour tester statistiquement l'hypothèse.

Raffinement : Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales d'alimentation, de soins. Des enrichissements seront même utilisés pour favoriser le bien-être des animaux. Par exemple des tapis au sol seront ajoutés dans les cages afin que les oiseaux puissent exprimer des comportements de confort comme les bains de poussière.

La photopériode est un facteur environnemental naturel pour bon nombre d'animaux dont les oiseaux et n'engendre donc aucun dommage.

5223. 1. Objectif du projet.

TLR3 est un récepteur de l'immunité innée, exprimé par des cellules immunitaires et épithéliales. Dans les cellules cancéreuses qui expriment toujours le récepteur (cancer du sein, poumon,...), l'activation du récepteur entraîne à la fois une inflammation mais aussi la mort de ces cellules cancéreuses et un ralentissement de la croissance tumorale. La possibilité de ciblage thérapeutique de TLR3 dans les cancers a été confirmée par une étude rétrospective démontrant que seules les patientes dont le cancer du sein exprimait TLR3 avaient répondu favorablement à un traitement avec un ligand de TLR3.

Malgré leur activité adjuvante en vaccination, aucune molécule cible de TLR3 n'a à ce jour obtenu l'autorisation de mise sur le marché, en raison d'effets toxiques ou de manque d'efficacité, et d'homogénéité structurelle.

Récemment, un ligand de TLR3, parfaitement défini structurellement et donc reproductible a été mis au point. La preuve de concept *in vitro* de l'effet pro-apoptotique de cette molécule sur des cellules tumorales a été apportée *in vitro*.

De façon très intéressante, les cellules traitées par le ligand de TLR3 présentent des marqueurs permettant de prédire une activation du système immunitaire. Ceci est une observation très importante aux vues des récentes avancées en immunothérapie, et permettrait d'envisager un traitement combinant le ligand de Toll3 avec les inhibiteurs des points de contrôle de l'immunité.

Le but de ce projet est de prouver l'efficacité de ce ligand dans des modèles animaux.

2. Conformité aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement.

La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée; Réduction du nombre d'animaux sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettra d'éviter la souffrance des animaux. Raffinement : Lors de la réalisation des protocoles, le maximum d'informations sera récolté afin de restreindre l'utilisation de l'animal. Seul un modèle *in vivo* nous permettra d'étudier l'effet de cette molécule sur la croissance de cellules tumorales.

3. Nombre total d'animaux inclus dans le projet

Le nombre de souris total pour les 3 procédures est : 600

5224. Les horloges circadiennes sont des oscillateurs omniprésents permettant aux animaux d'adapter et de coordonner leur physiologie intrinsèque aux changements environnementaux. L'implication de dysfonctionnements de l'horloge circadienne dans certaines maladies ou syndromes comme les troubles du sommeil, la dépression, l'obésité ou la susceptibilité à certains cancers est ainsi démontrée. Alors qu'il est montré que bon nombre de fonctions intestinales sont régulées de manière circadienne, il est aussi admis aujourd'hui que le microbiote joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Le but de cette étude est de montrer que l'intégrité du microbiote est importante pour la mise en place et le maintien fonctionnel de l'horloge circadienne et d'évaluer le rôle de certaines souches du microbiote sur l'horloge. Comme la complexité de l'environnement tissulaire et le réseau complexe des mécanismes impliqués ne peuvent pas être reproduits *in vitro*, cette étude nécessite la réalisation d'expériences dans un environnement intégral, à l'échelle de l'animal. En parallèle, des études *in vitro* sont réalisées pour aborder les interactions et les voies de signalisation moléculaires impliquées. Pour les études *in vivo*, nous travaillons avec des modèles souris déficients ou rapporteurs du rythme circadien. Conformément aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, les animaux seront utilisés à minima, sans compromettre les objectifs du projet et tout en permettant une exploitation statistique des résultats. Les conditions d'hébergement et de soins utilisées et des points limites adaptés associés à des procédures de surveillance des animaux seront appliquées dans le respect du bien-être animal, ceci afin de limiter au maximum la souffrance subie par l'animal. Ce projet concernera au maximum 288 souris.

5225. Ce projet vise à une meilleure compréhension des mécanismes d'adaptation du muscle strié (squelettique et cardiaque) à des modifications des conditions physiologiques et/ou pathologiques lors de la polyneuromyopathie acquise en réanimation (PNMR). Grâce au modèle murin d'inflammation généralisée induite par le sepsis, modèle animal de référence d'étude de la PNMR, nous souhaitons étudier l'effet de facteurs pro- et anti-inflammatoires, analyser l'excitabilité cellulaire et réaliser des dosages biochimiques et moléculaires. De plus, l'étude des effets d'un inhibiteur de la voie cellulaire des TGF- β (transforming growth factor β) sera réalisée. En effet, l'inhibition de la voie des TGF- β semble très prometteuse dans la lutte contre l'atrophie musculaire, et a déjà été utilisée en essai clinique contre des pathologies telles que la cachexie cancéreuse ou la sarcopénie. Néanmoins, aucune étude n'a utilisé ces molécules dans le cadre du sepsis. Notre projet utilisera au total 65 rats répartis en 5 groupes; le groupe A contrôle (n=10), le groupe B septique (n=15), le groupe C avec l'inhibiteur seul (n=10), le groupe D septique associé à l'inhibiteur à J0 (n=15), et le groupe E septique associé à l'inhibiteur à J1 (n=15).

Les groupes de rats septiques comportent 15 animaux au lieu de 10 car il y a un risque de mortalité précoce lors du sepsis chronique sur 7 jours.

Nous travaillons dans le souci de la règle des 3R :

-Remplacement : l'utilisation d'un modèle animal est inévitable car nous travaillons sur des mécanismes intégratifs et donc sur l'organisme en entier.

-Réduction : ce nombre d'animaux a été calculé de façon à permettre une validation statistique des résultats expérimentaux, tout en tenant compte des exigences de réduction.

-Raffinement : Dans tous les cas, des protocoles d'anesthésie et d'analgésie appropriés seront appliqués.

L'intérêt de ce projet est de voir si l'utilisation d'inhibiteur des TGF- β est un bon candidat afin de lutter contre l'atrophie musculaire induite par le sepsis.

5226. En élevage les poissons peuvent être sujets à de nombreux stress abiotiques (variations de la qualité d'eau (température, pH, gaz...) ainsi que de la lumière) et biotiques (prédation, agressions de congénères, manipulation, densité de stockage...).

L'objectif de ce projet est d'étudier la réponse avant et après un stress de transport de différents génotypes de truite arc-en-ciel afin d'évaluer des différences de sensibilité à ce type de stress selon le génotype.

Afin d'évaluer des variabilités entre génotypes, l'étude sera réalisée avec 8 lignées isogéniques hétérozygotes de truite arc-en-ciel. Tous les individus d'une lignée possèdent le même génotype. Chaque lignée est issue du croisement de deux parents totalement homozygotes. Dans une lignée tous les individus possèdent le même génotype mais sont hétérozygotes et sont donc des poissons qui grandissent et survivent normalement.

La situation stressante proposée est le transport. Cette pratique courante en élevage soumet les poissons à différents stress : manipulation, confinement et variation de la qualité d'eau du fait du métabolisme des animaux.

Les conséquences du transport seront évaluées en mesurant des paramètres en relation avec le stress et les métabolismes hydrominérale et énergétique de l'animal.

Le nombre de poisson nécessaire au projet est au maximum de 1024 poissons de 2.5g (nombre dépendant du poids des poissons: la biomasse lors du transport sera de 200kg/m³), soit 128 poissons par lignée. Le projet prend en compte la règle éthique des 3Rs :

- Remplacer : Il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car nous recherchons précisément les réponses physiologiques des poissons au stress.

- Réduire : Le nombre de réplicats de bassin d'élevage va permettre d'estimer si les paramètres mesurés ne sont pas bassin dépendant et permettra de quantifier les variations de la qualité d'eau après le stress de transport. Et le nombre de poisson par condition est adapté au plus juste pour permettre à la fois une densité de poissons par bassin représentative des conditions de transport de poisson et à la fois une évaluation statistique de la variabilité individuelle de la réponse.

- Raffiner : Le stress est limité à 3 heures avec une supplémentation en oxygène et sur des poissons à jeun, afin de limiter la sécrétion de composés azotés toxiques pour les poissons. Les prélèvements ne seront réalisés que sur des animaux euthanasiés et ce, dans les conditions réglementaires.

5227. Dans certains pays européens dont la France, la faune sauvage (dont les blaireaux) est infectée par la tuberculose bovine ce qui limite l'éradication chez les bovins de cette importante maladie commune à l'homme et aux animaux.

En France, la vaccination des blaireaux, impliqués dans certains foyers, pourrait être un outil utilisé en complément des mesures de lutte actuelles. La seule manière efficace de vacciner un grand nombre d'animaux sauvages est la vaccination orale. Le développement d'un vaccin oral pour le blaireau à partir de BCG est un projet complexe, long et coûteux actuellement en cours au Royaume Uni et en Irlande, et en collaboration avec la France.

Des résultats prometteurs ont déjà été obtenus, mais en utilisant souches d'épreuve différentes et des voies d'inoculation différentes lors des tests d'efficacité. Or, pour développer plus rapidement un vaccin protecteur avec l'expertise de tous les partenaires du projet, il serait nécessaire de disposer d'un modèle standardisé d'épreuve infectieuse expérimentale. Nous proposons donc d'unifier les modèles infectieux expérimentaux. Pour limiter les coûts, simplifier les procédures et réduire l'impact sur les populations de blaireaux sauvages, le modèle furet sera utilisé dans les études initiales de sélection des vaccins, avant de tester le vaccin final chez des blaireaux. Le furet est un mustélidé, tout comme le blaireau, il a déjà été utilisé comme modèle expérimental de la tuberculose du blaireau en Irlande du Nord ; nous collaborons avec cette équipe pour bénéficier de leur expérience et de leurs protocoles de gestion des animaux.

Ce projet comprend 2 procédures : la première standardisera l'épreuve virulente chez le furet et la seconde testera la réponse et la protection induites par des vaccins oraux antituberculeux avant leur essai terminal, sous forme d'appât, sur des blaireaux.

La première procédure a pour but d'établir le modèle expérimental d'épreuve virulente à utiliser pour tester l'efficacité des vaccins oraux. La dose, le mode d'administration et la souche de bactérie seront sélectionnés pour reproduire le tableau pathologique connu chez les blaireaux infectés de manière naturelle et expérimentalement. Cette procédure permettra en même temps la mise au point des outils immunologiques indispensables destinés à cibler les marqueurs de vaccination et de protection qui seront ensuite utilisés dans les études d'efficacité vaccinale. Cette procédure prévoit de tester 2 souches différentes selon 2 voies d'administration (instillation trachéale et nébulisation) avec 2 doses. Afin de compenser les variations individuelles, chaque groupe expérimental comprendra 5 animaux, effectif minimal pour une interprétation statistique. Cette procédure utilisera donc 40 furets au cours des 5 années du projet.

Les animaux seront observés 12 semaines après leur infection, selon le calendrier en cours dans les études expérimentales utilisant des blaireaux. La tuberculose n'est pas fulgurante chez les mustélidés, en particulier avec les doses de bactéries prévues, aucun retentissement sur l'état général des animaux n'est donc anticipé pendant la durée d'observation; aucun point limite n'est donc défini dans le cadre de cette procédure de sévérité modérée. Les études menées chez les blaireaux sont également considérées d'une sévérité modérée par le Home Office en Grande Bretagne. Douze semaines après l'inoculation, les animaux seront mis à mort et autopsiés et les lésions tuberculeuses seront quantifiées.

La seconde procédure consistera à tester la réponse immunitaire et la protection induites par des vaccins oraux. Pour chaque vaccin à tester, un groupe de 10 furets sera vacciné par instillation sous anesthésie des préparations vaccinales. Deux ou trois vaccins seront testés en parallèle par étude. Treize semaines plus tard, 5 animaux par groupe seront éprouvés dans les conditions déterminées dans la première procédure en même temps que 5 animaux témoins non vaccinés. Les 5 autres animaux de chaque groupe seront euthanasiés pour suivre la réponse vaccinale et la diffusion du BCG dans l'organisme de l'animal au moment de l'épreuve. Comme dans la procédure 1, 12 semaines après l'épreuve, les animaux seront mis à mort et autopsiés. Les lésions tuberculeuses seront quantifiées et la comparaison des lésions entre les animaux vaccinés et les témoins sera effectuée.

Au cours des 5 années du projet, un maximum de 115 furets (40 pour la mise au point de l'épreuve, 10 par série de test pour 6 vaccins, et 3 groupes de 5 furets témoins d'infection) seront donc utilisés.

Il n'existe pas actuellement d'alternative à l'expérimentation animale pour tester l'efficacité des vaccins antituberculeux. Le projet utilise le nombre minimal d'animaux par lot pour obtenir des réponses significatives et les tests seront regroupés pour réduire le nombre d'animaux témoins. L'utilisation du modèle furet permettra de sélectionner un vaccin oral antituberculeux pour les blaireaux en ayant un impact minimal sur les populations sauvages.

5228. Chez l'Homme, les cancers cutanés sont en augmentation et constituent donc un réel problème de santé publique. L'objectif général du projet est de comprendre l'influence du microenvironnement tumoral sur les fonctions des cellules du système immunitaire au niveau des tissus épithéliaux afin d'identifier et de valider des approches d'immunothérapies anticancéreuses. En effet, les tumeurs épithéliales se développent suite à une défaillance de l'immunité anti-tumorale et il est donc crucial de pouvoir reprogrammer cette immunité. Les objectifs spécifiques de ce projet sont de disséquer les fonctions des cellules immunitaires présentes dans la tumeur au cours de son développement et de valider des cibles potentielles d'intervention immunothérapeutique.

D'un point de vue expérimental, nous souhaitons utiliser deux modèles murins de cancers épithéliaux : le premier modèle consiste à implanter la lignée tumorale msc-38 isolée d'une tumeur cutanée induite par traitement chimique au niveau de la peau de souris immunocompétentes de même fond génétique (modèle orthotopique). Le deuxième modèle consiste à implanter localement la lignée épithéliale tumorale nommée TC-1 au niveau de la peau de souris immunocompétentes de même fond génétique (modèle syngénique). Ce sont deux modèles murins complémentaires chez la souris immunocompétente qui présentent des similitudes avec le cancer épithélial de la peau chez l'Homme, en termes de nature des cellules immunitaires présentes dans les tumeurs et de localisation dans la peau. Le modèle d'implantation de cellules msc-38 a un développement lent (40 jours pour atteindre le point

limite) adapté pour une analyse séquentielle du phénotype et de la fonction des cellules immunitaires d'une part et pour la validation de cibles thérapeutiques d'autre part. Le modèle d'implantation de cellules TC-1, permet l'apparition rapide d'une tumeur car il est rapidement pro-tumoral (20 jours pour atteindre le point limite) et constitue un modèle approprié et complémentaire du modèle msc-38 pour la validation de cibles d'immunothérapie. De plus, le modèle TC-1 se développe sur un fond génétique dans lequel de nombreux outils immunitaires sont disponibles et compatibles avec l'analyse mécanistique d'une cible thérapeutique.

Au total, nous aurons besoin de 350 C57BL/6 et 380 FVB/N pour répondre à nos questions biologiques sur 3 ans et obtenir des résultats statistiquement valides.

Le nombre d'animaux a été déterminé en tenant compte des 3Rs :

Remplacement : Il n'y a pas actuellement de méthodes alternatives *in vitro* permettant de mimer l'environnement épithélial tumoral. De plus, les cellules qui nous intéressent sont faiblement représentées au sein des tumeurs épithéliales (moins de 2% dans une tumeur totale), nous obligeant à utiliser des groupes de souris assez importants pour obtenir suffisamment de cellules expérimentalement.

Réduction : nous avons déterminé les effectifs de nos groupes de manière à obtenir une forte validité statistique avec un minimum d'individu et notre projet a été conçu pour optimiser la quantité d'information analysable.

Raffinement : Les animaux seront hébergés à raison de 5 individus par cage, dans un environnement enrichi, conformément aux conditions de l'arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles NOR : AGRG1238753A. Le suivi de l'évolution des tumeurs et le suivi des animaux seront effectués conformément à une grille d'évaluation permettant de définir un niveau de douleur/souffrance à partir duquel les animaux concernés seront euthanasiés.

5229. Les salmonelles sont des bactéries fréquemment impliquées dans les toxi-infections alimentaires collectives dans les pays développés. C'est la seconde cause de zoonoses en Europe (maladies et infections qui se transmettent naturellement des animaux vertébrés à l'homme). Les animaux d'élevage, notamment les porcs, constituent des réservoirs de ces bactéries dont ils sont fréquemment porteurs sains. Le porc est considéré comme une source importante d'infection humaine à *Salmonella* (10 à 20% dans l'Union européenne). Si *Salmonella* ne provoque pas de maladie chez le porc, réduire sa prévalence chez l'animal pourrait à terme permettre de mieux maîtriser le risque pour le consommateur. Ces dernières années, trois sérovars (Ensemble des caractéristiques antigéniques de certains micro-organismes permettant de différencier des souches appartenant à une même espèce) ont majoritairement été retrouvés dans la filière porcine dans les pays européens : Typhimurium, le variant monophasique de Typhimurium et Derby. Les différences de colonisation du porc par ces 3 sérovars sont très peu décrites. L'objectif de ce projet est de comparer *in vivo*, sur des porcs EOPS (exempts d'organismes pathogènes spécifiques), le pouvoir colonisateur de 4 souches de *Salmonella* (1 de chaque sérovar et une souche « témoin » variant monophasique dont la colonisation a déjà été étudiée). L'espèce cible étant le porc et des prélèvements d'organes étant nécessaires, l'expérimentation animale ne peut être remplacée par des méthodes *in-vitro*. Un nombre total de 36 animaux sera utilisé pour cette expérimentation. Le nombre d'animaux utilisé est réduit au maximum compte tenu des 4 souches à tester, mais permettra une exploitation statistique satisfaisante des données. Les animaux disposeront d'une alimentation à volonté, d'objets manipulables, seront élevés en groupe et seront exposés à des cycles lumineux de 7 h 30 à 17 h 30. Même si ils sont porteurs sains de la maladie, la mise en place d'un suivi clinique régulier permettra de mettre en évidence rapidement toute situation anormale.

Les 36 animaux de l'essai seront inoculés à 7 semaines d'âges. Les animaux inoculés par une suspension de *Salmonella* (32) seront disposés dans 4 animaleries, à raison de 8 animaux par animalerie ; un sérovar étant testé sur les 8 animaux d'une animalerie. Les 4 animaux témoins seront disposés dans un autre bloc d'animalerie et seront inoculés avec du tryptone sel. La moitié des animaux seront suivis pendant 21 jours post-inoculation et l'autre moitié pendant 49 jours post-inoculation. Chaque semaine, à compter de la semaine d'inoculation, des prélèvements de fèces et de sang seront réalisés deux fois par semaine. Les animaux sont suivis sur le plan clinique et zootechnique. A deux reprises durant l'essai, des prélèvements individuels de salive (Fluide Oral) seront également réalisés. La moitié des animaux seront euthanasiés et autopsiés 21 jours après l'inoculation et le restant des animaux 49 jours après inoculation. Le contenu de différentes parties du tractus digestif, les amygdales et les ganglions mésentériques seront prélevés lors des autopsies. Des analyses bactériologiques de détection et de dénombrement de *Salmonella* seront menées sur les fèces, les fluides oraux et les prélèvements récoltés à l'autopsie. Des analyses sérologiques seront menées sur les échantillons sanguins. Ces analyses nous permettront d'apprécier la colonisation et la réponse immunitaire des porcs pour chaque sérovar de *Salmonella* testés. Les connaissances acquises dans le cadre de cet essai nous permettront de mieux comprendre les différences de colonisation chez le porc des trois sérovars majeurs de *Salmonella* en filière porcine et de mieux mesurer l'impact que cela peut avoir sur leur dissémination dans un élevage. Ces données sont importantes pour apprécier l'importance de ces 3 sérovars et permettront d'ajuster les moyens de lutte en élevage de porcs en fonction des sérovars. Cet essai s'intègre dans un projet global dont l'objectif est de diminuer le risque d'infection humaine par *Salmonella* via la consommation de viande d'origine porcine.

5230. En milieu naturel ainsi qu'en pisciculture, les poissons peuvent être sujets à différents stress environnementaux. Les jeunes stades sont particulièrement plus sensibles aux variations du milieu externe que les juvéniles et les adultes. Les premiers stades de développement correspondent donc à une période critique pour les animaux en élevage et milieu naturel. De plus, plusieurs études montrent que les stress précoces (sur de jeunes animaux) peuvent avoir des conséquences tardives et être ainsi responsables de perturbations physiologiques et comportementales au stade juvénile et adulte. Une meilleure connaissance des effets de stress périnataux sur l'état de bien-être et santé de l'animal à court et long terme devrait permettre de mettre en place de nouveaux

indicateurs de l'état de santé des animaux et d'améliorer certaines pratiques d'élevage ainsi que d'apporter des informations sur les perturbations de frayères en milieu naturel.

En pisciculture il est difficile de contrôler parfaitement la qualité d'eau en élevage et plus particulièrement les niveaux d'oxygène. En milieu naturel les œufs et larves de truite se développent sous frayères. Ces dernières peuvent présenter des niveaux d'oxygène bas du fait de colmatage (sédimentation de particules empêchant le passage de l'oxygène). Nous proposons donc d'exposer des larves de truite avant leur première alimentation (entre l'éclosion et la résorption du sac vitellin) à une hypoxie et de mesurer les conséquences à court (à la fin du stress) et long terme (6 mois après le stress).

Les paramètres mesurés en relation avec l'état de santé et de bien-être seront:

- la croissance, la prise et l'efficacité alimentaire, le métabolisme énergétique
- le comportement
- l'activité de l'axe corticotrope
- la régulation de l'homéostasie hydrominérale et gazeuse de l'animal
- l'analyse des défenses antioxydante et stress oxydant
- l'analyse du système immunitaire

Le nombre de poissons nécessaire au projet est de 1636

Le projet prend en compte la règle éthique des 3R:

- Remplacer: il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car nous recherchons précisément les réponses physiologiques et comportementales des poissons au stress
- Réduire: le nombre d'animaux est adapté au plus juste pour permettre une évaluation statistique de la variabilité individuelle de la réponse
- Raffiner: les prélèvements ne seront réalisés que sur des animaux euthanasiés et ce, dans les conditions réglementaires. Le protocole permettra de décider d'une interruption de l'expérimentation en cas de franchissement du point-limite.

5231. Le psoriasis est une maladie chronique, inflammatoire touchant 1 à 2% de la population mondiale. Cette pathologie entraîne des inflammations cutanées importantes caractérisées par des plaques érythémato-squameuses et évolue par des phases de poussées et de rémissions. Les traitements actuels peuvent permettre une rémission chez une minorité des patients alors qu'ils sont transitoirement efficaces voir inefficaces chez d'autres patients.

Les causes sont inconnues ; facteurs génétiques, facteurs environnementaux (fumer augmente le risque de développer un psoriasis).

Le psoriasis est une maladie qui réduit sensiblement la qualité de vie des patients atteints par cette pathologie.

Les objectifs de notre projet sont 1- de mieux comprendre le mécanisme d'action d'une molécule dite pro-inflammatoire, le TNFalpha, cible majeure de traitements actuels afin de faire la lumière sur la résistance de certains patients à ces traitements ; 2- d'étudier le mécanisme d'action dans les processus inflammatoires d'autres molécules liées à l'action du TNFalpha, notamment les récepteurs du TNFalpha.

Les mécanismes que nous souhaitons étudier demandent d'avoir un système immunitaire complet et proche de celui de l'homme. L'utilisation de la souris est donc tout indiquée dans cette étude. Afin de diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisés, plusieurs organes (rate, sang, ganglions et peau) seront prélevés sur chaque souris au moment de la mise à mort et plusieurs analyses seront effectuées sur chaque organe. Pour chacune des deux lignées de souris utilisées, déficiente en TNFR1 et déficiente en TNFR2 spécifiquement sur les lymphocytes T régulateurs, deux groupes (un groupe contrôle et un groupe génétiquement modifié) composés de 12 individus seront suffisants pour obtenir des résultats significatifs. Chaque expérience devant être confirmée par une autre identique, un total de 96 animaux sera nécessaire pour mener à bien ce projet. Tout au long de l'expérience, les souris seront pesées quotidiennement et leur comportement sera surveillé afin de veiller à leur bien-être.

5232. Ces travaux pratiques répondent aux objectifs pédagogiques définis dans le programme de formation de la Licence de Biologie et sont réalisés dans le cadre de l'unité d'enseignement intitulée « Physiologie de la nutrition » par les étudiants de 3^{ème} année de Licence.

Les travaux pratiques réalisés par les étudiants permettent 1) d'explorer in vivo la fonction digestive de l'estomac dans le cadre de l'étude de la sécrétion gastrique acide et de sa régulation par l'histamine et 2) de mettre en évidence le rôle du foie dans la régulation du métabolisme glucidique par la mesure de la glycémie et du contenu hépatique en glycogène à partir de prélèvements mis à leur disposition. Les étudiants appréhendent ainsi des modèles d'étude in vivo en procédant, sur l'animal anesthésié et analgésié, à des prélèvements du contenu stomacal, ainsi qu'à des administrations par voie sous cutanée de substances pharmacologiques (i.e. histamine pour l'étude de la sécrétion gastrique acide). Les paramètres biologiques (pH gastrique, glycémie, glycogène hépatique) seront déterminés par des techniques biochimiques classiques. L'expérimentation animale répond à une démarche pédagogique progressive : enseignement des bases de la digestion et de la nutrition, anatomie du tractus digestif, approche physiologique in vivo dans le respect de la règle des 3R et des procédures expérimentales visant à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse des animaux. Les résultats seront analysés et interprétés à partir des données théoriques et comparés entre eux pour montrer la variabilité interindividuelle. Les séances de travaux pratiques feront l'objet d'un taux d'encadrement de 4 à 5 étudiants par personnel formé. Un groupe de TP comprend au maximum 16 étudiants répartis en binômes. L'enseignant sera assisté par deux techniciens habilités qui seront chargés de l'anesthésie des animaux, de la mise en place des procédures permettant le raffinement (analgésie, surveillance de l'état d'endormissement des animaux...) et de l'euthanasie des animaux en fin de séance.

Le nombre d'animaux utilisés sur une année pour réaliser les séances de TP est de 68 rats (48 rats pour le TP sur la sécrétion gastrique et 20 rats pour le TP sur le métabolisme) pour un maximum de 6 groupes. La demande d'autorisation porte sur 5 années, ce qui fait un total de 340 rats. Ce nombre sera revu à la baisse en fonction du nombre d'étudiants inscrits dans le module. Enfin, les animaux utilisés pour ces travaux pratiques seront des rats de réforme.

5233. Les enzymes épigénétiques permettent de réguler l'expression des gènes en modifiant notamment les protéines associées à l'ADN comme les histones. Au laboratoire nous nous intéressons à plusieurs enzymes épigénétiques, dont les enzymes appartenant à la famille des Protéines Arginines Méthyles Transférases (PRMTs) et à la protéine CBP (CREB Binding Protein), permettant respectivement l'ajout d'un groupement méthyle ou acétyle à leur substrat. Ces enzymes sont requises dans de nombreux processus développementaux et nous nous intéressons plus particulièrement à leur rôle au cours de l'angiogenèse ou de la myogenèse en utilisant le poisson zèbre comme système modèle. En effet, le poisson zèbre est un modèle reconnu et validé pour l'étude du développement embryonnaire. Il est notamment un modèle permettant la génétique, c'est-à-dire la génération de lignées transgéniques ou mutantes stables. Grâce à cela, les analyses sur les effets de pertes et de gains de fonctions des activités géniques sont possibles. Le développement des embryons étant externe est ainsi adapté à l'utilisation de traitement pharmacologique. De plus, l'embryon étant transparent, le poisson zèbre est un modèle de choix pour les analyses du développement dite « in vivo » par imagerie à haute résolution. Nos recherches fondamentales visent à étudier les mécanismes impliqués dans le développement embryonnaire en particulier lors de la mise en place du système vasculaire, des muscles et de fait, se réalisent sur des embryons âgés de moins de 6 jours. Nous portons une attention particulière à la réduction du nombre de poissons hébergés au laboratoire, ainsi nous prévoyons de générer et d'utiliser uniquement 338 animaux pour ce projet. Nous veillons également à limiter le nombre d'embryons utilisés pour l'expérimentation et les poissons adultes sont conservés à des fins purement reproductives. Bien que n'utilisant pas de protocoles invasifs, nous nous appliquons à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse des poissons au maximum et veillons au bien-être de nos animaux en suivant quotidiennement les signes visibles d'un animal souffrant et en procédant si nécessaire à une euthanasie.

5234. L'utilisation de cellules souches pour la réparation de tissus endommagés représente une des stratégies thérapeutiques entre les plus innovantes et le muscle squelettique est un tissu modèle pour le développement d'approches correctrices de thérapie cellulaire pour le traitement des maladies génétiques neuromusculaires, sa croissance et sa réparation étant effectuées par une population de cellules souches musculaires appelées cellules satellites. La régénération musculaire c'est le processus par lequel le muscle est capable de récupérer sa fonctionnalité après un dommage.

En effet la régénération musculaire est principalement étudiée chez la souris en étudiant directement la régénération d'un muscle de souris avec tous les acteurs cellulaires murins. Le comportement des cellules satellites humaines ou encore des myoblastes humains (les cellules dérivées de la prolifération des cellules satellites) après la greffe reste un processus encore mal connu et des études in vivo sont nécessaires pour éclaircir plusieurs aspects. La xénogreffe de cellules humaines dans un modèle de régénération chez la souris immunodéficiente permet d'étudier la contribution des myoblastes humains à la régénération musculaire.

L'objectif de ce projet est d'étudier le comportement in vivo des myoblastes humains après la greffe dans un muscle en régénération. Pour cela, les muscles murins injectés avec les myoblastes humains seront analysés à différents temps après la greffe : la participation des myoblastes à la régénération musculaire sera évaluée ainsi que l'expression de différents marqueurs (prolifération, différenciation musculaire) et la production de certaines protéines connues comme faisant partie de la matrice extracellulaire musculaire.

Le choix d'un modèle immunodéficiente est indispensable puisque il s'agit de tester des cellules humaines dans un contexte murin. Pour cela le muscle Tibialis Anterior (TA) a été choisi comme muscle cible de l'injection intramusculaire. 52 souris immunodéficientes seront utilisées. Afin de réduire le nombre de souris utilisées dans le respect de la règle des 3R, les deux TA de chaque souris seront injectés. Les souris sont anesthésiées par injection du mélange Kétamine/Xylazine. Lors de la période post-opératoire les animaux recevront un analgésique. Suite au réveil, les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de déceler des signes de douleur. Les animaux qui montrent un signe quelconque de détérioration de leur santé seront euthanasiés.

5235. Les mycobactéries comportent des agents pathogènes majeurs pour l'homme tels que *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) responsable de la tuberculose (TB) ou *M. leprae* agent de la lèpre. Parmi les mycobactéries du complexe de *M. tuberculosis*, *M. bovis* (Mb) est également responsable de la TB bovine et est transmissible à l'homme. La TB humaine, une infection pulmonaire chronique et contagieuse, est l'une des trois premières causes mondiales de mortalité par un agent infectieux avec environ 2 millions de morts chaque année et un tiers de la population mondiale infecté. L'infection du bétail par Mb est, dans certains pays en voie de développement, responsable de zoonoses et représente dans les pays développés un important problème économique par les programmes de surveillance qu'elle impose.

Bien que les antibiothérapies, pour lutter contre les infections mycobactériennes chez l'homme, et un vaccin *M. bovis* Bacille de Calmette Guérin (BCG) soient disponibles, leur efficacité n'est pas suffisante pour enrayer l'épidémie mondiale de TB. Le vaccin est surtout efficace sur les formes infantiles. De même pour le bétail, la situation concernant la TB bovine chez nos voisins du Royaume Uni est préoccupante et les derniers chiffres de prévalence en France nous incitent à renforcer la lutte contre les

mycobactéries du complexe de Mtb. Nous devons pour ce faire améliorer nos connaissances de la physiopathologie des infections par les mycobactéries du complexe de Mtb et définir les facteurs importants pour leur virulence.

Nos travaux ont pour objectif d'étudier les réponses immunitaires précoces mises en place par l'hôte en réponse i) à l'infection par les mycobactéries virulentes du complexe de Mtb et ii) à la vaccination par le BCG afin de proposer de meilleures souches vaccinales. Nous utilisons pour cela le modèle souris qui, bien que non naturellement hôte des mycobactéries du complexe de Mtb, reproduit certaines signatures de la TB humaine ou bovine, notamment la formation du granulome dans le poumon ou le ganglion drainant après infection par voie intranasale ou aéroportée. Les caractéristiques de la réponse protectrice induite par la vaccination BCG chez la souris ou chez l'Homme sont également comparables.

Ce projet pour 5 ans prévoit l'utilisation de 4425 souris. Nous veillons à appliquer la règle des 3R :

-Nous sommes capables de reproduire partiellement ces mécanismes *in vitro* avec des modèles cellulaires notamment pour la phase aiguë. Cependant pour la phase chronique de l'infection, seul le modèle *in vivo* est pertinent. (Remplacer)

-Nous utilisons des tests statistiques non paramétriques spécialement conçus pour comparer des groupes de petits effectifs. Nos groupes expérimentaux sont donc de 5 animaux de même âge et même sexe (Réduire).

-Nous réduisons, et limitons au maximum l'inconfort, la douleur, pouvant être subie par les animaux. Le contact entre les animaux est maintenu et un enrichissement du milieu est effectué (Raffiner).

5236. Pour améliorer les futurs vaccins destinés aux jeunes bovins, il est très important de comprendre et tester la capacité des cellules immunitaires de jeunes bovins à répondre à de futurs adjuvants en vaccination.

Cela est particulièrement important pour concevoir des vaccins efficaces chez les jeunes veaux et les protéger contre les infections propres à cette période de la vie (ex les bronchopneumonies causées par le virus respiratoire syncytial bovin). En effet le système immunitaire évolue au cours de la vie et en particulier présente des différences de capacité de réponse chez l'animal à la naissance. Pour réaliser cette étude, nous suivons une quinzaine de veaux femelles de la naissance à l'âge de 1 an minimum au sein d'un élevage expérimental. Des prises de sang seront réalisées de la naissance à l'âge de 1 an (15 jours, 3 mois, 6 mois, 9 mois, 12 mois). Les leucocytes sanguins seront isolés et enrichis en cellules immunitaires capables de répondre à une nouvelle génération d'adjuvants. Ces cellules sont appelées cellules dendritiques. La réaction de ces cellules dendritiques à ces adjuvants sera étudiée *in vitro* par leur capacité à produire des cytokines et à exprimer des marqueurs d'activation (signature de leur capacité à mettre en place des défenses immunitaires). Le but de ce projet sera d'identifier les adjuvants efficaces et sûrs, les plus appropriés chez le jeune veau.

La possibilité de suivre les mêmes individus de leur naissance à l'âge de 1 an au sein d'un même élevage répond à la règle des 3 R, à savoir réduction du nombre d'animaux dans le protocole expérimental. De plus, ces individus seront maintenus au sein de l'élevage sans contraintes particulières en dehors des prises de sang, qui seront adaptées à leur poids en fonction de leur âge, ce qui répond à leur bien-être.

5237. La leptospirose est une zoonose transmise par les rongeurs, qui excrètent de manière asymptomatique les bactéries dans leur urine, contaminant l'environnement. Les bactéries pathogènes *Leptospira interrogans* sont spiralées et mobiles et infectent leurs divers hôtes par pénétration de la peau ou des muqueuses. Les hommes peuvent développer une maladie bénigne ou une maladie grave, parfois mortelle avec des insuffisances rénales, hépatiques et cardiaques.

Nous disposons de modèles d'infection chez la souris reproduisant l'infection aiguë humaine, mais aussi chronique, observée chez les rats qui sont considérés comme le réservoir asymptomatique de la leptospirose. La première étape de l'infection consiste en une dissémination et multiplication des leptospires pathogènes dans le sang, qui si elle n'est pas contrôlée aboutit à une septicémie. Lorsqu'elle est contrôlée par le système immunitaire, comme chez la souris, les leptospires disparaissent de la circulation sanguine puis colonisent stablement le rein.

Le système immunitaire inné de l'hôte possède des récepteurs, comme les récepteurs Toll-like (TLR) ou ceux de la famille des Nod-like (NLR), qui détectent des motifs conservés des microbes, permettant l'attraction de globules blancs et la destruction des microbes.

Nous étudions comment les leptospires échappent au système immunitaire de leurs hôtes. Des modifications de composants de la paroi bactérienne leur permettent d'échapper à certains récepteurs TLRs ou NLRs. Ainsi, un de ces composants, le lipopolysaccharide (LPS) de leptospires est reconnu par le récepteur TLR4 murin, crucial pour le contrôle des leptospires, mais non par le TLR4 humain. Ces résultats ont permis de mieux comprendre la sensibilité différente des souris et des hommes face à la leptospirose. D'autres études sont en cours pour comprendre quels sont les autres déterminants des leptospires et de l'hôte importants pour la virulence des bactéries ou le contrôle de l'infection.

Ces études devraient permettre une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la leptospirose, et permettre l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques contre cette maladie négligée, ré-émergente du fait du réchauffement climatique, pour laquelle les traitements et vaccins ne sont pas efficaces.

Ce projet vise à étudier lors de la phase de dissémination sanguine chez des souris infectées, d'une part les effets de certaines mutations des leptospires sur la virulence, et d'autre part le rôle de certains récepteurs de l'immunité innée dans le contrôle de l'infection.

Ce projet de recherche fondamentale de 5 ans utilisera au maximum 720 souris adultes mâles ou femelles. L'étude de la leptospirose implique un hôte et les bactéries qui l'infectent. La complexité de cette interaction ne peut pas être appréhendée dans sa globalité *in vitro*. La souris, hôte naturel asymptomatique, est idéale pour pouvoir mieux comprendre la leptospirose. Les souris seront utilisées dans des procédures expérimentales de degré de sévérité modéré, l'infection se faisant à une dose de leptospires

n'entraînant généralement pas de dommages majeurs. Cependant, le cas échéant, les souris atteignant des points limites définis lors des projets précédents seront mises à mort pour éviter toute souffrance inutile. Le nombre de souris a été calculé avec l'objectif de réduire le nombre d'animaux autant que possible tout en minimisant le «bruit de fond» inhérent à la recherche biologique in vivo pour obtenir des résultats statistiquement significatifs et exploitables. Tout sera mis en œuvre pour diminuer ce nombre, en groupant les expériences pour minimiser le nombre de souris témoin.

5238. Le système immunitaire qui assure la défense de l'organisme est en général efficace et permet le rejet des ennemis extérieurs (bactéries, virus,...) et des ennemis intérieurs (cellules cancéreuses,...).

Pour assurer sa fonction, de nombreuses cellules et de nombreuses molécules sont impliquées tant au niveau de son activité que de sa régulation.

Lorsque le système immunitaire est attaqué, il se dérègle et on assiste au développement de maladies graves. Suite à l'infection par le VIH par exemple, le système immunitaire devient défaillant. Au contraire, dans le cas des maladies inflammatoires chroniques et de l'auto-immunité, le système immunitaire devient agressif à l'égard du corps qui l'héberge.

Parmi les molécules du système immunitaire, nous avons caractérisé le facteur RIF capable d'induire l'immunodéficience chez les patients infectés par le VIH. Nos études montrent que ce facteur bloque le fonctionnement des lymphocytes T CD4 in vitro. Des « inhibiteurs » de cette molécule pourraient donc être utilisés comme médicaments pour le traitement des patients infectés par le VIH.

D'autre part, nous pensons que cette molécule pourrait également servir au traitement des maladies où l'activation des lymphocytes T CD4 est impliquée comme les inflammations chroniques et les syndromes autoimmuns. Dans ce sens, nous proposons de réaliser des études précliniques chez la souris afin d'étudier in vivo le mode d'action de RIF et les effets de ses inhibiteurs.

Tous les animaux seront manipulés selon deux procédures expérimentales de sévérité légère. Les mesures seront faites sur des lymphocytes T CD4 isolés à partir des rates des souris. Lorsque des inhibiteurs seront testés, ils seront pré-injectés ou co-injectés avec le facteur RIF. 3960 souris mâles âgées de 6 à 8 semaines seront utilisées pour l'ensemble des deux procédures.

D'après des études déjà réalisées chez la souris, la molécule RIF n'est pas toxique. De plus, les souris seront traitées pendant un temps court. Notre protocole n'induirait donc ni douleur, ni souffrance, ni angoisse chez les animaux.

Au fur et à mesure de l'optimisation de nos conditions expérimentales, les doses de RIF et les cinétiques d'analyse seront précisées, ce qui permettra de diminuer le nombre d'animaux par expérience. Les résultats obtenus (doses, cinétique, mode d'action...) seront utilisés dans le cadre de collaborations avec des laboratoires (extérieurs à notre institut) où sera étudié l'effet de l'injection de RIF dans des modèles de souris reproduisant des maladies inflammatoires ou auto-immunes.

La compréhension des différents aspects des effets biologiques de RIF in vivo pourra nous permettre l'élaboration et la mise en place d'essais cliniques chez l'homme, soit pour le traitement de patients infectés par le VIH, soit pour le traitement des manifestations inflammatoires et/ou auto-immunes.

5239. 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 1339 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.

L'utilisation de ce modèle permettra 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.

5240. Le muscle squelettique est le tissu le plus abondant du corps. Depuis plus de 10 ans, notre laboratoire étudie comment le muscle squelettique est formé au cours de l'embryogénèse, de la croissance post-natale et de la régénération. Ces différentes étapes font appel à des cellules spécialisées appelées cellules souches.

Tous les muscles du corps n'ont pas la même structure et ne répondent pas à la même fonction. Les études réalisées ces 15 dernières années dans le laboratoire ont notamment montré que la mise en place des muscles du tronc et de la tête ne sont pas contrôlés par les mêmes réseaux de gènes. Notre étude vise à comprendre quels sont les gènes qui permettent le développement de muscles spécifiques comme l'œsophage, les muscles oculaires ou les muscles des membres. Ces résultats seront, entre autre, très importants pour comprendre pourquoi dans les maladies qui touchent le muscle squelettique, appelées dystrophies musculaires, certains muscles sont affectés et d'autres sont épargnés. Par exemple, dans la myopathie de Duchenne, contrairement aux muscles des membres et du tronc, les muscles de la tête ne dégèrent pas. Pour cette étude il est essentiel de recourir à des modèles murins génétiquement modifiés qui nous permettent de marquer et suivre spécifiquement le destin ou éliminer des cellules d'intérêts pour comprendre leur origine et leur fonction.

Le deuxième aspect que nous étudions est le développement du muscle post-natal et sa capacité à régénérer après une blessure ou dans des cas de dystrophies musculaires. Ces processus font intervenir des cellules souches adultes. Comprendre le fonctionnement normal de ces cellules souches est la base pour comprendre leur dysfonctionnement dans les pathologies ou le vieillissement. Les cellules souches ont la propriété de générer des cellules différenciées qui assurent la fonction contractile du muscle, et d'auto-renouveler leur pool initial pour assurer leur maintenance.

Notre étude vise à comprendre les propriétés de ces cellules souches musculaires adultes. Pour ce projet, il est essentiel d'utiliser des modèles de souris génétiquement modifiées qui nous permettent d'identifier et d'isoler ces cellules souches musculaires pour pouvoir les étudier aux niveaux cellulaires, moléculaires et fonctionnels. Si certaines expériences d'analyse peuvent être établies in vitro, d'autres doivent impérativement être réalisées in vivo car aucun système in vitro ne permet à ce jour de reproduire fidèlement les conditions naturelles et complexes d'un tissu.

L'ensemble de ces expériences est réuni en 6 procédures expérimentales, comportant l'utilisation d'environ 3382 souris (foetus et adultes) sur 5 ans. Elles comportent essentiellement des injections de substances non toxiques et des blessures ou des injections intramusculaires locales de toxines. Pour répondre aux règles des 3R, nous avons 1) introduit l'administration d'un antalgique pour les procédures qui comportent des blessures musculaires, 2) réduit les effectifs au minimum tout en assurant l'atteinte des objectifs scientifiques.

5241. Le carcinome hépatocellulaire est un cancer primaire du foie qui fait partie des cinq cancers les plus courants au monde (3ème cause de décès lié au cancer). Il est diagnostiqué chez près de 500000 patients/an au monde dont près de 20000 aux Etats-Unis et 3000 rien qu'en France. C'est le 8e cancer dans le monde par ordre de fréquence et le plus fréquent des cancers primitifs du foie. Dans les pays développés, son incidence a particulièrement augmenté ces vingt dernières années en raison de l'augmentation de l'incidence de la cirrhose due au virus de l'hépatite B ou de l'hépatite C. 85 % des cas se situent dans les pays en voie de développement dans les zones d'endémie des hépatites.

Cette tumeur a un fort potentiel de croissance, avec un doublement spontané de sa taille entre un mois et un an. Le pronostic global est mauvais en raison de l'existence de cirrhose non tumorale sur le foie qui limite les possibilités de traitement. En fait, la détection de petites tumeurs et les progrès thérapeutiques modifient son pronostic. Les taux de survie atteignent, à cinq ans, de 50 à 70 %. Si la tumeur n'est pas résecable, l'espérance de vie ne dépasse guère un à deux ans.

Le projet consiste à développer de nouveaux outils de traitements du carcinome hépatocellulaire, dans un modèle de tumeur chez le lapin.

Le recours à l'imagerie médicale (scanner à rayon X ou ultrasons) dans ce projet permet de suivre directement au cours du temps le développement des tumeurs et donc de quantifier l'efficacité de nouveaux produits anti-cancéreux. Ces techniques d'imagerie présentent l'avantage d'être non invasives (requiert seulement une anesthésie) et ne nécessitent pas de sacrifice d'animaux au cours de l'étude (suivi des mêmes animaux au cours du temps - diminution de l'impact de la variabilité individuelle). Elles permettent ainsi de diminuer le nombre d'animaux nécessaire et de satisfaire à la règle des 3R concernant le R de Réduction.

Plusieurs études (10) présentant le même design expérimental seront réalisées au cours de ce projet pour évaluer différents traitements ou formulations. Le nombre d'animaux pour chaque étude sera de 24 lapins. Un total de 240 animaux seront donc utilisés sur l'ensemble du projet.

Le recours à l'expérimentation animale est nécessaire afin de pouvoir appréhender l'efficacité d'un produit anti-cancéreux dans un organisme entier vivant (modélisation d'une situation clinique). Actuellement, il n'existe pas de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable l'efficacité d'un traitement anti-cancéreux dans un organisme vivant.

L'espèce lapin a été choisie car c'est un modèle bien établi d'étude de tumeurs hépatiques qui est régulièrement utilisé dans les modèles d'oncologie, par l'utilisation de la souche tumorale VX2. De plus, le gabarit du modèle lapin permet une approche aisée de thérapie interventionnelle par injection intratumorale ou par voie intra-artérielle, comme cela se réalise chez l'homme.

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes pour prévenir l'apparition de ces points limites et essayer dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe clinique anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires (mise en place d'un traitement ou euthanasie de l'animal) le plus rapidement possible.

5242. La recherche biomédicale et la compréhension des pathologies humaines ont largement bénéficié des connaissances acquises chez la souris, un modèle animal de petite taille, facile à manipuler génétiquement, et d'un coût relativement réduit. Plusieurs décennies de recherche en immunologie ont permis d'appréhender dans le détail les étapes du développement des leucocytes, les rôles respectifs des différentes sous-populations lymphocytaires, les mécanismes orchestrant la régulation de l'immunité, ainsi qu'un grand nombre de pathologies humaines – lorsqu'elles peuvent être modélisées dans un modèle murin.

Cependant, soixante-cinq millions d'années d'évolution divergente séparent la souris et l'Homme, et des différences notables existent entre les systèmes immunitaires de ces deux espèces. De plus, la co-évolution des pathogènes humains avec leur hôte induit un tropisme marqué – voire exclusif – pour l'espèce humaine. L'étude de certains pathogènes causant des maladies infectieuses particulièrement dévastatrices chez l'Homme – par exemple les virus de l'immunodéficience humaine, de l'hépatite B et C, ou encore Plasmodium – est par conséquent souvent limitée par l'absence de modèles animaux totalement représentatifs de la situation humaine ou d'un coût raisonnable, lorsqu'ils existent. Enfin, les limitations techniques ou éthiques empêchant la menée d'études expérimentales prospectives directement chez l'Homme sont nombreuses, et il existe de fait un besoin pressant pour de nouveaux modèles expérimentaux spécifiquement adaptés à la recherche en immunologie humaine.

Depuis quelques années, l'utilisation de souris humanisées émerge comme une approche particulièrement attrayante pour l'étude in vivo du développement et de la fonction des cellules du système immunitaire humain, que ce soit pour la recherche fondamentale, des études pré-cliniques ou des applications bio-industrielles. Ces modèles doivent notamment permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, définir les biomarqueurs des pathologies humaines étudiées et comprendre les mécanismes fondamentaux de ces pathologies.

Dans le cadre de la présente demande d'autorisation de projet utilisant des souris de laboratoire et s'inscrivant dans la démarche 3R ('Réduction, Raffinement, Remplacement), nous développerons et distribuerons de nouveaux modèles de souris humanisées pour le système immunitaire ('raffinement'), avec une double perspective :

- (i) mettre en place une infrastructure de production permettant de répondre aux exigences réglementaires, tout en maîtrisant au plus près les volumes de production ('réduction' optimisée après plus de 10 ans de développements technologiques) ;
- (ii) établir une plate-forme préclinique attrayante et pertinente pour le développement et le criblage de nouvelles approches thérapeutiques, entre autres pour éviter le recours aux primates non-humains (pertinence ; considérations éthiques de 'remplacement' ; coût).

Les souris humanisées générées seront produites dans des conditions permettant leur distribution à d'autres utilisateurs du secteur académiques et du secteur industriel (société de biotechnologie ; prestataires de services en biologie).

Il est prévu d'utiliser en moyenne 500 souris par an pour ce projet (total de 2500 animaux sur 5 ans). Outre la valence 'réduction' qui est optimisée après plus de 10 ans de développements technologiques, le degré de gravité de procédure associé à ce projet est de niveau « modéré ».

5243. Le virus Chikungunya (CHIKV) est transmis à l'homme par les piqûres de 2 espèces de moustiques du genre Aedes. Ce virus a émergé dans les îles de l'océan Indien en 2005, notamment à l'île de la Réunion, où il a provoqué une épidémie, puis il a atteint l'Inde où environ 1,5 million de personnes ont été infectées. Plus récemment, il a provoqué une épidémie en Italie et, en 2010, quelques cas autochtones ont été recensés dans le sud de la France. Ce virus, considéré comme un virus émergent du fait de l'expansion géographique des espèces de moustiques vecteurs de l'infection, notamment en Europe et aux Etats-Unis, a atteint en hiver 2013-2014 le continent américain jusqu'alors épargné.

L'infection humaine par CHIKV se manifeste par une forte fièvre associée à des douleurs articulaires et musculaires accompagnée d'éruptions cutanées et parfois de signes ophtalmologiques (uvéites). Au cours de l'épidémie réunionnaise, des formes sévères avec atteinte neurologique ont également été observées, notamment chez le nouveau-né après transmission materno-néonatale. De plus, la phase aiguë de l'infection peut évoluer vers une forme chronique responsable de douleurs articulaires invalidantes. Aucun traitement ni vaccin ne sont disponibles sur le marché.

La physiopathologie de l'infection par CHIKV étant très mal connue, nous avons développé les premiers modèles murins permettant de reproduire les formes bénignes et sévères de l'infection par CHIKV. Nous avons identifié les principales cellules cibles du virus dans les tissus sièges des symptômes (muscle, articulation, peau) chez la souris, comme chez l'homme, et montré le risque de transmission du virus par greffe de cornée. Nous avons mis en évidence le rôle majeur des interférons (IFNs) de type I dans le contrôle de l'infection et nous en avons étudié le mécanisme. Outre l'IFN de type I, nous avons montré que l'infection est contrôlée par les anticorps neutralisants anti-CHIKV, que ce soit les immunoglobulines humaines neutralisantes ou les anticorps monoclonaux murins neutralisants dirigés contre CHIKV. Fait intéressant, dans une étude préliminaire, nous avons montré que l'injection d'anticorps neutralisants CHIKV injecté à une dose non neutralisante facilite l'infection chez la souris, c'est-à-dire que des souris non sensibles à l'infection par CHIKV le deviennent en présence d'une dose d'anticorps non neutralisante.

Plus récemment, nous avons réalisé un criblage à haut débit des gènes cellulaires humains impliqués dans le cycle viral. Les résultats obtenus nous ont permis d'identifier les principales voies de signalisation mises en jeu au cours du cycle de réplication. Cette étude ouvre la voie à l'analyse détaillée du rôle de certains gènes ou groupe de gènes humains dans la réplication de CHIKV. Notre projet a pour but d'étudier le rôle de facteurs de l'hôte dans l'infection par CHIKV, anticorps anti-CHIKV et gènes cellulaires clés. Le rôle promoteur ou inhibiteur de ces facteurs a été étudié dans des modèles cellulaires in vitro et leur implication au cours de l'infection de l'organisme hôte sera confirmée dans des modèles murins, afin de révéler leur rôle dans la progression de la maladie ou, au contraire, dans la protection contre la maladie.

Le nombre d'animaux nécessaires à cette étude sera réduit au minimum nécessaire pour réaliser des tests statistiques. Les titres viraux seront déterminés dans différents tissus chez 5 animaux infectés et un test statistique sera réalisé. Le nombre total d'animaux nécessaires est estimé à 1796 souris.

Pour réduire au maximum les sources de souffrance, les animaux seront anesthésiés avant prélèvement de sang ou d'autres tissus. L'effet de l'anesthésique sera vérifié, puis les prélèvements réalisés et les animaux mis à mort. Les animaux seront observés quotidiennement durant 21 jours après infection. La survenue d'une parésie conduira à la mise à mort immédiate des animaux concernés.

5244. La mort cellulaire est un phénomène crucial dans le maintien des fonctions physiologiques à l'état normal. Cependant, la mort cellulaire programmée est aussi induite en réponse à des menaces extérieures telles que des infections virales et bactériennes ou des traitements cancéreux. Comment le système immunitaire reconnaît-il une mort cellulaire « normale » d'une « pathologique »? Comment le type de mort cellulaire influence-t-il la réponse immune? Nous nous intéressons particulièrement à la réponse immune spécifique à des antigènes issus des cellules mourantes.

Ce projet porte sur l'étude de (i) la présentation croisée des antigènes issus de cellules mourantes après induction de différents types de mort cellulaire (ii) le rôle des adjuvants dans la potentialisation ou l'inhibition de la réponse induite par les cellules mourantes (iii) la réponse immune anti-tumorale après traitement de cancers établis, et (iv) la fonction immunosuppressive de réactifs.

Nous utiliserons des souris mâles ou femelles de 8 à 16 semaines génétiquement modifiées ou non (4050 animaux au total; 1530 avec un degré de sévérité léger, 2520 avec un degré modéré).

Le projet durera 5 ans.

Cette étude fondamentale a pour but l'amélioration des stratégies de vaccination et de l'efficacité des traitements anticancéreux.

Les différents gestes techniques utilisés seront les injections de réactifs, de cellules ou de virus en intradermal, intraveineux ou intrapéritonéal ; les prélèvements de sang ; les prélèvements d'organes après mise à mort ; l'implantation et le suivi de tumeurs : le suivi des animaux est quotidien lors de l'implantation de tumeurs. La procédure est de classe modérée, les animaux étant mis à mort lorsqu'un des points limites suivants est atteint: tumeur excédant un diamètre de 1,8 cm ou devenant ulcérée, signes de douleurs corporelles selon la grille d'évaluation dont nous disposons.

. Les autres procédures peuvent provoquer un stress passager avec un niveau de gravité léger.

L'utilisation d'animaux est absolument nécessaire pour ce projet. Il n'y a aucune autre alternative au modèle animal dans ce genre de recherche. Il a été démontré scientifiquement que les réponses anti-tumorales chez la souris reflètent, dans de nombreux aspects essentiels, celles observées chez l'homme. De nombreuses publications sur la réponse immunitaire aux tumeurs transplantées chez la souris ont abouti à des essais cliniques très prometteurs chez l'homme. La complexité du système immunitaire et l'importance de la présentation croisée dans les réponses immunitaires anti-infectieuses et anti-tumorales ont été démontrées chez la souris et validées chez l'homme. Ces études doivent être effectuées *in vivo*, parce qu'il est nécessaire que les organes et les systèmes impliqués soient intacts afin de bien comprendre la migration cellulaire et la réponse immune.

Toutes les tentatives envisageables seront faites pour réduire le nombre de souris nécessaire sans pour autant sacrifier la rigueur scientifique. Cela inclut plusieurs mesures chez les mêmes souris, le partage des groupes de contrôle entre plusieurs expériences, l'établissement des temps d'investigation importants au début de l'étude afin de limiter le nombre de souris nécessaires au fil du temps et surtout pratiquer des expériences *in vitro* préliminaires.

Les règles d'hébergement seront suivies scrupuleusement. Les animaux seront manipulés avec attention afin de limiter le stress lié aux expérimentations mêmes de gravité légère

5245. Il existe de nombreux cas cliniques pour lesquels il serait très avantageux, voire nécessaire, de pouvoir détecter, visualiser, identifier et caractériser directement chez le patient des processus pathologiques. L'objectif de ce projet est de poursuivre 1) le développement *in vivo* de nos méthodologies d'imagerie basées sur la luminescence, et 2) tester de nouvelles sondes d'imagerie ciblant des bactéries.

Ce travail vise à optimiser le ciblage spécifique de différents marqueurs moléculaires luminescents et fluorescents sur des cellules et leur détection par des systèmes d'imagerie optiques. Le modèle choisi est basé sur un modèle robuste, bien éprouvé et connu d'implantation et de détection de tumeurs implantées chez la souris.

Les infections bactériennes seront détectées dans des modèles d'abcès sous-cutanés, et d'infections pulmonaires induits par différentes familles de bactéries.

Il sera ainsi possible, de façon non invasive et spécifique, 1) de suivre au sein d'un même animal la localisation et l'évolution de la croissance de tumeurs avec ces nouveaux agents moléculaires d'imagerie, 2) de visualiser une infection bactérienne tout en identifiant la famille bactérienne responsable de cette infection. Le développement de ces outils et méthodes permettront de diminuer fortement le nombre d'animaux utilisés lors des recherches.

D'autre part, l'étude et la validation des méthodologies mises en œuvre seront utiles à plus long terme pour la mise au point de molécules utilisables chez l'homme.

Ce projet nécessitera des souris immunodéficientes de type SCID et Nude et des souris immunocompétentes de souches BALB/C. Un total de 468 souris pour la durée totale du projet est estimé. Ce nombre est justifié par le nombre de conditions différentes nécessaires (différents types cellulaires, et différentes sondes, marquées ou non). Un nombre minimal de souris par groupe a été choisi afin de s'assurer de la reproductibilité des expériences et de la validité des résultats.

Les souris seront hébergées par groupe de 7 souris maximum par cage avec accès *ad libitum* à la nourriture et l'eau. Lorsque les animaux auront été infectés ou présenteront des tumeurs de certaines tailles, leur état clinique sera suivi quotidiennement afin de déterminer leur état de souffrance. Des points limites ont été définis et seront appliqués lorsqu'ils seront atteints.

5246. Le vieillissement est un processus pendant lequel la détérioration des tissus et des organes, ainsi que le déclin des aptitudes cognitives diminuent le niveau de qualité de vie. Plus spécifiquement, le vieillissement est lié à plusieurs maladies et notamment aux maladies neurodégénératives au niveau du cerveau.

Pour comprendre ce processus et essayer de trouver des thérapies contre les maladies neurodégénératives, nous utilisons des souris âgées comme modèle de vieillissement. Nous allons injecter des protéines que l'organisme produit naturellement durant la jeunesse à des souris âgées. Il a déjà été démontré que ces protéines induisent un rajeunissement du cerveau de la vieille souris. Ici nous allons suivre l'évolution de la performance dans le comportement de la souris. De plus nous allons étudier le rôle de ces protéines dans la régulation de la production hormonale et le métabolisme qui jouent un rôle important dans le vieillissement.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour tester les effets systémiques de nos protéines. Notre objet d'étude étant le rajeunissement, on utilise dans ces expériences des vieilles souris (15-24 mois). Cependant, il faudra comparer l'effet de ces protéines chez la vieille souris avec celui chez la jeune souris. Pour ce faire, des souris adultes de 2-3 mois seront utilisées. La réalisation de ce projet nécessitera l'utilisation de 780 souris mâles et femelles.

Ce nombre d'animaux est le minimum requis pour la réalisation des études statistiques ultérieures, qui permettront une évaluation pertinente de l'effet des différentes conditions expérimentales sur l'effet rajeunissant de ces protéines. Tous les efforts techniques seront mis en place pour minimiser au maximum toute douleur et tout inconfort de l'animal. Nous utiliserons trois procédures différentes.

Les bénéfices attendus du projet sont de mieux comprendre d'une part le processus du vieillissement, et d'autre part essayer de trouver des thérapies spécifiques pour les maladies neurodégénératives liées au vieillissement.

5247. La Dinde est un animal élevé à grande échelle, partout dans le monde, et qui fournit une source protéines de qualité à un coût modéré. L'Entérite Hémorragique de la Dinde est une maladie virale qui atteint les élevages et peut occasionner des pertes importantes chez les animaux en croissance. Un vaccin existe, il est constitué par une solution fabriquée à partir d'une souche avirulente du virus.

L'objectif de ce projet est de produire la matière première pour la fabrication de vaccins vétérinaires contre le virus de l'entérite hémorragique de la Dinde (DMH et DMHi).

Cette demande d'autorisation entre dans le cadre d'un transfert d'activité.

Pour la production et la multiplication de la souche vaccinale, des Dindonneaux sont infectés par ce virus, puis, conformément aux exigences réglementaires, on prélève la rate de ces animaux, dans laquelle se concentre le virus, à la fin de la période d'incubation. Ces rates contenant le virus seront envoyées au client et serviront de matière première à la réalisation du vaccin contre la souche EHD. L'infection par cette souche de virus ne provoque aucun symptôme chez les animaux utilisés pour la production de vaccin.

Cette production devrait nous amener à utiliser 154 500 sur les 5 années à venir. C'est le nombre minimum d'animaux nécessaires pour obtenir le nombre de doses de vaccin nécessaires sur 5 ans sur le marché mondial.

La production de la souche virale vaccinale chez l'animal vivant est actuellement la seule technique valide, permettant une production à grande échelle, et c'est celle qui est reconnue par les autorités de santé. Au cours de la période d'infection, les animaux sont maintenus dans des conditions comparables à celles que l'on rencontre dans les élevages de Dindes, avec des conditions d'hygiène et de confinement renforcées. Un suivi sanitaire très attentif est mis en œuvre. Un personnel spécialement formé est affecté au soin et à la manipulation des animaux pour leur éviter tout stress qui pourrait être nuisible à leur santé.

Le vaccin est utilisé en routine dans les élevages de dindes en France et à l'étranger (Italie).

5248. La majorité des maladies infectieuses émergentes dans le monde sont causées par des virus transmis par des insectes (arboviroses), dont beaucoup sont transmissibles aux hommes et aux animaux (zoonoses). Dans ce projet, nous nous intéressons en particulier aux virus chikungunya et RossRiver. L'infection par ces deux alphavirus entraîne, après un délai d'incubation de 2 à 10 jours, des atteintes articulaires variées, fréquemment accompagnées maux de tête, de fièvre, de douleurs musculaires importantes, d'éruption cutanée au niveau du tronc et des membres, d'inflammation d'un ou plusieurs ganglion(s) lymphatiques cervicaux ou encore de conjonctivite.

Des études antérieures réalisées in vitro ont montré que les cellules souches musculaires (appelées cellules satellites) peuvent être infectées par le virus chikungunya, alors que le virus n'est plus capable d'infecter des cellules musculaires en cours de différenciation. Une étude histologique a montré que des fibres musculaires étaient infectées après injection du virus RossRiver. Ce projet a pour objectif d'étudier les conséquences fonctionnelles de cette propriété et de tester si l'infection par le virus est susceptible de perturber ou de retarder le processus de régénération qui est initié après une blessure musculaire.

Les expériences qui pouvaient être réalisées in vitro l'ont été et nous avons besoin de recourir maintenant à un modèle animal pour étudier les conséquences fonctionnelles d'une infection sur la régénération musculaire dans un organisme entier. Nous avons l'expérience d'un modèle d'infection de la souris par les virus chikungunya et RossRiver. Nous mettrons à profit un modèle de lésion musculaire par le froid qui est parfaitement maîtrisé par d'autres équipes, en appliquant en particulier toutes les mesures mises au point pour limiter l'impact de la procédure sur le bien-être des animaux. Nous aurons ainsi recours à des antalgiques puissants pour réduire au maximum la douleur induite par la lésion musculaire. Le nombre d'animaux a été calculé en prenant en compte les différentes conditions expérimentales testées et des effectifs nécessaires à l'obtention de résultats solides. Au total, ce projet utilisera 192 souris dans une procédure de sévérité modérée. Il apportera des données importantes pour une meilleure compréhension des conséquences de ces maladies infectieuses qui touchent plusieurs centaines de milliers de personnes.

5249. Un dogme central en neurobiologie a été remis en cause par la découverte de cellules souches neurales, qui se divisent tout au long de la vie du sujet et qui donnent naissance à des « pré-neurones ». Ces « pré-neurones » migrent ensuite pour atteindre une région du cerveau où ils s'intègrent dans un réseau neuronal préexistant. Cette production neuronale postnatale a été observée chez

les poissons, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux, les rongeurs et les primates, y compris l'homme. Les jeunes cellules contribuent alors aux fonctions propres de la structure cérébrale intéressée.

Pour mieux comprendre la neurogenèse adulte, nous avons choisi au laboratoire d'étudier le système olfactif des souris. Ce choix est pertinent dans la mesure où cette modalité sensorielle est très importante chez les rongeurs. Le bulbe olfactif, premier relai du traitement de l'information olfactive, est une cible majeure de cette neurogenèse permanente.

Nous voulons étudier dans ce projet la connectivité des néo-neurones du bulbe olfactif, notre hypothèse étant que les néo-neurones formés à l'âge adulte et ceux formés au cours du développement ne sont pas connectés de la même manière avec d'autres structures cérébrales. Ces néo-neurones pourraient alors potentiellement être activés de manière différentielle. De plus, l'apprentissage olfactif pourrait également être à l'origine d'une divergence de la connectivité chez ces deux populations de neurones.

Malheureusement, à l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour tester la perception et la mémoire olfactive. La réalisation de ce projet nécessitera l'utilisation de 2720 souris males. Notre objet d'étude étant la neurogenèse chez l'adulte, on utilise dans ces expériences des jeunes souris adultes (8 semaines). Cependant, il faudra comparer les rôles spécifiques de ces neurones générés chez l'adulte avec ceux des neurones produits dans le cerveau post-natal (neurogenèse post-natale). Pour ce faire, des souriceaux de 6 jours seront utilisés.

Ce nombre d'animaux est le minimum requis pour la réalisation des études statistiques ultérieures, qui permettront une évaluation pertinente de l'effet des différentes conditions expérimentales sur les connexions établies par ces nouveaux neurones. Tous les efforts techniques seront mis en place pour minimiser au maximum toute douleur et tout inconfort de l'animal. La procédure utilisée à un degré de gravité modéré.

Les bénéfices attendus du projet sont de mieux appréhender d'une part la manière dont les néo-neurones formés à l'âge adulte établissent des connexions avec d'autres structures cérébrales, et d'autre part comment l'activation de ces connexions pourrait être à l'origine d'une amélioration de l'apprentissage olfactif.

Une meilleure connaissance des mécanismes de neurogenèse adulte pourrait alors permettre dans le futur la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques pour contrôler cette production neuronale, dans le but de restaurer les fonctions cérébrales de patients accidentés ou atteints de maladies neurodégénératives. Dans le domaine complexe des neurosciences modernes, un défi majeur des chercheurs est alors de comprendre précisément les mécanismes qui assurent le guidage et l'intégration fonctionnelle de ces nouvelles cellules dans un réseau neuronal actif, et de déterminer les conséquences physiologiques de cette production neuronale permanente.

5250. Les cellules « natural killer » (NK) sont bien connues pour leur rôle anti-cancéreux alors que leur rôle au cours d'une infection ou d'une inflammation n'est pas suffisamment exploré. Les cellules NK sont présentes dans la moelle osseuse, la rate, le sang, mais aussi dans des compartiments comme les poumons ou la cavité péritonéale. Selon le compartiment d'origine des cellules NK, les caractéristiques de ces dernières peuvent être différentes. L'objectif de ce projet est de mieux caractériser les cellules NK selon les tissus ou les compartiments où elles se trouvent à l'homéostasie et d'analyser leurs rôles et/ou les implications, ainsi que l'influence de la provenance des cellules NK (tissus ou compartiments) lors d'une infection (injection de bactéries vivantes) ou d'une inflammation généralisée (injection de produits microbiens non infectieux).

Ces études apporteront une meilleure connaissance de l'action de ces cellules dans les différents compartiments et lors des différents processus infectieux ou inflammatoires, et permettront d'identifier des nouveaux marqueurs ou de nouvelles cibles thérapeutiques dans ces domaines.

Pour ces études, nous utiliserons comme modèle des souris consanguines ainsi que des souris génétiquement modifiées de sexe mâle et âgées entre 7 et 10 semaines.

Le recours à l'animal est nécessaire car l'analyse des cellules immunitaires ne peut se révéler fructueuse que si ces cellules dérivent d'un animal. Il n'existe pas de lignées de cellules NK satisfaisantes. L'usage de la souris permet d'aborder l'étude de cellules dérivant de compartiments différents, alors que l'analyse chez l'homme se limite généralement aux cellules du sang. De plus, cela nous permet également d'analyser les modifications des caractéristiques des cellules NK lors de ces processus infectieux ou inflammatoires sur plusieurs semaines.

Les procédures expérimentales mises en place pour ces études sont au nombre de 4.

Ce projet occasionnera les signes cliniques suivants: prostration voire inactivité, hypothermie, diarrhée, perte d'appétit, perte de poids. Le niveau de sévérité est de léger à sévère selon les procédures.

Le nombre de 1843 souris que nous estimons nécessaires repose sur notre expérience de la conception d'études de ce type. Un biostatisticien a été consulté pour être sûrs d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaires pour atteindre l'objectif fixé.

Les souris seront maintenues dans un environnement protégé pour réduire le risque d'infection. Elles seront hébergées en groupe, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification. Les animaux infectés seront mis à mort dès que les points limites qui ont été définis seront atteints

5251. Ce projet s'intègre dans la formation initiale des nouveaux techniciens animaliers de l'entreprise. L'apprentissage et la maîtrise de certains gestes techniques sont nécessaires pour que le technicien soit à même de prendre soin des animaux et de réaliser les actes techniques correctement. Ce projet ne peut être réalisé que chez l'animal vivant; une fois la connaissance théorique acquise, les méthodes de contention et de manipulation ne peuvent être maîtrisées qu'après avoir été réalisées chez l'animal. Environ 200 animaux (en majorité des lapins, mais aussi des dindes et des chats) seront nécessaires pour former les futurs techniciens pour les 5 prochaines années.

Les techniciens, sous supervision d'un tuteur expérimenté, mettent en application les connaissances théoriques qu'ils ont acquises et observées durant leur formation initiale. Ils acquièrent ainsi des savoir-faire pour la contention, l'examen, les prélèvements sanguins et les injections. Cette mise en pratique est réalisée sur des animaux destinés à être réformés (essentiellement des lapins) ; ainsi aucun animal ne sera élevé qu'à cette seule fin, ce qui contribue à la réduction du nombre d'animaux nécessaires. Le tuteur veille au respect des règles de contention des animaux et à la bonne exécution des manipulations réalisées; le stress et la souffrance sont donc très limités. La surveillance de l'animal par le tuteur durant la manipulation permet le cas échéant d'interrompre celle-ci si elle induit un stress ou une souffrance chez l'animal. Les manipulations les plus invasives sont réalisées sous anesthésie générale. Les animaux sont ensuite euthanasiés par surdose de produit anesthésique.

Les animaux sont hébergés en groupe ce qui réduit leur stress. Ils disposent d'enrichissements qui leur permettent de s'occuper et d'exprimer des comportements spécifiques de l'espèce (par exemple, des blocs à ronger pour les lapins, et des plateformes pour se placer en hauteur).

5252. Plusieurs procédures chirurgicales seront utilisées dans le cadre d'études d'efficacité ou de toxicologie. La réalisation d'expériences chez l'animal dans le cadre du développement non-clinique est incontournable afin d'évaluer l'activité des produits dans des organismes complets et complexes (Remplacement). Nous appliquons donc cette stratégie après avoir réalisé les tests *in vitro* au préalable ayant permis de limiter le nombre d'animaux à utiliser *in fine* (Réduction du nombre d'animaux, tout en gardant un nombre permettant une exploitation statistique des résultats). Dans tous les cas, les procédures seront réalisées sous anesthésie générale selon des techniques précisées pour chaque espèce animale concernée, associée à l'usage d'analgésiques (Raffinement des procédures).

Groupes de 5 lapins ou 10 rats, souris, hamsters et cobayes.

2 à 3 groupes d'animaux par étude. 3 à 5 études par an. Total de 2250 animaux en 5 ans.

1) Délétion osseuse :

Procédure chirurgicale consistant à forer le cartilage et/ou l'os sous-chondral au niveau de la trochlée fémorale ou autre localisation afin de tester une substance à effet chondroprotecteur ou régénératrice du tissu osseux.

Chez le rat, la souris, le lapin, le cobaye et le hamster.

2) Plaie cutanée :

Procédure chirurgicale consistant à créer une lésion cutanée d'un diamètre ou d'une dimension donnés, sur le dos, afin de tester une substance à effet cicatrisant.

Chez le rat, la souris, le lapin, le cobaye et le hamster.

3) Injection intracrânienne :

Procédure chirurgicale consistant à injecter une substance test en intracrânien selon 2 méthodes: soit en surface après trépanation du crâne, soit dans une zone du cerveau précisément identifiée par une procédure stéréotaxique.

Chez le rat, la souris, le lapin et le cobaye.

4) Thoracotomie pour injection intracardiaque et modèle d'ischémie cardiaque :

Procédure chirurgicale consistant à réaliser une thoracotomie sous assistance respiratoire afin d'injecter une substance test dans le myocarde ou de procéder à la ligature de l'artère coronaire gauche afin de créer une ischémie cardiaque

Chez le rat, la souris, le lapin et le cobaye.

5253. Les maladies cérébrales liées à l'âge sont un problème majeur de santé publique en raison de l'allongement de l'espérance de vie. Parmi elles la maladie de Parkinson, la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer, a des conséquences considérables en termes de coût et de qualité de vie des patients et de leur entourage. Le diagnostic de la maladie de Parkinson est tardif, les premiers symptômes n'apparaissant que lorsque plus de 50% des neurones dopaminergiques ont dégénéré. Les traitements actuels sont exclusivement symptomatiques, améliorent les symptômes moteurs, mais sont incapables d'empêcher l'aggravation de la maladie. Des recherches intensives visent à obtenir des traitements curatifs, de type neuroprotecteurs ou neuro réparateurs, qui n'auront d'intérêt que mis en place dans les stades précoces de la maladie. Le diagnostic précoce de la maladie de Parkinson est ainsi une nécessité, non satisfaite à ce jour, pour laquelle la méthode d'imagerie est la plus adaptée. L'objectif du projet est de développer de nouveaux outils de détections en imagerie, qui pourront à terme être utilisés en clinique pour le diagnostic précoce et le suivi de traitements de la maladie de Parkinson. Ces nouveaux outils devront être capables de se lier aux agrégats de protéines anormales (alpha-synucléine), qui s'accumulent dans le cerveau des patients au cours de l'évolution de la maladie. Ce projet concerne l'évaluation de ces outils avant de pouvoir les proposer en clinique. Pour cela, nous vérifierons s'ils se lient bien aux agrégats anormaux exprimés dans le cerveau de souris transgéniques mimant la maladie de Parkinson.

Ce projet nécessite l'utilisation de 90 animaux (60 souris mâles porteurs d'agrégats et 30 souris mâles non porteurs) pendant 3 ans.

Nous espérons évaluer 2 traceurs par an soient environ 6 traceurs sur 3 ans.

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

Remplacement :

Cette étude de caractérisation *in vivo* sur des rongeurs ne peut être substituée par une méthode alternative *in vitro* ou sur cellules. En effet, le traceur doit être capable de franchir la barrière hémato encéphalique pour se fixer aux agrégats cérébraux, après une injection en intraveineuse.

Réduction :

L'utilisation de l'imagerie permet de réaliser une cinétique d'accumulation du traceur dans différentes régions cérébrales et à différents temps (par exemple, suivi d'un animal durant 180 min). Sans cette technique il faudrait sacrifier plusieurs animaux à différents temps (par exemple à 30, 60, 120 et 180 min).

Les cerveaux des animaux passés en imagerie seront ensuite utilisés pour des analyses d'immunohistochimie et d'autoradiographie pour confirmer la présence des agrégats protéiques d' α -syn.

Raffinement :

Le nombre de souris par cage de 800 cm² sera décidé en fonction de leur répartition lors de leur livraison, afin de ne pas induire de stress lié à la rencontre d'autres congénères. Les animaux auront un enrichissement varié (« Nestlé », tunnel en plastique, « mouse smart home »). Les points limite seront évalués chaque jour en prenant en compte les critères suivants : le mauvais état du pelage (poils ébouriffés, perte excessive de poils), perte de poids rapide ou progressive de 20% par animal ainsi que des anomalies de la motricité compliquant la prise d'eau ou de nourriture.

5254. Une mémoire précise de notre environnement spatial est essentielle pour notre survie, car notre vie quotidienne repose sur notre capacité à retenir et à retrouver des repères spatiaux importants, tels que nos domiciles ou nos lieux de travail. Une région du cerveau, appelée l'hippocampe, est essentielle pour la représentation de l'espace dans le cerveau des mammifères. Curieusement, l'hippocampe est également l'une des rares régions du cerveau où de nouvelles cellules nerveuses sont générées tout au long de la vie dans la plupart des espèces de mammifères étudiées à ce jour, y compris les humains. Bien que l'hippocampe joue un rôle de premier plan pour le fonctionnement du cerveau, nous ne savons toujours pas comment des nouvelles traces mémorielles sont formées et comment des traces mémorielles stockées sont rappelées par les cellules nerveuses nouvellement générées et matures dans le cerveau adulte.

Ce projet vise à aborder cette question en enregistrant et en manipulant directement l'activité des cellules nerveuses nouvellement produites et matures dans le cerveau adulte de souris qui naviguent dans un environnement virtuel en utilisant 3 procédures différentes : de l'électrophysiologie, de l'imagerie 2-photons, et de l'imagerie à champ large.

L'électrophysiologie nous permet d'enregistrer directement les signaux qu'un neurone individuel reçoit des autres neurones qui l'entourent à travers de contacts spécialisés nommés « synapses ». Pour comprendre comment ces signaux synaptiques activent les cellules individuelles, nous enregistrons de changements minuscules du potentiel à travers les membranes neuronales.

L'imagerie nous donne la possibilité d'observer et visualiser simultanément l'activité de plusieurs neurones, ce qui nous permet de comprendre comment l'activité d'un neurone est reliée à l'activité des neurones qui l'entourent, et comment les informations qui entrent dans l'hippocampe sont traitées par les circuits neuronaux.

Finalement, l'électrophysiologie aussi bien que l'imagerie nous permettent de manipuler l'activité des neurones d'une manière spécifique, par exemple par injection de courants dans les neurones. Ces manipulations nous permettront d'établir un lien de causalité entre l'activité du cerveau au niveau microscopique et la formation et le rappel de mémoires.

Pour pouvoir utiliser nos instruments d'enregistrements qui ont un poids et un volume considérable, nous utiliserons un appareil de réalité virtuel. Les animaux seront fixés par le crâne, mais pourrons bouger sur une roue pour rongeur. Le mouvement de la roue est transmis à l'environnement virtuel, ce qui permet aux souris de jouer à un jeu vidéo immersif.

Les souris sont un organisme modèle approprié pour ce projet, car elles peuvent être entraînées à des tâches de mémoire spatiale, elles produisent de nouvelles cellules nerveuses dans l'hippocampe, et elles sont accessibles à des techniques avancées d'enregistrement.

Le recours à l'animal est nécessaire car nous n'avons pas suffisamment d'informations pour étudier les mécanismes cellulaires de la mémoire avec de la modélisation informatique. Pour obtenir ces informations, il nous faut donc employer des animaux qui effectuent des tâches de mémorisation.

Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire, 1700 sur 5 ans pour 3 procédures et 7 expériences, repose sur notre expérience de la conception d'études de ce type. Nous nous servons de la biostatistique pour nous assurer que nous utilisons le nombre minimum d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé.

Ce projet peut occasionner des effets dommageables pour les animaux. L'implantation d'une fixation crânienne sous anesthésie générale peut très rarement être douloureuse après l'opération. Nous utilisons un régime analgésique pour éviter les douleurs. Il y a un risque d'infection et de saignement autour de l'implant, et l'implant peut se détacher du crâne. Nous utilisons des techniques de chirurgie aseptiques pour réduire ce risque à un minimum. Pour éviter que les souris ne soient stressées lors de l'entraînement dans l'environnement virtuel, nous leur administrons des récompenses. Le niveau de sévérité attendu de ce projet est modéré. Les animaux seront euthanasiés à la fin de l'étude.

Les souris seront maintenues dans un environnement enrichi avec des roues, des tunnels et des maisonnettes. Elles seront hébergées avec une litière appropriée et des matériaux de nidification. Si des animaux dépassent les points limites fixés pour ce projet, ils seront immédiatement euthanasiés (événement très rare).

Le bénéfice attendu du projet est une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires qui nous permettent de stocker et de rappeler des traces mémorielles. Cela nous permettra de mieux comprendre et finalement traiter des maladies dévastatrices qui affectent l'hippocampe et la mémoire, telles que la maladie d'Alzheimer.

5255. La shigellose est une maladie infectieuse d'origine bactérienne qui se caractérise par une gastro-entérite aigue transmise par voie féco-orale. Chaque année, elle tue plus de 600 000 personnes dans le monde, essentiellement des enfants de moins de 5 ans dans les pays en développement (PED). La shigellose est causée par quatre espèces de bactéries : *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* et *S. sonnei*. Les infections avec les différentes souches sont réparties géographiquement selon le niveau de

développement socio-économique des pays : *S. flexneri* est la souche la plus prévalente dans les PED tandis que dans des régions industrialisées, elle a été remplacée par *S. sonnei*. Ce projet vise à mettre en place un modèle murin de l'infection par Shigelle dans le côlon et d'étudier dans un deuxième temps les causes moléculaires de la colonisation et du pouvoir inflammatoire des Shigelles dans l'intestin murin et de trouver des explications à cette stratification géographique.

Une meilleure compréhension de cette maladie permettra, dans le long-terme de mieux lutter contre cette grave maladie qui mène toujours à des milliers de morts chaque année. De plus, un modèle d'infection gastro-intestinale permettrait à moyen terme de tester des vaccins dans un modèle plus proche de la réalité que les modèles utilisés en ce moment (infections des poumons des souris).

Le recours à des animaux est indispensable vu que l'intestin représente un environnement très complexe comprenant des facteurs qui inhibent la colonisation des pathogènes, telle que le microbiote résidant, la couche de mucus sécrétée et les réponses immunitaires.

Dans le cadre de ce protocole, des souris, mâles et femelles, âgés entre 3 et 7 semaines seront utilisés. Trois lignées de souris (Balb/c, C57BL/6 et C3H) seront utilisées. Les infections seront testées dans ces trois lignées, car il est décrit que leurs réponses immunitaires diffèrent et qu'il est donc possible que l'infection par Shigelle ne montre un phénotype que dans certaines de ces souches de souris.

Ce projet comporte trois procédures expérimentales de sévérité modérée. L'inoculation par voie orale (gavage) des souches bactériennes est susceptible de provoquer un léger stress chez les souris. Pour éviter les fausses-routes, la souris gavée ne doit pas être anesthésiée. Le stress qui pourrait provenir du gavage est limité car le geste est réalisé par un expert dans ce genre de manipulation qui fait en sorte que cette étape soit rapide.

L'infection des souris par le pathogène *Shigella* pourrait, selon les conditions utilisées induire un stress conséquent avec un état de faiblesse important et des diarrhées.

Les souris resteront pendant toute la durée de l'expérience dans leur environnement habituel et ne seront jamais isolées afin de garantir des interactions sociales et pour diminuer le stress. En plus, avant l'expérience, nous habituerons les animaux à l'environnement de l'animalerie et aux expérimentateurs.

Après infection, les souris seront sous surveillance accrue et leur état général sera observé au moins deux fois par jour pour intervenir, si nécessaire, si les points limites sont atteints avant la fin de l'expérience.

Le nombre d'animaux utilisés sera restreint à un strict minimum et n'excédera pas 7182 souris.

5256. Les vecteurs lentiviraux (VL) dérivés du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) sont des vecteurs vaccinaux particulièrement efficaces pour l'induction de réponses immunitaires. Cependant, un défi à relever pour l'utilisation de ces vecteurs en médecine humaine est d'assurer leur totale innocuité. En effet, la première génération de VL utilise un génome vecteur qui a la capacité de s'intégrer dans le génome de la cellule et qui peut donc potentiellement engendrer des mutations délétères. Différentes stratégies visant à améliorer la sécurité de ces vecteurs lentiviraux intégratifs (VLI) sont en développement, mais la meilleure solution est de s'affranchir de l'étape d'intégration en utilisant des vecteurs lentiviraux non intégratifs (VLNI). Les VLNI permettraient une expression transitoire du gène vaccinal dans les cellules en division et une expression stable dans les cellules qui ne se divisent pas comme les cellules dendritiques (DC) qui sont des cellules clés pour la mise en place d'une réponse immunitaire.

Le but de ce projet est de confirmer les réponses immunitaires induites par les VLNI et d'optimiser celles-ci de manière à ce qu'ils soient au moins aussi efficaces que les VLI pour induire des réponses immunitaires à long terme. Ces améliorations pourraient conduire à l'utilisation des VLNI comme vaccins prophylactiques et thérapeutiques. Pour comparer les réponses immunitaires, nous devons tester les VLNI dans un organisme vivant. Des études préalables ont montré que l'injection de VL n'induit aucune pathologie chez les souris. Nous utiliserons donc ces dernières pour définir la construction lentivirale la plus efficace et la plus sûre en termes d'innocuité.

Une première procédure expérimentale permettra la comparaison de l'immunogénicité des vecteurs VLNI et VLI. Pour cela, plusieurs doses de vecteurs seront utilisées et les réponses immunitaires seront comparées en termes de cinétique, d'intensité de réponse et de dose/réponse chez des souris femelles adultes. Cette procédure de sévérité modérée définira les points d'étude de la réponse immunitaire afin de limiter les prélèvements et le nombre de doses et donc de souris à injecter dans les procédures suivantes.

Des expériences préliminaires *in vitro* ayant montré que les VLNI induisaient une plus faible intensité d'expression de l'antigène vaccinal, il est probable que ces VLNI de première génération seront moins immunogènes *in vivo*. C'est pourquoi nous prévoyons une deuxième procédure expérimentale de classe légère dans laquelle deux séries d'expériences seront réalisées. Tout d'abord, dans une première expérience, les deux catégories de vecteurs seront modifiées afin d'optimiser l'expression du gène vaccinal. Les nouvelles constructions seront d'abord vérifiées *in vitro* sur des lignées cellulaires et des DC primaires pour valider le gain d'expression. La meilleure construction de chaque catégorie de vecteur sera testée chez la souris et comparée aux vecteurs de première génération. Les doses de vecteurs à injecter et les points d'étude de la réponse immunitaire définis lors la première procédure seront utilisés.

Ensuite, une fois le meilleur VLNI défini, de nouvelles optimisations seront réalisées pour augmenter au maximum le temps de maintien du VLNI dans la cellule dans le but d'obtenir un profil d'expression comparable à celui des VLI. Seuls les vecteurs ayant déjà fait preuve de concept dans le modèle *in vitro* seront également évalués chez la souris de manière identique à l'expérience n°1. Dans la mesure du possible, les différents vecteurs seront évalués en parallèle et les groupes contrôles partagés pour limiter le nombre de souris. Parallèlement, dans les deux expériences, l'expression des différents vecteurs sera visualisée par imagerie *in vivo* non invasive pour confirmer les résultats obtenus *in vitro* et valider la persistance de l'expression des VLNI.

Nous estimons à 560 le nombre de souris nécessaire à la réalisation de ce projet et ce, sur une durée de 5 ans. Cet effectif permettra d'obtenir des différences significatives d'un point de vue statistique et donc de garantir les résultats obtenus.

L'optimisation des vecteurs VLNI devrait nous permettre non seulement de s'affranchir des effets néfastes liés à l'intégration des VLI mais également de diminuer les doses de vecteur à injecter tout en restant aussi actif en termes d'efficacité vaccinale.

5257. La fièvre de la Vallée du Rift (FVR) est une infection identifiée pour la première fois au Kenya en 1913. Elle touche principalement les animaux d'élevage (bovins, ovins, caprins...) chez lesquels elle provoque hépatite aiguë et fièvre hémorragique. Chez les Ruminants, les jeunes et les femelles gestantes y sont particulièrement sensibles et l'infection entraîne un taux d'avortement proche de 100%. L'épizootie (épidémie atteignant les animaux) de FVR se manifeste donc habituellement d'abord par une vague d'avortements à l'origine de pertes économiques substantielles.

La FVR est aussi une zoonose, c'est-à-dire qu'elle se transmet naturellement des animaux infectés à l'Homme et vice-versa. Chez l'Homme, les personnes infectées développent généralement un syndrome grippal et entrent en convalescence 2 à 7 jours après le début de la maladie. Dans un petit pourcentage de cas (autour de 5%), la maladie évolue vers une forme plus grave avec syndrome de fièvre hémorragique, hépatite, encéphalite ou méningo-encéphalite (inflammation du cerveau et des méninges), ou encore affection de l'œil (rétinite).

Le virus responsable de la fièvre de la Vallée du Rift a été identifié pour la première fois en 1931 au Kenya. Des épidémies ont été observées depuis dans toute l'Afrique subsaharienne. En particulier, une épidémie majeure s'est produite au Kenya, en Somalie et en Tanzanie dans les années 1950-51 entraînant la mort d'environ 100.000 moutons. En 1977, la maladie a touché l'Égypte où environ 200.000 personnes ont été contaminées. Le virus a atteint l'Asie (Arabie Saoudite et Yémen) en 2000, provoquant une issue fatale dans 14% des cas humains diagnostiqués, ainsi que plusieurs îles de l'Océan Indien. Cette présence de la maladie en dehors du continent Africain suscite des inquiétudes quant à la possibilité d'une extension à d'autres parties de l'Asie et à l'Europe. Malgré les efforts menés, il n'existe actuellement ni vaccin homologué ni traitement antiviral spécifique à la FVR. Dans les cas graves, c'est un traitement symptomatique général qui est utilisé. Les premiers jours suivant l'hospitalisation sont alors critiques pour la survie des patients et l'étendue des séquelles chez les survivants. Nous pensons que le développement de traitements spécifiques à la FVR passe par une meilleure compréhension des caractéristiques de cette maladie. En particulier, nous savons que des facteurs génétiques de l'hôte contrôlent l'issue de la maladie chez l'animal et l'Homme mais la nature de ces facteurs reste inconnue. Pour identifier ces facteurs génétiques, nous disposons d'un modèle murin de l'infection par le virus de la FVR qui a déjà permis d'identifier plusieurs régions du génome impliquées dans une différence de sensibilité de l'hôte au virus.

Notre projet vise à réduire la taille de ces régions afin d'identifier les gènes qui sont responsables des différences de sensibilité entre individus au sein de la même espèce dans une même population. Nous utiliserons alors ces connaissances pour identifier des voies métaboliques et de signalisation moléculaire et cellulaire dont les variations parfois subtiles décident du sort des animaux et des hommes infectés.

Dans ce projet s'étendant sur 5 ans, nous utiliserons un nombre maximum de 1200 souris mâles et femelles âgées de 9 à 12 semaines et réparties en deux groupes : 230 souris par an dans une procédure classée sévère et 10 souris par an dans une procédure classée sans réveil. La première procédure consistera à infecter des souris avec le virus de la FVR et à comparer les symptômes présentés par des individus contenant différentes régions d'ADN susceptibles de porter la région responsable de la différence de sensibilité. Cette approche est nécessaire car elle reproduit fidèlement la maladie. Nous tirerons profit de l'expertise que nous avons accumulée depuis plusieurs années en termes de manipulation des animaux et d'analyse statistique pour limiter au maximum le nombre des animaux utilisés. Dans un souci de remplacement, la deuxième procédure vise à isoler des cellules de foie à partir d'animaux anesthésiés de fonds génétique défini. Cette seconde procédure, de classe sans réveil, permettra de recourir à des approches ex-vivo chaque fois que cela sera possible.

Dans un souci de raffinement, lors de l'infection, les souris sont placées dans l'isolateur une semaine avant l'inoculation du virus afin qu'elles s'acclimatent à leur nouvel environnement. Les animaux inoculés font l'objet d'une surveillance accrue deux fois par jour et immédiatement mis à mort s'ils présentent des signes cliniques : prostration, amaigrissement, dos voûté, poils hérissés.

5258. Les algues brunes et rouges abondantes dans les Mascareignes (Maurice, Réunion, Madagascar) représentent une source importante de polysaccharides (notamment carraghénanes et alginates) qui peuvent être valorisés de différentes façons. L'équipe isole puis modifie ces polysaccharides afin de former des unités oligosaccharidiques amphiphiles qui peuvent ensuite former des micelles permettant l'encapsulation de médicaments ou de molécules hydrophobes. L'utilisation d'une carraghénase purifiée à partir de la bactérie *P. carraegenovora* a permis à partir de carraghénanes purifiés de générer des unités oligosaccharidiques dont les propriétés physicochimiques ont été modifiées par greffage d'un polymère hydrophobe (polycaprolactone) afin de former un copolymère amphiphile capable de s'assembler en nanomicelles. L'encapsulation de molécules est possible au moment de la formation des nanomicelles, en particulier de molécules protectrices hydrophobes comme la curcumine. L'avantage de ces nanovecteurs est leur capacité à être biodégradés et à larguer progressivement leur contenu. De surcroît, la présence de fonctions alcools libre permet d'envisager de greffer sur ces nanomicelles des molécules permettant leur ciblage dans l'organisme.

Avant de modifier ces micelles pour effectuer un ciblage (tumeurs, régions inflammatoires comme une plaque d'athérosclérose ou une zone d'ischémie de type accident vasculaire cérébral ou infarctus du myocarde), il est important d'étudier la biodisponibilité de ces micelles chargés ou pas en molécule hydrophobes dans des souris contrôles. Il est en particulier indispensable de comparer la bio-distribution des molécules injectées directement par rapport aux mêmes molécules injectées après encapsulation dans les micelles. Nous pourrions ainsi évaluer un éventuel tropisme d'un organe.

Pour réaliser notre projet nous utiliserons des souris contrôles de type C57/Black 6. Un total de 12 souris sera utilisé, qui est le minimum pour atteindre notre objectif scientifique (réduction).

Nous avons besoin d'utiliser des organismes vivants entiers pour répondre à notre problématique, avec toutes leurs complexités physiologiques. Les tests in vitro utilisant les cellules en culture ont été réalisés (cellules endothéliales) montrant une absence de toxicité et une captation différente des molécules lorsqu'elles sont mises au contact des cellules seules ou bien encapsulées. Le passage in vivo est donc maintenant indispensable (remplacement).

Le modèle animal utilisé n'induit pas de souffrance. Les souris seront surveillées tout au long de l'étude, en cas d'abattement marqué persistant, nous choisirons d'exclure l'animal de l'étude (raffinement).

5259. Les lymphocytes sont des cellules immunitaires qui jouent des rôles centraux dans les défenses contre les agents pathogènes, mais aussi dans les interactions symbiotiques avec les bactéries commensales colonisant les muqueuses et la surface du corps. Comprendre les modalités des interactions entre les lymphocytes et les bactéries commensales est important car de nombreuses maladies comme le diabète et l'obésité, les maladies inflammatoires de l'intestin, le cancer, ont été associées à une dérégulation de ce dialogue. Les fonctions des lymphocytes reposent sur leur capacité à reconnaître des molécules bactériennes ou virales appelées antigènes. L'un de ces antigènes est un métabolite produit par environ 80% des bactéries, y compris par la plupart des bactéries commensales. Dans ce projet, nous cherchons à déterminer comment cet antigène microbien circule dans l'organisme, et comment les lymphocytes détectent sa présence.

Pour cela nous allons étudier la circulation de l'antigène dans des souris, et définir les paramètres qui impactent cette circulation. L'antigène ne présente pas de toxicité. Un test in vitro est utilisé pour détecter l'antigène dans les différents organes des souris. Cette étude permettra de mieux comprendre la communication qui existe entre les bactéries de l'intestin et le système immunitaire. Nombre d'animaux pour ce projet : 292 souris.

Remplacer : dans une étude préliminaire, nous avons déterminé in vitro la capacité des cellules de différents organes à capturer l'antigène étudié. Cependant ces données ne permettent pas de conclure quant à la distribution de l'antigène dans l'organisme entier. Nous souhaitons donc maintenant confirmer ces résultats in vivo. Il n'existe pas de méthodes alternatives pour réaliser ce travail qui nécessite l'analyse de tissus à la suite de l'administration d'un antigène.

Réduire : les résultats attendus à l'issue de ce projet n'ont pas été publiés à ce jour dans la littérature scientifique. Le nombre de souris à utiliser (292) a été calculé pour obéir aux minima nécessaires à des analyses statistiques valides, condition nécessaire pour une interprétation biologique des résultats.

Raffiner : Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et pour monitorer les éventuels signes de douleur, de souffrance ou de stress. Des points-limites ont été établis.

5260. Ce projet concerne l'évaluation d'un produit immunologique destiné à protéger contre certaines maladies respiratoires une espèce de carnivore domestique.

La mise en œuvre de ce projet comporte trois procédures expérimentales répétitives permettant d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de ce produit ainsi que la validation des outils permettant l'évaluation de l'efficacité.

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

- un caractère de stricte nécessité : cette procédure ne peut pas, pour le moment, être remplacée par des méthodes alternatives
- un nombre d'animaux envisagé par groupe déterminé dans le but d'obtenir des données valides. Au total, un nombre maximum de 620 carnivores domestiques sera impliqué dans ce projet ;
- un hébergement des animaux en groupe, avec présence d'enrichissement, de manière à limiter le stress
- un recours à l'anesthésie générale, si nécessaire, pour garantir le bien-être animal
- des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long des procédures ;
- des points limites adaptés et précisément définis seront appliqués afin d'éviter toute souffrance des animaux.

5261. L'objectif de ce projet est d'identifier des composés chimiques ou biologiques qui pourraient être développés comme nouveaux médicaments dans le traitement de l'inflammation du colon, maladie qui regroupe différentes pathologies comme la colite ulcéreuse, la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn. Actuellement, l'arsenal thérapeutique disponible, notamment les anti-inflammatoires, ne permet pas de soigner correctement ces pathologies lourdes, et de multiples interventions chirurgicales sont nécessaires pour retirer au fur et à mesure les portions lésées de l'intestin. Malgré leur efficacité, les anti-TNF doivent être utilisés avec précaution dans ces pathologies car ils augmentent la survenue de maladies infectieuses. Il existe clairement un besoin thérapeutique pour soigner les colites inflammatoires.

Pour réaliser ce projet, un travail important est réalisé au préalable in vitro sur des cellules humaines, ceci dans le but de sélectionner les meilleures molécules à progresser. Cependant, étant donnée la complexité des mécanismes impliqués dans les pathologies inflammatoires du colon, il est difficile de prédire le potentiel thérapeutique d'une molécule uniquement sur la base de résultats in vitro. Il est donc nécessaire d'utiliser un modèle animal qui reproduit les différents aspects de ces maladies, afin de pouvoir évaluer in vivo les meilleurs composés identifiés.

Afin de déclencher les symptômes de la colite, trois approches différentes sont envisageables, en fonction du degré d'inflammation recherché dans l'intestin, du mécanisme d'action des composés à évaluer, et le besoin d'un modèle aigu ou chronique de la maladie :

- Des souris ou rats peuvent être exposés à des composés chimiques ou entités biologiques qui vont provoquer une inflammation du colon. Par exemple, des souris RAG1 ou RAG2 immuno-déficientes, ne possédant pas de lymphocytes B et T matures, peuvent déclencher une colite aigüe après injection d'un anticorps activateur de la voie CD40.

- De la même manière, des souris RAG1 ou RAG2 déficientes peuvent développer en quelques semaines une colite chronique après injection de cellules immunitaires humaines ou murines.

Les signes cliniques attendus sont modérés (diarrhée avec présence de sang dans les selles), comme chez les patients.

Les composés chimiques ou biologiques à évaluer dans ces modèles pourront être administrés par toute voie/fréquence possible.

Une observation quotidienne des animaux sera réalisée afin de noter tout signe clinique anormal, et un avis vétérinaire sera demandé en cas de doute. En cas de signes cliniques de souffrance au-delà de ceux attendus, des points limites seront mis en œuvre.

Une analyse bio-statistique des données générées dans ce modèle rongeur sera réalisée, afin d'inclure le minimum requis d'animaux par groupe pour obtenir une réduction significative de l'inflammation du colon.

Ce projet nécessitera une utilisation moyenne de 1600 souris et de 400 rats par an, soit 10000 animaux au total pour la durée totale du projet sur 5 ans.

5262. La thérapie cellulaire constitue une avancée prometteuse pour le traitement de l'insuffisance cardiaque, un problème majeur de santé publique. Mais à ce jour, aucun type cellulaire étudié ne remplit les critères de la cellule "idéale" : capacité de réparation, facilités d'isolement et d'administration, absence de risque immunologique ou tumoral, et rapport coût-efficacité favorable.

Au cours de la dernière décennie, l'identification de différentes populations de cellules souches adultes et la démonstration de leur potentiel myogénique ont conduit à de nouvelles propositions de stratégie thérapeutique des maladies neuromusculaires telles que les dystrophies musculaires. Récemment, il a été établi qu'un grand nombre des effets attribués aux cellules souches passent par les facteurs paracrines qu'elles sécrètent, lesquels s'avèrent principalement véhiculés par les exosomes. De ces deux constats, résulte l'idée selon laquelle l'efficacité de la thérapie cellulaire pour des pathologies musculaires résulterait soit directement des cellules, soit indirectement de leurs facteurs sécrétés.

Une population de cellules souches dérivées du muscle de chien sain, les cellules MuStem, a été caractérisée. L'efficacité de leur administration systémique chez le chien dystrophique, modèle cliniquement pertinent de la dystrophie musculaire de Duchenne, a été démontrée. Des cellules MuStem humaines (hMuStem) ont récemment été isolées et des données préliminaires ont montré la contribution de ces cellules à la formation de nouvelles fibres musculaires après injection dans un muscle lésé. Des cellules murines similaires ont montré un effet bénéfique dans un contexte de lésion cardiaque. Par ailleurs, les cellules souches mésenchymateuses peuvent moduler la fonction cardiaque, principalement par l'intermédiaire de leurs facteurs trophiques véhiculés notamment par les exosomes. Toutes ces données suggèrent que des cellules souches non résidentes du myocarde pourraient constituer un support biologique intéressant pour développer une thérapie cellulaire dans un contexte de cardiopathie.

L'objectif de notre projet est de définir si les cellules hMuStem peuvent interagir avec les cellules cardiaques. Pour cela, nous analyserons :

1) *in vitro*, les interactions directes par contact entre ces populations et indirectes par les produits de sécrétion concentrés dans les exosomes des hMuStem (systèmes de coculture de cardiomyocytes et de fibroblastes cardiaques), et

2) *in vivo*, les conséquences de l'administration de cellules hMuStem ou de leurs exosomes (ExohMuStem) dans un contexte d'ischémie myocardique en termes d'intégration et de survie des cellules mais également de remaniement tissulaire et de fonction cardiaque. Cette partie du projet, qui fait l'objet de cette saisine, sera réalisée sur un modèle d'infarctus du myocarde par ligature de l'artère coronaire marginale gauche chez un rat immunodéficient (KO Rag1/Il2r α) pour prévenir le rejet des cellules injectées. Cette étude sera réalisée en 3 phases.

1. Une étude pilote déterminera les modalités d'exploration dans un modèle de rat immunodéficient. Elle portera sur la validation des modes opératoires pour les conditions i) d'anesthésie et d'induction de l'ischémie, ii) de délivrance des cellules en termes de volume administré et de densité de cellules dans la matrice dans laquelle elles sont cultivées (hydrogel). Elle permettra aussi de définir la capacité des cellules hMuStem à s'implanter dans le myocarde. Cette implantation myocardique des cellules sera évaluée deux semaines après les protocoles d'injection par une analyse histologique et une exploration immunohistochimique combinée à des techniques de biologie moléculaire. Cette étude sera réalisée sur 12 rats. En parallèle, la même étude sera réalisée sur 6 rats sauvages afin d'évaluer le niveau de réponse immunitaire après injection des cellules.

2. La seconde phase définira le dessin du protocole d'implantation des cellules MuStem et de leurs exosomes (ExohMuStem). Elle s'attachera à définir séquentiellement i) le timing entre l'induction de l'ischémie et l'administration (avec deux points : J0 et J+2), ii) le type d'administration avec deux abords (intracardiaque et intraveineux), iii) l'effet du dépôt de cellules MuStem encapsulées dans deux types de matrices et iv) l'effet de l'administration des ExohMuStem avec deux doses testées. L'évaluation sera faite après 4 semaines selon la même démarche que précédemment. 32 rats sont prévus.

3. La troisième phase consistera en l'étude fonctionnelle de la transplantation des cellules hMuStem et des ExohMuStem. En exploitant les données acquises sur la phase 2, l'objectif sera ici spécifiquement d'apprécier la capacité des cellules hMuStem ou des exohMuStem à restaurer une fonction cardiaque altérée. Cet impact sur la fonction électrique et contractile cardiaque sera étudié sur une période de 8 semaines. Des explorations fonctionnelles (électro- et échographie), tissulaires et moléculaires seront réalisées.

Quatre groupes de rats sont prévus:

1. groupe contrôle (sain, pas d'injection)

2. infarctus sans injection de cellules

3. infarctus avec injection de cellules MuStem

4. infarctus avec injection d'ExohMuStem

Un total de 9 à 12 rats par groupe est prévu soit 36 à 48 rats au total.

Respect de la règle des 3R :

Remplacement. Cette étude fait suite à une étude *in vitro* visant à évaluer la capacité de différenciation cardiaque des cellules hMuStem. Mais la différenciation de cellules dans une lignée cellulaire donnée fait intervenir d'autres partenaires cellulaires. Ces interconnexions fines entre des partenaires différents, de surcroît au sein d'un tissu lésé (infarctus du myocarde ou insuffisance cardiaque), nécessitent un niveau d'intégration qui ne peut être obtenu que sur un modèle animal.

Réduction. Un maximum de 100 rats sera nécessaire à la réalisation de cette étude. Au fur et à mesure de l'inclusion des données, des analyses statistiques seront réalisées. Si une différence statistiquement significative entre les rats traités avec les cellules hMUSstem ou les exosomes et les rats non traités apparaît avant la fin des expérimentations, celles-ci seront interrompues.

Raffinement. Les rats seront hébergés en cages ventilées enrichies de « maisons pour rats ». Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie avec une prise en charge analgésique post-opératoire adaptée.

5263. L'organisation mondiale de la santé a classé les maladies allergiques au quatrième rang mondial des affections. Cette pathologies représentent un problème majeur de santé publique en termes de qualité de vie, de perte de jours de travail, de coût médicamenteux, voire de mortalité. L'allergie ou hypersensibilité est une réponse inappropriée du système immunitaire contre un antigène inoffensif. Cette réponse a des effets néfastes sur l'organisme et peut induire des irritations de la peau, une bronchoconstriction, des lésions tissulaires, des vomissements, des douleurs abdominales, des diarrhées ou même un choc anaphylactique systémique.

Dans le contexte des allergies respiratoires, l'immunothérapie allergénique consiste en l'administration par voie sous-cutanée ou sublinguale de l'allergène identifié comme responsable des manifestations allergiques pour permettre au système immunitaire de ne plus réagir à son encounter. En revanche, lorsqu'il s'agit d'allergie alimentaire, il n'y a ce jour aucuns traitements commerciaux disponibles pour éliminer cette allergie. La seule option possible est de bannir de son alimentation, de manière stricte, l'aliment. La prévalence des allergies alimentaires (par exemple cacahuètes, œuf, lait fruits de mer...) dans la population générale étant estimée à environ 1-3 % chez l'adulte et 4 à 6 % chez l'enfant, il y a aujourd'hui un véritable besoin non satisfait chez les patients souffrant d'allergie alimentaire.

Dans le contexte des allergies alimentaires, nous recherchons des traitements par immuno-modulation. Ce projet permettra de sélectionner les principes actifs (ex : extrait allergéniques, allergènes purifiés, allergènes recombinants) et des formulations (e.g. molécules immunomodulatrices, particules) qui composeront les vaccins du futur. Avant toute étude clinique chez l'homme, le but du projet est de permettre une évaluation préclinique chez la souris de l'efficacité des vaccins développés par la compagnie.

Remplacer : Pour chaque aliment, des expériences *in vitro* ont permis de sélectionner les molécules les plus allergisantes. Il est maintenant indispensable de recourir à un animal car il est impossible de reconstruire un processus de sensibilisation/désensibilisation dans des cultures de cellules.

Réduire : Nos conditions de laboratoire font que les résultats pourront être intégrés aux dossiers réglementaires, sans avoir besoin d'être refait. Un cahier des charges précis nous permet d'éliminer des molécules à chaque étape du projet afin de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Chaque expérience inclut 8 animaux par groupes expérimentaux (ce nombre correspond aux tests statistiques requis) et 6 groupes expérimentaux. Un total de 50 expériences est planifié pour un nombre total d'animaux de 2400.

Raffiner : nous utiliserons des grilles de points limites afin de minimiser la souffrance des animaux. Ces grilles sont basées sur la littérature, notre expérience, et seront réajustées avec les paramètres que nous étudions, pour prévenir encore plus la souffrance des animaux. La gravité maximale attendue est modérée.

5264. L'intense recherche fondamentale sur les cellules RORgt+ et les lymphocytes Th17 en particulier qui a été menée depuis une dizaine d'années permet aujourd'hui d'envisager des avancées thérapeutiques significatives dans de nombreuses maladies autoimmunes telles que le psoriasis, la sclérose en plaques ou différents types d'arthrites. Cependant, des résultats décevants et même des conséquences néfastes ont été au contraire reportés dans le contexte des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) telles la rectocolite hémorragique ou la maladie de Crohn. L'engouement né de ces interventions doit donc être nuancé au regard de la complexité encore mal appréhendée de la muqueuse intestinale. Dans ce projet, nous souhaitons déterminer le rôle des gènes homologues Tmem176a et Tmem176b dans des modèles reconnus de colite chez la souris. L'expression de ces gènes à la fois dans les cellules RORgt+, les cellules myéloïdes de l'intestin ainsi que dans les cellules épithéliales intestinales suggère fortement un rôle important dans l'homéostasie de la muqueuse intestinale. Un travail fondamental chez l'animal est incontournable avant d'envisager de nouvelles approches chez l'homme en relation avec la manipulation des fonctions, encore largement inconnues, de ces gènes.

Nous avons sélectionné deux modèles de colite aiguë reconnus pour reproduire des lésions reproduisant celles pouvant être observées dans les MICI chez l'homme. Pour ces deux modèles détaillés ci-dessous, nous visons le développement d'une colite avec une perte de masse inférieure à 15% pour les souris WT et au-dessous d'une souffrance significative justifiant un sacrifice (point limite). Dans ce cadre, les souris récupèrent en quelques jours leur masse normale et ne montrent plus aucun signe d'inflammation intestinale (notamment à travers l'analyse des selles).

Colite induite par le DSS : Le DSS (dextran sulfate sodium) est un polysaccharide sulfaté couramment utilisé pour induire des colites inflammatoires chez le rongeur. L'administration de ce composé dans l'eau de boisson provoque une altération de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale. La flore microbienne est alors en contact avec le système immunitaire muqueux

ce qui génère une inflammation perdurant le temps de l'administration du produit mais réversible dès son retrait. Il s'agit donc d'un excellent modèle pour étudier les phénomènes de régénération du tissu intestinal après agression, largement dépendants des cellules immunes ROR γ t+ dans leur ensemble (ILC3, Th17 etc...).

Colite induite par le méthotrexate (MTX) : De façon similaire au DSS, le MTX induit des lésions réversibles de la muqueuse intestinale, avec une atteinte cependant plus rapide et plus ciblée sur l'intestin grêle plutôt que sur le colon. Ce modèle a permis de mettre en lumière le rôle crucial d'une population ROR γ t+ précise, les ILC3s, dans le processus de réparation.

Remplacer : L'utilisation de tels modèles animaux est pleinement justifiée encore aujourd'hui par l'absence de systèmes in vitro alternatifs permettant de véritablement intégrer la complexité potentielle des actions des gènes Tmem176a et Tmem176b dans la muqueuse colique.

Réduire : Ces modèles sont largement reconnus dans la littérature scientifique comme étant associés à une incidence synchronisée du développement inflammatoire, permettant l'utilisation d'un nombre restreint de souris par expérience afin d'obtenir une réponse rapide et pertinente. Nous prévoyons d'utiliser 120 souris dans ce projet. Il s'agit cependant d'une estimation très haute puisque les expériences impliquant des analyses biologiques ne seront mises en œuvre que lorsque des expériences initiales de suivi de signes cliniques le justifieront.

Raffiner : Les souris utilisées dans ce projet sont générées à partir d'élevages locaux qui intègrent systématiquement de l'enrichissement. Le bien-être des souris en élevage est assuré par une inspection quotidienne. Les procédures expérimentales impliqueront un suivi quotidien des souris et, lorsque cela sera nécessaire, des mesures antalgiques seront mises en œuvre afin de limiter la souffrance des animaux.

5265. Nous avons découvert que des molécules à base de sucres et de lipides peuvent empêcher une réaction inflammatoire dans des cellules en culture, en réponse au lipopolysaccharide (LPS), un constituant des membranes bactériennes. Nos études réalisées avec des cultures cellulaires ne peuvent pas remplacer un organisme entier. C'est pourquoi nous souhaitons tester si ces composés sont aussi capables d'agir dans un organisme vivant, donc de protéger l'animal contre une inflammation induit par le LPS. En particulier nous cherchons à déterminer (i) quelle est la dose efficace, (ii) si l'addition conjointe de 2 molécules actives appartenant à 2 familles distinctes confère une meilleure protection qu'une molécule seule et (iii) si la protection est « thérapeutique », c'est à dire si les molécules sont efficaces lorsqu'elles sont administrées après un délai suivant le LPS.

Nous utiliserons des souris de laboratoire, dites sauvages. Les tests in vitro préalables montrant l'efficacité de ces molécules nous permettent de n'utiliser que 8 animaux par groupe, ce qui est le minimum nécessaire à une étude statistique fiable. Le nombre total maximum sera de 330 souris. Les prélèvements sanguins seront effectués sous anesthésie générale par des personnels compétents. Les animaux seront hébergés en groupe sociaux dans un environnement enrichi et observés quotidiennement. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement, et nous efforçons de réduire au mieux une éventuelle souffrance des animaux par des mesures antalgiques appropriées.

5266. La technique de thermo-ablation par micro-ondes (TAMO) guidée par l'imagerie est une méthode mini-invasive de traitement des cancers qui est maintenant reconnue comme une option thérapeutique valable pour les tumeurs solides de petite taille (<5 cm).

Pour ceci faire, une sonde (généralement une aiguille) qui génère une radiation électromagnétique de type micro-ondes, est placée par voie percutanée au centre de la tumeur sous contrôle de l'imagerie, généralement le CTscanner pour le poumon.

L'avantage majeur de TAMO est qu'il est très efficace pour la destruction tumorale tout en préservant le parenchyme pulmonaire en ne produisant qu'une atteinte très limitée du poumon environnant. Ceci est de grande importance quand le patient n'a qu'une faible réserve pulmonaire. La méthode, qui évite la thoracotomie aux patients, peut être appliquée à différents endroits pour les lésions multifocales.

Le principe de la méthode est de produire une élévation suffisante de la température pour "tuer" les cellules dans la zone traitée. Cette hyperthermie focalisée est réglée par l'intensité et la durée de la radiation. Cependant, un phénomène contrarie l'efficacité de TAMO: une dispersion thermique peut-être due à la circulation sanguine au voisinage de l'aiguille, c'est le "heat sink effect": le sang circulant absorbe et évacue plus ou moins de la chaleur produite en fonction du débit sanguin, donc de la taille du vaisseau voisin de la source de micro-ondes.

Le présent programme, réalisé chez 8 porcs Piétrain sous anesthésie profonde, propose de mesurer les volumes d'ablations pulmonaires obtenues in vivo par micro-ondes à 2 intensités par tomodensitométrie et ex vivo par morphométrie quantitative sur les pièces d'exérèse pulmonaire. Les variations des zones TAMO seront analysées (2 par poumon, 32 procédures au total) en fonction de la proximité avec les vaisseaux artériels pulmonaires de calibre supérieur à 3 et 5 mm, dans le but de calibrer le "heat sink effect". Ce schéma respecte au maximum la règle des 3R grâce aux analyses tomodensitométrique et de morphométrie quantitative qui augmentent fortement la puissance et simplifient le programme de recherche.

Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, une période d'acclimatation de 5 jours sera respectée suite à l'entrée des animaux dans leur zone de stabulation. Les porcs auront une nourriture adaptée, de l'eau de boisson à volonté et seront stabulés en groupe pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire le stress dans un box de 9m² (individus de poids <50kg) avec enrichissement (cordes pendantes, chaînes, jouets et balles anti-morsure). En fin de procédure, les animaux sont euthanasiés, donc ce sont des procédures expérimentales sans réveil.

5367. Afin qu'un nouveau composé devienne un médicament sûr et efficace, un ensemble d'études expérimentales utilisant des animaux est nécessaire. Il s'agit ici d'un renouvellement d'autorisation. La règle des 3R (réduire, remplacer et raffiner) est ainsi mise en œuvre dans toutes les études. L'objectif de ce projet est la réalisation des études de toxicologie chez le chien (non rongeur) pour un produit donné en vue d'une administration unique ou répétée en accord avec la réglementation qui impose des tests précliniques sur l'animal avant le passage à l'Homme pour les essais cliniques. Le choix du chien se justifie par la nécessité d'une forte analogie entre l'animal et l'Homme et en prenant en compte les données scientifiques disponibles. De plus les études de toxicologie se font sur une espèce de rongeur et une espèce de non rongeur et dans ce cas-ci le chien est le choix le plus adapté en ce qui concerne l'espèce non rongeur. Le nombre d'animaux utilisé est adapté à la nécessité d'évaluation des résultats sur un effectif suffisant et correspond à ce qui doit être mis en œuvre pour des études réglementaires de ce type. Ce nombre est estimé à 3560 animaux. Le nombre important d'animaux utilisé s'explique par la grande quantité d'études différentes réalisées pour des produits différents. Le chien de race Beagle est une race homogène d'un point de vue des conditions d'hébergement, de plus il est facilement socialisable. Les dommages sont inhérents aux études précliniques, qui consistent à administrer des substances pouvant provoquer un effet pharmacologique ou toxique, et à surveiller pendant une période définie l'apparition d'anomalies cliniques ou physiologiques, puis à mettre à mort les animaux si des études post mortem sont nécessaires.

Le raffinement sera appliqué à toutes les phases des procédures en conformité avec les recommandations internationales publiées concernant le bien-être animal : nous veillerons aux techniques d'administration pour réduire l'inconfort des animaux, nous appliquerons des points limites précoces pour réduire la souffrance en cas de produits présentant une toxicité, nous procurerons un environnement enrichi et une socialisation des animaux en groupes. Les techniques pouvant engendrer du stress, comme un isolement temporaire, seront limitées au minimum, et la douleur sera traitée avec une anesthésie et une analgésie appropriée, sous supervision vétérinaire constante. Une démarche qualité rigoureuse, une supervision de chaque lot d'étude par le directeur d'étude concerné, ainsi que des bilans réguliers impliquant les techniciens, permettront d'appliquer toute alternative respectueuse du bien-être animal. Ils sont hébergés selon les standards en vigueur pour la durée du projet. Ils font l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. En cas de signes cliniques ayant des répercussions sur le bien-être animal, des mesures rapides et appropriées seront prises par le vétérinaire et/ou le directeur d'étude pour minimiser la contrainte expérimentale et de ce fait maximiser le bien-être des animaux. Ces études sont réalisées dans un objectif de progrès scientifique ou biomédical avec des conséquences positives sur l'Homme ou l'animal pour les produits vétérinaires. Elles permettent un gain potentiel en terme de brevet ou d'acquisition de compétences et connaissances diverses. Elles sont dommageables en ce qui concerne les souffrances plus ou moins importantes de l'animal ainsi que sur le nombre d'animaux utilisés, c'est pourquoi les interventions des vétérinaires, du directeur d'études et de la structure chargée du bien-être animal de notre établissement sont indispensables afin de réduire les dommages dans le respect de la règle des 3R.

5268. Pour homologuer des plantes génétiquement modifiées utilisées dans l'alimentation animale et éventuellement humaine, la réglementation nationale et internationale de mise sur le marché (OCDE, ANSES, EFSA, US EPA°) comporte toute une série d'études de leur sécurité allant des approches *in silico* (principalement recherche d'homologie avec des séquences protéiques connues pour leur toxicité ou leur allergénicité), des tests *in vitro* (principalement des tests de digestibilité des protéines modifiées) et également des évaluations sur l'animal de laboratoire exposé soit à la protéine soit à la plante transgénique sur des durées plus ou moins longues.

Ce projet est conçu pour évaluer la toxicité des protéines exprimées dans les plantes génétiquement modifiées administrées à des souris. Il comporte 2 types d'études de toxicologie et suivent des lignes directrices précises émanant des USA, de l'Europe, (par exemple : guidance document de l'EFSA), de la Chine, ou de l'Inde:

- Une étude aiguë à administration unique d'une forte dose de protéine (concept de la dose limite) qui est au minimum égale à 2000 mg/kg de poids corporel (OECD TG407).. Cette étude est réalisée sur les 2 sexes (6 traités et 6 contrôle de chaque sexe) et a pour but de vérifier l'absence de toxicité immédiate à forte dose.

- Une étude subaiguë à administration multiple (28 jours au minimum) à un niveau de dose égal à 1000 mg/kg de poids corporel. Cette étude est réalisée sur les deux sexes et 10 animaux par groupe. Ce type d'étude courte permet de déterminer si la protéine a un effet toxique après administration répétée. Une évaluation détaillée clinique, hématologique, biochimique et histopathologique permet d'identifier la présence ou l'absence d'effets liés à l'exposition de ces protéines génétiquement modifiées sur l'animal de laboratoire.

Un maximum de 1000 souris (200 par an approximativement) sera utilisé pour l'ensemble de ces deux procédures.

Les animaux seront hébergés avec un enrichissement du milieu adapté à leur âge et à leur espèce. Les animaux sont observés tous les jours (week-ends compris). Toutes les informations concernant les animaux sont enregistrées dans un logiciel. Des points limites ont été définis par le laboratoire, ils conditionnent l'appel à un vétérinaire du site pour un traitement ou l'arrêt précoce de la procédure. A la fin de chaque étude, une évaluation rétrospective sur le bien-être animal est réalisée par la structure du bien-être animal et le comité d'éthique.

5269. La protéine Mucdhl est une cadhérine atypique méconnue qui semble jouer un rôle clef dans la structure et la fonction de l'épithélium intestinal.

Afin de mieux comprendre l'importance physiologique intestinale de Mucdhl, encore inconnue à ce jour, un modèle murin déficient pour Mucdhl a été développé.

Les premiers résultats obtenus par notre partenaire montrent des altérations progressives de l'homéostasie énergétique, avec une altération au cours du temps de la tolérance au glucose et l'établissement d'une dyslipidémie (triglycérides et cholestérol).

Le but de notre programme de recherche est d'étudier est de poursuivre la caractérisation phénotypique de souris génétiquement modifiées (Mucdhl^{+/+} et Mucdhl^{-/-}) en mesurant notamment l'absorption intestinale de cholestérol, la lipémie postprandiale, l'excrétion fécale lipidique, l'excrétion fécale des acides biliaires, la quantification plasmatiques et hépatiques des acides biliaires, et la visualisation par FPLC des lipoprotéines circulantes.

L'analyse du métabolisme glucidique sera également réalisée à de tests de tolérance au glucose et d'une analyse in vivo de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

Le total d'animaux intégrés à l'étude est donc de 12+12 = 24.

Ce projet a été construit avec la volonté de mettre en place et de respecter « la règle des 3 R ». Seules les expériences absolument indispensables au succès du projet

seront mises en œuvre. Le nombre d'animaux nécessaires pour chaque expérimentation a été défini en fonction de nos expériences.

Nous avons pris soin d'optimiser au mieux nos expérimentations en choisissant les lignées murines les plus adaptées à l'étude.

Les procédures ont été réfléchies afin de réduire au maximum le stress et les souffrances des animaux soumis aux expérimentations.

La SBEA de nos structures d'accueil a mis en place un enrichissement dans chaque cage d'hébergement en ajoutant des lanières de papier en accordéon qui permettent aux animaux de nidifier.

De plus, pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 4 animaux/cage.

Si un mâle se retrouve dominant et attaque ses congénères, il sera isolé dans une cage individuelle.

Enfin, il n'existe pas à l'heure de méthodes ex vivo/in vitro nous permettant de remplacer l'expérimentation animale.

5270. L'autophagie est un processus permettant aux cellules de dégrader et recycler leurs composants endommagés. La machinerie autophagique est constituée de protéines ATG (autophagy-related genes). Outre son importance dans la survie en conditions de stress cellulaire (cellules à longue durée de vie, radiations, privation de nutriments), l'autophagie joue un rôle dans les réponses immunitaires. A ce titre, la modulation de l'autophagie est donc considérée comme une voie thérapeutique intéressante pour certaines maladies inflammatoires, notamment pour le lupus érythémateux systémique où l'exposition aux rayonnements UV est un facteur déclenchant de la pathologie. Ainsi, moduler l'autophagie pourrait permettre de limiter l'inflammation cutanée au cours de cette pathologie ou d'autres.

Les cellules de Langerhans (LCs) de l'épiderme sont des cellules immunitaires sentinelles, capables de détecter par exemple les infections cutanées. Elles se caractérisent par des caractéristiques uniques (auto-renouvellement, demi-vie exceptionnellement longue et résistance à l'irradiation gamma). Nous avons généré une lignée de souris présentant une déficience en ATG5, une protéine-clé du complexe autophagique, dans les LCs. Nos résultats montrent qu'une déficience en autophagie n'affecte pas l'installation de LCs dans l'épiderme, mais qu'elles disparaissent rapidement avec l'âge. Nous souhaitons à présent utiliser ce modèle innovant pour comprendre pourquoi l'autophagie semble indispensable aux LCs, et de déterminer son importance lorsqu'elles sont exposées à des rayonnements UV ou gamma.

Le nombre total de souris nécessaire à notre projet de recherche est de 200 animaux. Il n'est pas possible de remplacer les animaux par des expériences en culture cellulaire car actuellement il n'existe pas de méthodologie permettant d'obtenir des cellules suffisamment proches des LCs. Nous avons utilisé les connaissances rapportées dans la littérature afin de réduire le nombre de souris. L'analyse de nos données sera effectuée par des tests statistiques de type ANOVA/Bonferroni. Les prélèvements seront effectués sur souris sacrifiées et les injections sur souris en anesthésie générale par des personnels compétents. Nous nous efforçons de réduire, le cas échéant, une éventuelle souffrance des animaux. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement : les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans un environnement enrichi et observés quotidiennement.

5271. Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes chez les adultes. Ils sont classés par l'organisation mondiale de la santé (OMS) en fonction de leur grade de malignité (I-IV) et leur ressemblance avec les cellules gliales normales (astrocytes et oligodendrocytes). Le pronostic vital est très variable en fonction du type et du grade de la tumeur cérébrale. Les analyses génétiques et moléculaires de l'évolution maligne des gliomes ont montré qu'il existe une accumulation progressive d'altérations génétiques. Les données croissantes indiquent que ces mutations joueraient un rôle dans la gliomagenèse par leur impact majeur sur le microenvironnement tumoral engendrant des conséquences néfastes dans la réponse aux traitements. C'est pourquoi identifier ces anomalies génétiques et moléculaires permettrait d'élucider leurs implications exactes dans le microenvironnement tumoral et ouvrirait des perspectives majeures pour le développement de nouveaux traitements.

Aucun modèle cellulaire ou informatique ne pouvant reproduire le microenvironnement cérébral dans les gliomes, le recours aux animaux est nécessaire. Ce projet est réalisé en s'assurant qu'aucune angoisse, douleur ou souffrance ne soit ressentie lors de toute intervention sur les animaux. Pour cela, des protocoles d'anesthésie et d'analgésie sont définis et validés par une équipe vétérinaire. Une observation quotidienne des animaux sera effectuée pour s'assurer de leur bien-être. Des points limites et des critères d'arrêt sont prévus, en cas d'effet inattendu, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en œuvre les traitements appropriés ou décider de l'euthanasie.

Au cours de ce projet nous bénéficierons des résultats obtenus à l'aide de 3615 souris sur une période de 5 ans. Les efforts fournis afin de réduire, raffiner et remplacer sont : (i) Le nombre d'animaux sera réduit au maximum mais il doit être cependant suffisant afin d'avoir une bonne représentabilité pour l'exploitation des données générées. (ii) Les cellules tumorales cérébrales greffées

chez l'animal sont transduites par le gène de la luciférase permettant de suivre leur développement tumoral en temps réel à l'aide d'un détecteur de bioluminescence sans sacrifier les animaux de manière séquentielle et réduisant ainsi le nombre d'animaux par expérience. Et (iii) Les modèles *in vitro* existants ne permettent pas d'apporter une vision globale du microenvironnement tumoral, l'utilisation de modèles murins à des fins expérimentales est nécessaire. En effet, il n'existe pas d'alternative suffisamment prédictive, dans la mesure où le microenvironnement tumoral est complexe et fait intervenir de nombreux acteurs moléculaires et cellulaires.

5272. Le paludisme est dû à l'infection par le parasite *Plasmodium*, qui débute par une phase asymptomatique de multiplication parasitaire dans le foie, cible idéale pour des approches anti-paludiques vaccinales ou thérapeutiques. Nous étudions les mécanismes moléculaires impliqués dans l'infection du foie par *Plasmodium*, en utilisant des modèles d'infection de la souris par des *Plasmodium* de rongeurs (*Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii*). Ces modèles murins permettent d'une part de caractériser les mécanismes d'infection *in vivo*, notamment par des approches de génétique moléculaire, d'autre part d'évaluer de nouvelles approches vaccinales et/ou thérapeutiques, avant des essais chez l'homme. Ce projet vise à caractériser les mécanismes d'entrée des sporozoïtes de *P. yoelii* et *P. berghei* dans les cellules du foie, en vue de développer de nouvelles approches vaccinales contre le paludisme.

Afin d'étudier l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium*, nous utilisons deux parasites de rongeurs, *P. yoelii* et *P. berghei*, qui peuvent être transmis de façon expérimentale à la souris. Au total, le projet sur 3 ans requiert un total de 350 souris. L'utilisation d'une stratégie de tri des parasites transgéniques par FACS permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés. L'analyse phénotypique par bioluminescence *in vivo* permettra des analyses répétées dans le temps et donc de réduire également le nombre de souris utilisées. Cette méthode non invasive contribuera aussi au raffinement du protocole. Enfin, à chaque fois que possible, et notamment pour l'étude de l'entrée du parasite dans les hépatocytes, nous utiliserons des approches de remplacement reposant sur des modèles *in vitro* d'infection de cultures cellulaires.

5273. *Coxiella burnetii* est une bactérie intracellulaire stricte responsable d'une zoonose appelée la fièvre Q. La fièvre Q peut se manifester sous différentes formes cliniques notamment sous une forme aiguë ou elle peut évoluer plusieurs mois voire plusieurs années après l'épisode aigu en une maladie chronique avec des atteintes des organes profonds, en particulier les valves cardiaques. Au sein de l'hôte, le macrophage est la cellule cible de cette bactérie. *In vitro*, la répllication de *C. burnetii* dans les macrophages est associée à leur polarisation vers une réponse dite Th2 (non microbicide) caractérisée par une moindre expression de l'interleukine 12 et du TNF- α et une surproduction de l'interleukine 10.

Le gène Tbet est impliqué dans l'induction de la réponse Th1 dite microbicide, capable de détruire et d'éliminer les agents pathogènes. Des données de littérature montrent que la fièvre Q peut se manifester suite à altération de la réponse immunitaire de l'hôte. Nous pensons que la modulation de l'expression du gène Tbet pourrait être impliquée dans l'apparition et/ou l'aggravation des manifestations de cette maladie mais ceci n'a jamais été explicité ni prouvé expérimentalement.

Ce projet a pour but de clarifier le rôle du gène Tbet dans l'infection par *C. burnetii*, il est donc nécessaire d'utiliser un modèle animal où ce gène sera présent/ou absent. L'expérimentation animale est incontournable, en effet aucune étude *in vitro* ne peut permettre d'étudier le rôle du gène Tbet dans des conditions physiopathologiques. Le modèle expérimental permettrait une meilleure compréhension des facteurs génétiques prédisposant ou contrôlant la fièvre Q.

Pour réaliser notre projet des souris C57BL/6 sauvages ou Knock out (KO) pour le gène Tbet seront infectées par *C. burnetii* via la voie aérienne (la voie naturelle d'infection par cette bactérie).

Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, une étude pilote sur un effectif réduit ($n = 20$) sera effectuée dans un premier temps et servira à vérifier si les souris Tbet KO, sont sensibles à l'infection par *C. burnetii*. Si les souris Tbet KO sont sensibles à l'infection (sur la base de la charge bactérienne au niveau du sang et d'organes), nous infecterons le reste des animaux sinon le protocole sera arrêté.

Pour le confort de l'animal, un enrichissement sera mis en place à l'aide des dômes et du matériel pour nidification. Afin de maximiser les données obtenues de chaque animal, plusieurs tissus seront prélevés (sang, foie, rate, cerveau, poumons, cœur, tissu adipeux et moelle osseuse). Les critères principaux d'évaluation sont la présence des bactéries dans le sang et dans différents organes, l'étude de l'aspect histologique dans les organes (tels que foie, rate, cerveau, poumons, cœur et tissu adipeux), la réponse sérologique des souris à l'infection et l'étude de la voie de signalisation induite par le gène Tbet.

Ce projet sera réalisé dans une enceinte de sécurité microbiologique de classe 3 (NSB3) et il nécessitera au total 220 souris.

5274. Bien que peu fréquent (entre 0,2 et 0,5% ; ≈ 400 /an en France), l'accident de décompression (ADD) peut entraîner une invalidité permanente (de type hémiplégie, paraplégie ou tétraplégie), voire le décès, et représente ainsi un risque majeur chez le plongeur subaquatique. L'ADD touche non seulement les plongeurs loisir, mais aussi l'ensemble des personnes exposées à des différentiels de pression importants : patients et personnel fréquentant des chambres hyperbares, plongeurs militaires, pilotes (en cas de montée rapide en altitude), astronautes (lors des sorties spatiales extravéhiculaires), tunneliers.... Depuis les travaux de Paul Bert, il est admis que l'ADD est la conséquence de la formation de bulles dans la circulation sanguine, se comportant comme des corps étrangers. Les paliers de décompression qu'effectuent les plongeurs lors du retour vers la surface visent à prévenir cet accident en diminuant la formation de bulles intravasculaires. Cependant, des ADD continuent d'être rapportés malgré le respect des procédures de décompression, soulignant l'intérêt d'améliorer la prévention et le traitement de cette pathologie.

A l'échelle de la population, le risque d'ADD est statistiquement proportionnel à la quantité de bulles circulantes. Cette dernière dépendant à la fois de la quantité de gaz dissous dans l'organisme pendant la plongée et des cinétiques de transfert des gaz dissous

entre les différents compartiments de l'organisme : depuis les tissus (où ils sont dissous) jusqu'aux poumons (par lesquels ils sont éliminés). Or, pour une même plongée, la quantité de bulles détectées dans la circulation est variable d'une personne à l'autre. Les raisons de cette forte variabilité interindividuelle restent à ce jour méconnues.

A l'échelle de l'individu, cette relation est beaucoup moins nette, suggérant que la présence de bulles circulantes est nécessaire mais ne suffit pas à déclencher un ADD. La capacité des bulles à générer un ADD serait donc dépendante de l'intervention des facteurs individuels, innés ou acquis.

L'objectif de ce projet vise à mieux cerner les mécanismes physiopathologiques de l'ADD.

Dans ce but, au cours d'un projet précédent, des rats ont été soumis à des plongées fictives en chambre hyperbare, puis sélectionnés en fonction de leur résistance à l'ADD afin de dégager une lignée spécifiquement résistante à celui-ci. Les mesures réalisées dans ce projet ne comportent que des prélèvements post-mortem.

Le taux d'ADD ayant diminué de plus de moitié chez les rats sélectionnés, différentes procédures expérimentales sont maintenant prévues afin de caractériser le phénotype et le génotype commun de ces rats résistants. Ainsi, nous chercherons à caractériser leur fonction cardiovasculaire à deux niveaux :

- au niveau de la microcirculation cutanée (réactivité microvasculaire) par Laser Doppler.
- au niveau et de la régulation de la pression artérielle.

Toutes ces mesures seront effectuées sous anesthésie et font l'objet de cette saisine.

Ces analyses physiologiques permettront une meilleure compréhension des mécanismes de la résistance à l'ADD. Ce projet a une durée de 12 mois.

Il impliquera l'utilisation de 52 rats : 20 rats (10 mâles et 10 femelles) de la lignée résistante à l'ADD, 20 rats Wistar classiques (10 mâles et 10 femelles) servant de témoins, ainsi que 12 rats Wistar (6 mâles et 6 femelles) permettant de mettre au point la procédure concernant la mesure de pression artérielle.

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

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

5275. L'imagerie optique des tissus sur animal vivant est actuellement la seule méthode pour étudier les aspects dynamiques des processus physiologiques ou pathologiques à l'échelle subcellulaire. En cancérologie, elle représente une méthode de choix pour : 1- identifier les principaux acteurs et voies d'expression impliqués dans les processus tumoraux (angiogenèse, interactions et recrutements cellulaires, interactions avec le microenvironnement) et 2- étudier les mécanismes d'action des agents thérapeutiques et ainsi optimiser leurs modes de délivrance et les timings d'administration. Cette méthodologie nécessite la pose de chambres d'imagerie qu'elles soient crâniennes, dorsales ou abdominales. Plusieurs modèles de chambre existent mais sont développés soit par des laboratoires académiques et restent confinés à leurs propres fins de recherche, ou commercialisés (une seule société répertoriée). Pour ces derniers et finalement les seuls directement accessibles à la communauté scientifique, aucune procédure de greffe n'est décrite. Chaque groupe de recherche doit donc créer sa propre procédure de mise au point au détriment de nombreuses souris. Au laboratoire, un modèle de chambre dorsale a été développé. Sa plus-value réside, entre autres, dans sa simplicité de conception allégeant significativement son implantation chirurgicale et sa haute tolérance par l'animal (plusieurs mois de survie). De la même manière, les procédures en imagerie optique ont été optimisées sur ce modèle et suivent désormais des protocoles précis à la fois dans la prise en charge des animaux et leur maintien en conditions les plus favorables possibles, que dans les protocoles d'acquisition d'images proprement dits. Le laboratoire, en étroite partenariat avec des spécialistes en chirurgie animale, souhaite maintenant ouvrir son expertise à la communauté scientifique et ce d'autant qu'il n'existe aucune formation de ce type actuellement en France.

Ce projet répond à une demande de la communauté scientifique spécialisée dans le domaine et qui a déjà pu être précisément identifiée lors d'une première journée d'initiation que le laboratoire a organisée. Elle fera très prochainement l'objet d'une labélisation.

Cette formation comportera des volets théoriques (imagerie intravitale : intérêts et applications ; réglementation en matière d'expérimentation animale) et expérimentaux (implantation chirurgicale et imagerie sur animaux vivants). Pour ce deuxième volet, il s'agira de transmettre les gestes opératoires spécifiques à la greffe de chambre dorsale. La formation s'adresse à des personnes autorisées et qualifiées en chirurgie et en imagerie. Il s'agit de leur transmettre les gestes opératoires spécifiques à la greffe de chambre dorsale dont la maîtrise dépend de l'élasticité cutanée, du réseau vasculaire et du derme à préserver au mieux afin de garantir une greffe qui sera exploitable pour l'imagerie. Ces paramètres ne peuvent être correctement reproduits sur des fantômes plastiques de souris. De plus, les acquisitions en imagerie peuvent être biaisées par une mauvaise prise en charge de l'animal et de son monitoring. Par ailleurs, les protocoles en imagerie sont réalisés après injection intraveineuse d'un biomarqueur pour rehausser le signal des microvaisseaux. Or ce type d'expérience n'est pas réalisable sur mannequins. Pour toutes ces raisons, le recours à l'animal est indispensable dans ce projet.

Toutes les greffes chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale à l'isoflurane. Pour prévenir une hypothermie, l'animal sera placé sur une table chauffante pendant la chirurgie.

La douleur et la souffrance consécutive à la greffe seront prises en charge par :

- de la lidocaïne en sous-cutané avant incision de la peau,
- une injection d'un anti-inflammatoire non-stéroïdien en fin de chirurgie avant le réveil, et pendant 3 jours.

De l'enrichissement (type cocoon) sera ajouté dans la cage et de la nourriture gélinée sera mise à disposition après le chirurgie afin de favoriser la récupération. Les animaux seront surveillés jusqu'à leur réveil et suivis quotidiennement. Leur poids sera mesuré au minimum une fois/semaine.

Il est envisagé de conduire deux sessions de formation par an avec 10 participants/session. Pour une année, 38 souris seront nécessaires, soit 190 souris sur les 5 ans du projet.

5276. La nature de l'alimentation influence fortement les qualités sensorielles et nutritionnelles des produits carnés des ruminants. Au-delà de ces critères de qualité, les récentes crises alimentaires en Europe ont aussi révélé un besoin d'authentification de l'alimentation des herbivores. Les consommateurs européens expriment des réticences face à l'intensification des conditions de production et ils ont une image positive des systèmes herbagers à faibles intrants, d'où l'intérêt de pouvoir authentifier les produits qui en sont issus.

Les recherches récentes montrent cependant un risque accru de défauts de qualités sensorielles de la viande et de parasitisme par les strongles gastro-intestinaux chez les agneaux produits dans les systèmes herbagers à faibles intrants. Les défauts de flaveur/odeur de la viande sont liés à une production accrue de scatole dans le rumen. Ces défauts sont probablement en lien avec une proportion accrue de légumineuses dans les prairies des systèmes à faibles intrants.

Cette expérimentation a pour but d'étudier l'effet d'une complémentation avec des pellets de sainfoin au pâturage sur (i) les qualités sensorielles, notamment l'intensité des défauts de flaveur/odeur de la viande, (ii) les qualités nutritionnelles de la viande, notamment la composition en acides gras de la viande et du tissu adipeux et (iii) le niveau de parasitisme par les strongles gastro-intestinaux. Les données obtenues sur les animaux permettront aussi de compléter une base de données initiée il y a quelques années dans l'objectif de discriminer la viande d'agneaux d'herbe de celle d'agneaux engraisés en bergerie (authentification de l'origine herbagère de la viande).

Trois lots de 20 agneaux mâles de race Romane seront mis en expérimentation entre le sevrage (à environ 2 mois) et l'abattage (à environ 6 mois) : deux lots engraisés sur une prairie de luzerne, l'un recevant une supplémentation en pellets de sainfoin et l'autre non, et un lot engraisé en bergerie. L'hypothèse est que la complémentation en sainfoin devrait réduire les défauts de flaveur, améliorer la valeur nutritionnelle de la viande et réduire le niveau de parasitisme. La luzerne sera offerte en quantité suffisante pour permettre de couvrir l'ingestion volontaire des animaux. Le régime offert en bergerie comprendra du concentré (matières premières ne contenant pas de légumineuses) et de la paille. La paille sera offerte à volonté. Le concentré sera apporté à un niveau permettant d'avoir un profil de croissance moyen similaire entre les agneaux engraisés en bergerie et les agneaux engraisés sur la prairie de luzerne (sans complémentation). On ménagera une transition alimentaire de 7 jours au sevrage (augmentation progressive du temps passé sur la prairie de luzerne) pour éviter le risque de météorisation. Une prise de sang sera réalisée au sevrage, en cours d'expérimentation et à la fin de celle-ci, pour analyser les concentrations en scatole (composé responsable du défaut de flaveur de la viande), en pigments caroténoïdes (marqueurs de l'alimentation à l'herbe) et en testostérone (hormone sexuelle interagissant avec le scatole).

Le principe des 3R (remplacement, réduction, raffinement) est respecté : (i) nous travaillons sur l'espèce cible (qu'il n'est donc pas possible de remplacer), (ii) notre approche statistique préalable nous permet de limiter le nombre d'animaux expérimentaux et (iii) les animaliers en charge de l'expérimentation sur le terrain sont expérimentés et lorsque cela sera nécessaire, des mesures antalgiques seront mises en œuvre afin de limiter la souffrance des animaux.

5277. Les érythrocytoses, se manifestant par une production excessive d'érythrocytes, peuvent gêner des thromboses ou problèmes vasculaires. Elles peuvent avoir une origine génétique. Des mutations dans 17 gènes candidats qui ont été identifiés jusqu'à présent (VHL, PHD1, PHD2 and PHD3, HIF1A, HIF2A, HIF3A, FIH, BPGM, plus 8 nouveaux gènes) pourraient être à l'origine de ces pathologies. La recherche d'autres gènes candidats est en cours. Le poisson zèbre est un excellent modèle pour vérifier in vivo si les mutations dans ces gènes candidats sont vraiment responsables d'une érythrocytose. Pour ceci, les gènes humains mutés (voir ci-dessus) seront être exprimés dans des embryons par transgénése.

Pour des gènes candidats qui portent une mutation qui rend la protéine inactive, on va rendre le gène correspondant chez le poisson zèbre non fonctionnel pour obtenir des poissons knockout (KO). On invalidera les gènes candidats dans des embryons poisson zèbre avec la méthode CRISPR/Cas9.

Toutes ces lignées (poissons transgéniques qui expriment un gène humain muté ou les poissons KO) seront générées dans des embryons venant de poissons qui ont des globules rouges fluorescents (lignée de poisson Tg(GATA1:DsRed).

On s'attend à ce qu'une érythrocytose pourra être détectée par microscopie déjà chez les embryons ou larves. Une partie des embryons produisant des érythrocytes en excès seront élevés jusqu'à l'âge adulte pour obtenir la génération F1 et ensuite F2. Les embryons de ces lignées seront incubés avec des médicaments (qui seront à déterminer en fonction des gènes cibles) qui pourraient diminuer le taux de globules rouges pour obtenir un taux normal.

Pour ce projet, nous devons générer 20-100 animaux transgéniques ou animaux KO par gène candidat et des contrôles (vecteur de transgénése qui exprime un gène rapporteur fluorescent comme la EGFP). Les expériences devront être répétées au moins 3 fois pour chaque gène candidat. Nous estimons que nous allons utiliser au plus 5000 embryons/larves en 4 ans. Des points limite seront appliqués si nécessaire. Les larves et les poissons adultes seront euthanasiés à la fin des expériences par surdose de tricaine.

Le point terminal pour les larves sera le jour 10 post fécondation (dpf) et chez les adultes, l'âge d'un an.

5278. Le projet consiste à tester l'administration de molécules (oligosaccharides (glycans) issus d'hémicellulose de bois résineux) qui peuvent avoir un effet bénéfique sur le microbiote intestinal. Le projet est conçu en tenant compte des dispositions de la réglementation et en particulier du principe des 3R : « Remplacer, Réduire, Raffiner ». Avant toute expérimentation animale, les oligosaccharides ont été analysés et purifiés pour enlever toutes molécules aux effets potentiellement toxiques. Puis ces oligosaccharides ont été étudiés in vitro sur des bactéries du système digestif pour sélectionner les meilleurs candidats, réduisant ainsi le nombre d'individus inclus dans l'expérimentation animale.

L'objectif de ce projet est de trouver une molécule améliorant la santé d'un individu via une modulation de sa flore intestinale. En effet le tractus intestinal héberge une communauté microbienne complexe qui joue un rôle central dans l'homéostasie intestinale et dans la santé humaine. Le déséquilibre microbien (appelé dysbiose) est à la base de plusieurs maladies intestinales et extra intestinales. La composition et la physiologie du microbiote intestinal est façonnée dans une large mesure par l'afflux de glycans dans l'intestin, principalement à partir des sécrétions de la muqueuse de l'alimentation et de l'hôte. Le microbiote confère de nombreuses capacités métaboliques complémentaires de celles de l'hôte tel que la capacité de décomposer un grand nombre de fibre alimentaires (polysaccharides) autrement indigestes.

Puisque les espèces microbiennes diffèrent dans leurs préférences de glycans, la consommation sélective de ces nutriments peut influencer les groupes microbiens qui prolifèrent et persistent dans le tractus gastro-intestinal. Ainsi, l'utilisation de glycans diététiques particuliers peut être à la base d'une stratégie non invasive pour moduler la composition et la physiologie du microbiote (Gibson et Roberfroid, 1995).

La biomasse végétale autre que le bois a été utilisée comme source d'oligomères de glucides avec des propriétés prébiotiques (Al-Ghazzeawi et Tester, 2012). En effet, les prébiotiques actuellement commercialisés avec un degré de polymérisation (DP) essentiellement inférieur à 10 proviennent principalement d'oligosaccharides et de polysaccharides simples présents dans les plantes (Yoo et al, 2012). Jusqu'à présent, les propriétés prébiotiques de l'hémicellulose du bois sont décrites dans deux publications seulement, toutes deux à partir de 2012. Il a été montré que le galactoglucomannane, l'hémicellulose prédominante dans l'épicéa de résineux (*Picea abies*), pourrait avoir des propriétés prébiotiques, permettant la croissance des bifidobactéries, tandis qu'une fraction obtenue à partir d'hémicellulose de *Pinus pinaster*, et composée de 14 hexoses acétylés, était stimulante pour la population de bifidobactéries humaines. En conclusion, les propriétés prébiotiques des oligosaccharides dérivés d'hémicelluloses de bois demeurent inconnues dans une large mesure. Or ces molécules seront dans les années à venir disponibles en quantité industrielle, à bas coût et sans concurrence avec les cultures alimentaires grâce à l'industrie de la pâte de cellulose.

Nous avons voulu analyser l'effet des fractions d'hémicellulose de bois sur l'homéostasie du microbiome de l'intestin. Nous avons tout d'abord étudié l'effet des fractions d'hémicellulose sur quelques bactéries connues pour être bénéfiques ou nuisibles pour la santé humaine. La fraction sélectionnée suite aux tests in vitro nécessite maintenant une étude sur un microbiote complet dont la complexité ne peut être reproduite in vitro. Nous évaluons à 32 le nombre de souris nécessaires à l'évaluation globale de l'évolution du microbiote. Lorsque cela sera nécessaire, des mesures antalgiques seront mises en œuvre afin de limiter la contrainte expérimentale sur les animaux.

5279. Le trouble autistique (TA) est un trouble neurodéveloppemental qui appartient à la catégorie des Troubles Envahissants du Développement (TED) et se manifeste par une altération qualitative des interactions sociales et de la communication, et le caractère restreint, stéréotypé et répétitif des comportements, des intérêts et des activités. Ces anomalies apparaissent avant l'âge de trois ans. Leur prévalence est estimée à 1/150-1/200. L'étiologie génétique reste inexplicable pour 75% des patients. Les spécialistes pensent que le TA est causé par une interaction complexe entre la génétique et l'environnement. De plus, il n'existe aucun traitement thérapeutique. Nous avons identifié 2 gènes qui sont affectés dans des cellules de patients avec TA. Ces gènes jouent un rôle important dans le développement et les fonctions des neurones et des astrocytes, les deux types cellulaires majeurs du cerveau. Pour mieux comprendre le rôle de ces gènes dans le développement du cerveau il nous faut déterminer:

1. Quels sont les stades de développement embryonnaire et/ou néonatal pendant lesquels l'expression de ces gènes est dérégulée?
2. Quelles sont les conséquences de la dérégulation de ces gènes sur le développement et le fonctionnement cérébral?

Pour répondre à la première question, nous étudierons l'expression de ces 2 gènes au cours du développement cérébral de souriceaux exposés in utero à l'acide valproïque (VPA). En effet, l'exposition in utero à l'acide valproïque conduit à l'apparition de troubles du comportement similaires à ceux observés chez les patients avec TA.

Pour répondre à la deuxième question, nous étudierons deux nouveaux modèles de souris doubles transgéniques. Ces modèles permettent de manipuler l'expression de ces gènes spécifiquement au niveau des neurones ou des astrocytes. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum et basé sur les études déjà publiées. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Il n'existe pas de modèle in vitro ou in silico permettant de reproduire la complexité du développement cérébral. Il n'existe donc pas de méthode alternative, autre que des modèles animaux, pour réaliser ces travaux.

Au maximum 576 souris seront utilisées correspondant à 192 embryons et 384 adultes.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans le développement des cerveaux et contrôlés par nos 2 gènes. Ils pourraient permettre le développement de nouveaux traitements pour TED.

5280. *Escherichia coli* est une bactérie retrouvée dans le tractus digestif des mammifères. Certaines souches d'*E. coli* ont acquis des propriétés qui leur confèrent un pouvoir virulent et sont donc à l'origine d'infections intestinale ou extra-intestinale chez l'homme. A ce jour, la prise en charge des patients s'effectue par des traitements symptomatiques ainsi qu'une antibiothérapie

quand cela est possible. Pour certains pathotypes tels que les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), l'utilisation des antibiotiques est déconseillée car elle peut engendrer une production accrue de toxine par le pathogène et ainsi aggraver les symptômes de l'infection.

Dans le cadre d'un projet visant à développer de nouvelles stratégies préventives contre les infections intestinales à *E. coli*, des travaux sont actuellement menés pour développer un vaccin. Récemment, des antigènes de surfaces de souches d'*E. coli* pathogènes intestinaux (InPEC) ont été identifiés par vaccinologie inverse. L'objectif est désormais de tester l'impact d'une vaccination avec ces antigènes sur le devenir d'une infection à InPEC en utilisant un modèle animal. Ces expérimentations seront réalisées en utilisant des modèles murins largement décrits dans la littérature et en condition de confinement dans une animalerie de type A2. En parallèle, des animaux seront immunisés avec ces antigènes puis l'impact de cette vaccination sur la composition du microbiote intestinal, un élément clé dans l'homéostasie intestinale, sera évalué. Pour l'ensemble de ces expériences, la règle des 3R sera respectée. Les animaux seront surveillés quotidiennement et euthanasiés selon les règles en vigueur s'ils présentent des modifications physiologiques et comportementales traduisant un mal-être. Nous utiliserons un maximum de 150 animaux pour une période de 24 mois, nous permettant de caractériser précisément l'effet de l'immunisation des souris avec les antigènes d'intérêt et d'analyser l'impact sur le microbiote intestinal. Pour chacune de ces expériences, le nombre d'animaux sera réduit à son minimum tout en permettant néanmoins les analyses statistiques. Il n'existe pas de méthode alternative pour analyser l'effet d'une vaccination car il est nécessaire d'évaluer la réponse immune de l'hôte et son impact sur le devenir de l'infection *in vivo*. Enfin, ces modèles ont été largement décrits dans la littérature et sont actuellement utilisés dans notre laboratoire.

5281. L'épigénétique a pour but de comprendre l'embryologie, les cellules souches, mais aussi le cancer et le vieillissement. Le corps humain (et celui des mammifères) comprend environ 400 types cellulaires différents avec des fonctions différentes (des cellules de muscles, de foie, de peau, des neurones, etc). Toutes les cellules filles ont le même ADN que la cellule œuf d'origine mais l'utilisent différemment. Lors de la DIVISION cellulaire, les deux mètres d'ADN de la cellule sont dupliqués, enroulés dans les chromosomes, et déroulés ensuite ; la cellule mère donne deux cellules filles qui vont avoir le même ADN et l'utiliser de la même façon (une cellule de peau donne deux cellules de peau, etc). Lors de la DIFFERENCIATION cellulaire, au cours de l'embryogenèse par exemple, les cellules filles de la cellule œuf acquièrent progressivement de nouvelles propriétés. L'inverse est vrai dans le cancer où les cellules peuvent se différencier, régresser vers des propriétés plus proches des cellules souches, et en général, plus les cellules sont différenciées, plus le cancer est agressif. Ce projet a pour objet deux gènes très semblables qui codent pour deux protéines impliquées dans le marquage de l'ADN au niveau des gènes actifs. La mutation de l'un de ces gènes est mortelle chez la souris au stade de l'embryon de quelques cellules. La mutation d'un gène uniquement dans un tissu adulte n'a pratiquement pas d'effet décelable : il faut donc que les deux soient inactifs pour voir un effet dans des cellules adultes. Nous avons construit des souris génétiquement modifiées pour ces deux gènes à la fois et nous allons pouvoir provoquer la mutation dans l'épiderme de la souris. Le choix de la peau est dû au fait que (1) c'est un tissu où il y a en permanence DIVISION et DIFFERENCIATION des cellules (l'épiderme se renouvelle en permanence par multiplication de cellules qui se transforment ensuite et fabriquent différents types de kératine), (2) c'est un organe visible, c'est-à-dire que nous pourrions voir les effets de la mutation et agir au mieux pour limiter l'impact sur les animaux, et (3) enfin, c'est un tissu pour lequel il y a des modèles *in vitro* performants pour étudier la différenciation et poursuivre nos études.

REMPACER : les résultats déjà obtenus en culture cellulaire sur l'inactivation de ces deux gènes sont contradictoires, seuls les effets sur un tissu vivant permettront de valider les observations. Mais une fois ces observations faites, notre étude pourra se poursuivre par des études *in vitro*, en culture cellulaire, ou peau reconstruite, avec tous nos outils de biochimie et de biologie moléculaire.

REDUIRE : nous utiliserons un nombre minimum d'animaux vivants, nous prévoyons d'utiliser au maximum 200 animaux sur 3 ans.

RAFFINER : Ce projet est une extension du précédent qui porte le même nom.

Nous avons observé des symptômes sévères sur nos souris, probablement en raison du fait que la mutation ait aussi été induite dans d'autres tissus. Le présent projet utilise des souris avec les mêmes mutations mais les animaux sont sacrifiés sans rendre cette mutation effective. Après sacrifice nous grefferons la peau de ces souris sur des souris naturellement immunodéprimées (souris "nudes"). Les souffrances induites seront donc l'équivalent d'une coupure et d'une suture, avec un traitement antalgique approprié. Comme le greffon ne sera pas innervé, en respectant les points limites appropriés, les souris ne souffriront pas de l'induction de la mutation.

5282. Les infections bactériennes pulmonaires représentent un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Il a été établi en effet que les infections pulmonaires sont la première cause de mortalité par infection dans le monde. Ces infections, en particulier avec *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, sont d'autant plus graves que ces bactéries sont devenues de plus en plus résistantes aux antibiotiques. Certaines bactéries, responsables de pathologies graves chez l'homme, comme la mucoviscidose, sont même devenues résistantes à tous les antibiotiques disponibles. Il devient donc nécessaire d'identifier des molécules capables d'éradiquer ces bactéries et de diminuer les atteintes pulmonaires. Il est important de savoir si ces molécules sont efficaces dans les poumons des animaux vivants. Pour répondre à ces questions nous envisageons d'effectuer des études sur des animaux (souris et cobayes) dans des modèles d'infections pulmonaires par *P.aeruginosa* et *S. aureus*. Ces deux modèles animaux sont complémentaires et tous les deux nécessaires pour répondre aux questions posées. Notre projet permettra à terme de mettre au point des stratégies efficaces pour combattre les infections bactériennes pulmonaires chez l'homme.

Aucune technique de culture cellulaire ne peut remplacer la complexité des poumons et les interactions avec le système immunitaire de l'hôte. Le cobaye exprime les enzymes impliquées dans la défense antibactérienne pulmonaire et les mécanismes d'induction de ces enzymes sont similaires à ceux observés chez l'homme. Nous utiliserons les souris en parallèle pour les raisons suivantes : i) souris génétiquement modifiées au niveau des enzymes d'intérêt (il n'existe pas de cobayes génétiquement modifiés) ; ii) de par leur taille, les souris sont plus adaptées pour le suivi de la prolifération bactérienne par imagerie. Ces deux espèces sont complémentaires et toutes les deux nécessaires pour notre projet.

Le projet impliquera l'utilisation de 540 souris et 90 cobayes pour 5 ans. Le nombre d'animaux nécessaire repose sur des études statistiques effectuées après chaque expérience avec l'aide d'un biostatisticien. Nous utiliserons chaque fois le nombre minimum nécessaire pour obtenir un résultat significatif. Les animaux seront hébergés en groupe, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification.

Les études proposées occasionneront des effets délétères pour les animaux utilisés. Les poumons réagiront par une réaction inflammatoire qui peut induire un état de prostration ainsi qu'une baisse possible de température et une perte de poids. Nous ne pourrons pas utiliser des anti-inflammatoires ni des antibiotiques car ceux-ci sont connus pour interférer avec les infections. Les animaux seront euthanasiés selon les procédures en vigueur au bout de 3-4 jours après les infections. Si la perte de poids ou l'état des animaux le justifient ils seront euthanasiés avant ce délai.

5283. La résistance aux bêta-lactamines parmi les entérobactéries et les souches d'*Acinetobacter baumannii* a considérablement augmenté et pose aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Cette résistance est due à l'émergence d'enzymes capables de les hydrolyser, les bêta-lactamases et principalement à des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Parmi les bêta-lactamases, les carbapénémases sont les plus puissants mécanismes de résistance aux carbapénèmes. Ces carbapénémases conduisent ainsi à une inefficacité partielle ou totale des antibiotiques de la classe des carbapénèmes considérés comme des traitements de dernier recours.

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

Le but de notre travail est d'évaluer l'activité d'un nouvel antibiotique dans trois modèles murins expérimentaux (péritonite, sépticémie et infection de cuisse) et de comparer cette activité à un antibiotique de référence.

Trois souches bactériennes seront évaluées dans ce projet :

- 1 souche de *E. coli* productrice d'une BLSE
- 1 souche de *K. pneumoniae* productrice d'une NDM-1
- 1 souche de *A. baumannii* productrice d'une BLSE

Au cours de ce projet, 954 souris Swiss femelles vont être utilisées.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'évaluation et la comparaison de l'activité d'un antibiotique sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées in vitro (faible corrélation in vitro-in vivo) = Remplacement.

Les premiers temps de l'expérimentation consistent à la validation du modèle avec les souches à étudier, ce qui permet d'utiliser le moins d'animaux possible lors de l'évaluation thérapeutique proprement dite. Pour les évaluations thérapeutiques, le nombre de souris par groupe a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. = Réduction

Pour le Raffinement :

- Avant l'expérimentation :
 - o Choix des souches et modèles : Les souches choisies correspondent aux souches retrouvées lors des infections chez l'homme.
 - o Conditions d'hébergement : Acclimatation des animaux durant une semaine avant l'expérimentation. Assurance d'une non surpopulation dans la salle d'hébergement. Les animaux sont conservés dans des cages répondant aux dernières normes. La litière est changée 1 fois par semaine avec accès libre à l'eau et à la nourriture (alimentation spécifique pour rongeur).
 - o Détermination des points limites :
 - Si 3 signes cliniques notables (poils hérissés, dos bossu, perte de poids, isolement de certains individus par rapport au groupe, réaction de défense intensifiée, hypomobilité, respiration ralentie, paupières closes), euthanasie de la souris.
 - Si 1 signe clinique sévère (tremblements généralisés, convulsion, suffocation, cris persistants), euthanasie de la souris.
- Pendant l'expérimentation :
 - o Soins pré et post intervention : Les souris reçoivent une injection sous cutanée de 30µL de buprénorphine (0.05mg/kg ou 0.1mg/kg en fonction du modèle) 30minutes avant l'infection puis 2 fois par jour pendant 24h (modèle d'infection de cuisse) ou 48h (modèles de DL100, DE 50 et de sepsis). Après cette phase, pour le protocole de DE 50, les animaux sont observés bi quotidiennement, pesés une fois par jour et en cas d'apparition de symptômes de douleurs, le traitement sera prolongé. Sinon, arrêt de la buprénorphine et de la pesée.
 - o Les modèles sont réalisés sous anesthésie générale : inhalation continue d'isoflurane 3% débit de gaz frais 0.8L/min.
 - o Application des points limites (cf raffinement avant expérimentation)
 - o Euthanasie par dislocation cervicale après pré-anesthésie par inhalation d'isoflurane (3% débit de gaz frais 0.8L/min).

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

5284. L'obésité est une maladie multifactorielle. En dehors d'une origine génétique ou développée suite à des excès alimentaires associés à un défaut d'activité physique, des causes environnementales (polluants) ont été récemment impliquées après des expérimentations sur l'animal ou des études épidémiologiques chez l'Homme. Ainsi ces produits chimiques initialement mis en évidence pour leurs propriétés de perturbateurs endocriniens sont également capables de perturbations métaboliques. Un des mécanismes évoqués passe par les propriétés œstrogène-mimétiques de beaucoup de ces polluants. La sélection de ces polluants repose sur la volonté de mimer au plus près une « réalité quotidienne », c'est-à-dire une situation dans laquelle l'exposition aux polluants est faible mais aussi multiple avec une exposition à des polluants persistants ou non-persistants, interférant avec la voie ostrogénique, androgénique et/ou de type non génomique.

Dans un premier protocole, des souris mâles ou femelles, obèses ou minces, ont été exposées via l'alimentation à une mixture de polluants faiblement dosés. Nous avons montré que la présence d'un mélange de 4 polluants (2 persistants et 2 non-persistants) dans une alimentation soit standard soit enrichie en gras proposée tout au long de la vie, provoquait dans la descendance de 1ère génération (F1) des désordres métaboliques différents selon le régime, l'âge et le sexe. Ces désordres s'accompagnent ou non de modifications au niveau du poids des animaux.

Dans ce modèle les souris mâles ou femelles sont nourries soit avec un régime standard soit avec un régime enrichi en gras à partir de 5 semaines de vie et durant 15 semaines. La moitié des souris mâles et femelles est exposée aux mêmes régimes contenant le mélange de polluants à doses faibles, donc l'exposition aux polluants se fait via l'alimentation. Et l'autre moitié recevra les régimes sans polluants (groupes contrôles).

Les objectifs de ce nouveau projet sont d'explorer les éventuelles modifications du rapport masse maigre/masse grasse et de faire le lien avec les altérations métaboliques observées. A la fin du protocole de régime, tous les animaux seront transférés sur une plateforme possédant un analyseur par RMN bas-champ permettant de mesurer la composition corporelle (en particulier masse maigre et masse grasse) sur l'animal vigile.

Le travail avec des animaux est indispensable pour mimer au plus près la réalité d'une contamination chronique via l'alimentation comme dans l'espèce humaine. Le travail en épidémiologie sur l'Homme permet, en effet, de faire des corrélations entre les taux retrouvés d'un polluant donné et un désordre métabolique tel que l'obésité ou le diabète. Par ailleurs, le modèle murin est le modèle le plus proche de l'homme pour ce qui concerne l'induction d'une obésité et/ou du diabète de type2, suite à une surnutrition. Dans le cadre de cette étude sur l'animal, nous essayons de limiter au maximum et dans la mesure du possible, le nombre d'animaux utilisés. Dans le respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux expérimentés est ajusté sur la base de 16 animaux maximum par groupe de sorte à avoir un nombre d'échantillons permettant l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Nous étudions des souris des deux sexes soit 224 animaux au total. Des mesures de raffinement seront mises en place pour limiter au maximum le stress des animaux et contribuer à leur bien-être. Ainsi, les animaux transférés seront remis dans les mêmes groupes d'origine, une semaine d'habituation sera prévue pour l'adaptation à leur nouvel environnement, les aliments et l'enrichissement seront à l'identique de ceux de leur animalerie d'origine. Il n'est pas attendu de douleur lors de la mesure de masse grasse et masse maigre par RMN, mesure non invasive et de courte durée (2 min) néanmoins une attention particulière sera portée aux souris immédiatement après la mesure pour détecter tout stress inhabituel.

5285. Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans le monde. Les cancers du poumon non à petites cellules (CBNPC) et en particulier l'adénocarcinome, ont été subdivisés en sous-classes moléculaires grâce à une classification basée sur des anomalies génétiques dites oncogènes « drivers ». Les tumeurs porteuses de ces altérations sont dépendantes de ces voies de signalisation pour leur survie. Cet état d'addiction oncogénique implique généralement des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) qui peuvent être spécifiquement ciblés par des TKI (tyrosine kinase inhibitor) produisant des réponses cliniques importantes et durables. Plusieurs oncogènes ont été identifiés dans les CBNPC notamment EGFR (epidermal growth factor receptor), ALK (anaplastic lymphoma kinase), FGFR1-4 (Fibroblast Growth Factor Receptor) et BRAF. Les deux situations d'addiction oncogénique les mieux caractérisées à ce jour dans les CBNPC sont les mutations activatrices d'EGFR (15%) et le réarrangement ALK (4%). Les thérapies ciblant EGFR (erlotinib, gefitinib ou afatinib) ou ALK (crizotinib, ceritinib, alectinib) sont très efficaces initialement mais la très grande majorité des patients rechute au bout d'environ 12 mois.

Les mécanismes de résistance acquise aux TKI peuvent être classés en trois catégories : -1- L'acquisition de mutations secondaires sur la cible (comme la mutation T790M pour EGFR) ; -2- L'activation de voies alternatives permettant de contourner l'inhibition de la cible ; -3- Un défaut dans la mort cellulaire.

Les modificateurs épigénétiques, avec leur action sur la structure du génome (l'ADN) des cellules, influencent l'expression des gènes et, par conséquent, les changements morphologiques des cellules. Certains médicaments épigénétiques sont déjà utilisés en clinique dans les tumeurs hématologiques et plusieurs essais cliniques sont en cours pour définir leur utilité dans les cancers solides. La capacité d'inhibiteurs épigénétiques à renverser la résistance est notamment appuyée par les résultats cliniques prometteurs dans les leucémies lymphoblastique aiguë (ALL), polyléucocytaire (PLL) et myéloïde aiguë (AML). Notre groupe de recherche a obtenu des résultats fortement encourageants avec ce type de combinaison (TKI + inhibiteur épigénétique) sur des lignées cellulaires de cancer de poumon. Si confirmée précliniquement in vivo chez l'animal, cette perspective sera évaluée chez les malades afin de prolonger le contrôle de la maladie exercé par le TKI.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de la combinaison des modificateurs épigénétiques avec les inhibiteurs tyrosine-kinase chez la souris. L'utilisation d'animaux est indispensable à la mise en œuvre du projet car il n'existe aucune méthode alternative permettant de répondre à la question scientifique posée. En effet, dans le cadre de développement de nouveaux médicaments pour des populations bien définies (médecine personnalisée), il est indispensable de valider les résultats obtenus sur des cellules (in vitro) et par des modèles animaux (in vivo) avant de passer à une évaluation chez l'être humain. En effet, le développement d'un cancer est fortement dépendant du microenvironnement cellulaire. Les modèles de culture cellulaires in vitro

ne permettent pas d'intégrer ce paramètre crucial car il est actuellement très difficile de recréer un microenvironnement tumoral par des techniques de culture cellulaire. Les meilleurs modèles connus à ce jour sont les xénogreffes de lignée humaines de cellules tumorales en souris immunodéficientes.

Pour obtenir des résultats fiables et statistiquement satisfaisants, un nombre maximal estimé de 840 souris Nude immunodéprimées sera nécessaire. Un groupe placebo unique servira de témoin aux 6 traitements testés, ce qui est un point de réduction.

Enfin, de manière à assurer le bien-être des animaux tout au long de l'étude, nous prendrons les dispositions nécessaires en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance. En particulier, nous mettrons en place des méthodes pour réduire ou supprimer la douleur (anesthésie gazeuse pour toutes les expériences), l'anxiété et le stress des animaux, et nous attacherons une importance majeure au raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soin.

5286. Notre projet de recherche vise à mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent les crises migraineuses, en particulier celles avec aura, et l'impact de ces crises sur les plans cognitifs et émotionnels. En 2013, la migraine a été classée au 3^{ème} rang des affections les plus invalidantes au niveau mondial et sa prévalence a été estimée à 15%. Chez un tiers des migraineux, les maux de tête (céphalées) sont précédés de symptômes transitoires (troubles de la vue, de la sensibilité ou de la parole) qui constituent ce qu'on appelle l'aura. Notre groupe s'intéresse à un sous-type de migraine avec aura, la Migraine Hémiplégique Familiale (MHF) caractérisée par la présence, pendant l'aura, d'une paralysie venant s'ajouter aux autres troubles. Quelque soit le type de migraine, les premières crises apparaissent à la puberté et sont beaucoup plus fréquentes chez les femmes que les hommes. Les sujets atteints de migraine avec aura ou de MHF peuvent présenter d'autres manifestations cliniques tels que épilepsie, ataxie cérébelleuse, déficience intellectuelle (allant de troubles légers de l'apprentissage jusqu'à un retard mental sévère), désordres anxieux ou encore dépression. A l'heure actuelle, il est admis que le mécanisme responsable de l'aura migraineuse est une baisse transitoire de l'activité des neurones du cortex appelé dépression corticale envahissante (DCE). En revanche, l'implication de la DCE dans le déclenchement de la céphalée et de la douleur associée reste controversée. Nous disposons d'un modèle de souris optogénétiques (une technique qui permet de contrôler l'activité des neurones avec la lumière) dans lequel nous pouvons induire une DCE et ainsi étudier les conséquences de ce processus pathologique sur le fonctionnement cérébral. Afin de répondre au principe de remplacement, nous réalisons à l'heure actuelle des études sur tranches de cerveau *ex vivo*. Cependant, l'étude du phénotype comportemental associé à cette pathologie chronique nécessite des expérimentations *in vivo*. L'objectif de notre projet est de savoir si l'induction chronique de DCEs pendant l'adolescence est susceptible de conduire à l'âge adulte à des désordres cognitifs et émotionnels ce qui pourrait expliquer les ou certaines des comorbidités décrites chez les migraineux chroniques. Pour ce faire, nous allons induire de façon répétée des DCEs au cours de l'adolescence. A l'âge adulte, nous analyserons les réponses comportementales de ces souris dans différents tests permettant d'évaluer leur état émotionnel ou leurs fonctions cognitives. Une fois ces tests réalisés, les cerveaux des animaux seront prélevés afin d'effectuer des analyses permettant de relier les réponses comportementales à des mécanismes cellulaires ou moléculaires. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, le même groupe d'animaux mâles ou femelles sera soumis successivement à chacun des différents tests comportementaux. Enfin, toutes les mesures seront prises pour éviter toute souffrance ou inconfort à l'animal. Un suivi journalier tout au long de la procédure permettra d'évaluer leur état de santé grâce à une grille codifiant le niveau de douleur et ainsi d'intervenir rapidement par rapport aux points limites définis. Un nombre maximal de 130 souris sera utilisé pour cette étude.

5287. L'imagerie optique des tissus sur animal vivant est actuellement la seule méthode pour étudier les aspects dynamiques des processus physiologiques ou pathologiques à l'échelle subcellulaire. En cancérologie, elle représente une méthode de choix pour identifier les principaux acteurs et voies d'expression impliqués dans les processus tumoraux (angiogénèse, interactions et recrutements cellulaires, interactions avec le microenvironnement). Cette méthodologie nécessite la pose de chambres d'imagerie qu'elles soient crâniennes, dorsales ou abdominales. Plusieurs modèles de chambre existent mais d'aucun n'est prouvé être applicable à des suivis long terme. Or la plupart des processus biologiques se déroulent sur plusieurs jours ou semaines. Par ailleurs aucun de ces modèles n'est compatible avec plusieurs modalités d'imagerie simultanément et ne permet donc pas la collecte des différentes informations biologiques à partir de ces images sur un même individu. Face à cette lacune, notre laboratoire a développé un nouveau modèle de chambre dorsale validé pour sa haute tolérance par l'animal (plusieurs mois) et son caractère multimodal. Il permet ainsi de suivre les comportements cellulaires individuels et/ou collectifs sur un même animal au cours du temps en imagerie optique, ultrasonore, par résonance magnétique et par tomographie rayons X. Ce modèle a depuis peu été décliné dans sa version abdominale et les procédures d'implantation chirurgicale et d'imagerie doivent être donc vérifiées et mises au point sur l'animal.

Concernant la mise au point des procédures chirurgicales, les fantômes polymériques d'animaux ne peuvent être considérés comme modèle adapté car : 1- ils ne reproduisent pas finement l'élasticité naturelle de la peau, élasticité qui est un paramètre primordial dans la pose de chambres intravitales ; 2- ne permettent pas le contrôle de l'étanchéité du système et des sutures pour prévenir toute infection ou sécrétion de fluides endogènes vers l'extérieur. Leur emploi aurait été justifié si aucune expertise n'était acquise par l'équipe en chirurgie expérimentale et l'apprentissage aurait pu ainsi être initié sur fantômes. De plus, l'étape ultime du projet requiert par définition le recours à l'animal s'agissant d'étudier le suivi du développement tumoral sachant qu'aucune greffe de cellules ne peut être considérée sur ces modèles de remplacement. Le recours à l'animal est donc indispensable pour l'ensemble du projet.

Un soin particulier a été porté au bien-être de l'animal. Ainsi la chirurgie sera pratiquée sous anesthésie générale et des analgésiques seront administrés. De l'enrichissement sera ajouté dans la cage au moment du change et de la nourriture gélatinisée sera

mise à disposition après la chirurgie afin de favoriser la récupération. Les animaux seront surveillés quotidiennement et pesés à minima une fois/semaine. Leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress.

Afin de mener à bien ce projet, il est estimé un total de 65 souris. Une fois finalisé, ce projet ouvrira le champ des modèles tumoraux explorables en imagerie intravitale et non implantables selon d'autres modalités de chirurgie et d'imagerie et de mieux comprendre les processus biologiques conduisant à leur progression et dissémination de ces tumeurs.

5288. Les rétrovirus portent à leur surface des protéines capables de faire fusionner leur enveloppe avec la membrane de la cellule à infecter. Une fois libéré à l'intérieur de la cellule, leur matériel génétique s'intègre dans les chromosomes de l'hôte. Dans les rares cas où la cellule infectée est impliquée dans la reproduction, les gènes viraux peuvent être transmis à la descendance. Ainsi, près de 8 % du génome des mammifères est composé de vestiges de rétrovirus, les rétrovirus « endogènes ». La plupart sont inactifs, mais certains restent capables de produire des protéines : c'est le cas des syncytines, protéines présentes chez tous les mammifères, codées par des gènes hérités de rétrovirus capturés par leurs ancêtres.

Il a démontré il y a un peu plus de cinq ans, grâce à l'inactivation de ces gènes chez des souris, que les syncytines contribuent à la formation du placenta : grâce à leur capacité ancestrale de faire fusionner deux membranes entre elles, elles génèrent le syncytiotrophoblaste, tissu formé par la fusion de très nombreuses cellules dérivées de l'embryon, à l'interface materno-foetale.

En utilisant ces mêmes souris, il a été révélé un effet supplémentaire de la syncytine B : elle donne aux mâles une masse musculaire supérieure à celle des femelles. Comme le syncytiotrophoblaste, le muscle est en effet formé à partir de cellules souches qui fusionnent entre elles. Chez les souris mâles génétiquement modifiées, ces fibres sont 20 % moins grosses et présentent 20 % de noyaux en moins par rapport à des mâles standard ; elles sont alors similaires à celles des femelles, tout comme leur masse musculaire totale. Tout se passe donc comme si l'inactivation de la syncytine B conduisait à un déficit de fusion lors de la croissance des muscles, mais uniquement chez les mâles.

Afin d'expliquer ce rôle de la syncytine B spécifique au mâle, nous allons explorer les relations entre cette protéine et la testostérone, hormone spécifique des mammifères mâles, dans la régulation de la masse musculaire de la souris. Nous utiliserons dans un premier temps des femelles (sauvages et déficientes en syncytine B) supplémentées ou non en testostérone, pour voir si l'augmentation de la masse musculaire chez les femelles sauvages, induite par la testostérone, est abolie chez les femelles déficientes en syncytine B. Si aucune différence n'est observée, cela indiquera que la testostérone n'est pas seule responsable de la différence de masse musculaire induite par la syncytine B, et/ou qu'un environnement cellulaire mâle (gènes du chromosome Y, absence d'hormones femelles, etc...) est indispensable à l'effet de cette protéine. Nous utiliserons alors des souris mâles castrées ou non, supplémentées ou non en testostérone, déficientes ou non en syncytine B. La masse musculaire, paramètre primaire de notre étude, étant assez variable d'un individu à l'autre dans cette lignée murine (notamment en fonction du nombre de petits par portée), nous utiliserons au maximum 10 individus par groupe, soit un total de 120 animaux maximum subissant des procédures expérimentales. Les souris arrivant au fur et à mesure des naissances, ce nombre pourra cependant être réduit à 6 souris par groupe si nous ne constatons pas de variabilité du poids corporel supérieur à 10% pour les animaux sauvages, non injectés (et non castrés pour les mâles). Les souris témoins ("contrôles") seront communes aux trois procédures expérimentales du projet, ce qui constitue un point de réduction.

Dans les deux cas (femelles et mâles), l'analyse morphologique, histologique et moléculaire des muscles de ces souris permettra de mieux comprendre les mécanismes d'actions de la syncytine B dans la croissance musculaire. Les conséquences potentielles pour toutes les pathologies génétiques du muscle (bénéfice potentiel) sont importantes.

La myogénèse est un processus complexe qui ne peut pas être récapitulée in vitro sur des cellules en culture. Il est donc nécessaire de passer par une expérimentation sur souris, seul moyen de voir un effet histologique clair et mesurable de la testostérone sur le muscle. En effet, le muscle squelettique est sensible à des paramètres comme l'exercice, la nutrition, les hormones circulantes (insuline, IGF, etc...). L'ensemble de ces paramètres ne peuvent pas être reproduits in vitro ce qui rend indispensable d'utiliser un modèle animal.

Les procédures mises en place ne seront pas génératrices de douleur sur le long terme. La castration est une technique couramment effectuée sur les souris mâles et l'analgésie nécessaire au bien-être de ces animaux est bien documentée (anti-inflammatoire non stéroïdien post-opératoire dans notre cas).

5289. La schizophrénie (SCZ) est une maladie psychiatrique complexe dont la prévalence avoisine 1 % de la population générale. Elle est responsable d'un important handicap fonctionnel, mais l'origine exacte de cette pathologie reste à ce jour inconnue. Si une participation génétique est indéniable, d'autres facteurs semblent influencer la survenue de cette maladie. De nombreux travaux dans le domaine ont mis en évidence un rôle du système immunitaire. De plus, la schizophrénie pourrait être le résultat d'une altération des fonctions physiologiques neuronales pendant le développement, avec des symptômes qui se manifestent pendant l'adolescence.

Plusieurs modèles animaux ont donc été développés pour étudier le rôle de l'inflammation et des altérations neuronales pendant le développement, sur l'étiologie de la maladie. Les cellules microgliales sont les cellules immunitaires du cerveau, et elles sont impliquées dans les phénomènes de neuroinflammation. Récemment l'importance de la communication entre ces cellules et les neurones, dans le développement du système nerveux central, a été mise en évidence. La microglie est donc une cellule qui pourrait être au cœur de la schizophrénie.

On va utiliser un modèle de souris transgénique qui montre des troubles autistiques et cognitifs. Nous voulons tester l'hypothèse que ces souris pourraient montrer aussi des altérations progressives des capacités cérébrales symptomatiques de la schizophrénie.

Cela permettra de faire un lien entre des altérations pendant le développement et la progression de la schizophrénie à l'âge adolescente/adulte.

Pour cela, nous allons réaliser un test comportemental entre le 65ème et le 110ème jour post-natal, période au cours de laquelle devraient apparaître les symptômes pathologiques.

Ce test (Test d'inhibition du réflexe de sursaut) est parmi les plus utilisés dans le cadre de modèles animaux de schizophrénie pour évaluer la survenue de symptômes positifs, et de façon intéressante, il reproduit la différence observée chez l'homme entre les patients schizophrènes et les sujets sains.

Après ce test, le cerveau de ces animaux sera prélevé après leur mise à mort pour mener des analyses biochimiques et immunohistochimiques de l'expression des cellules gliales et de récepteurs neuronaux.

A titre de contrôle, les mêmes expériences seront reproduites sur un groupe d'animaux contrôles qui n'ont pas cette modification génique.

Nous voulons faire un projet pilote sur 30 animaux (15 par groupe), nombre minimum mais nécessaire (en respectant le paramètre Réduction de la règle des 3R). Si les résultats sont intéressants, nous pourrions étendre l'étude et développer le projet. Les approches comportementales de ce projet pour mesurer des déficits sensoriels nécessitent d'utiliser des animaux. Il n'y a pas d'autres méthodes alternatives que d'utiliser l'animal entier. Les animaux auront une habitude préalable faite de manipulations quotidiennes par l'expérimentateur pour réduire leur stress. De plus les souris seront habituées au nouvel environnement la veille de l'expérience.

5290. Les muscles squelettiques sont essentiels pour le maintien de la posture, la mise en mouvement du squelette, la respiration et la régulation du métabolisme. Le corps humain comprend plus de 600 muscles squelettiques dont la taille varie selon leur fonction. Les muscles striés squelettiques constituent le plus grand organe du corps humain (environ 40% à 50% de la masse corporelle d'un individu sain) et il est le plus grand consommateur d'éléments nutritifs.

L'état du tissu musculaire est un facteur crucial dans les maladies cardiovasculaires, le cancer avec la cachexie cancéreuse, le diabète, l'obésité ainsi que l'ensemble des myopathies. La fonction du muscle squelettique est également l'un des principaux facteurs néfastes pour la longévité et la qualité de vie des personnes âgées. De plus, elle peut être une source majeure de handicap moteur et est accompagnée par une augmentation des risques de chutes, de perte d'autonomie, d'institutionnalisation et de mortalité.

Au cours du vieillissement, la perte progressive de la masse musculaire squelettique est référencée sous le terme sarcopénie, laquelle est également associée à des troubles cardiovasculaires, métaboliques et cognitifs. Dans le système neuromusculaire, la sarcopénie est également liée à l'altération des jonctions neuromusculaires (JNM) qui entraîne une perte de communication entre le muscle et les neurones moteurs. L'ensemble se traduit par une incapacité du muscle à fonctionner, aboutissant au niveau moléculaire à une dérégulation de l'expression génique et de l'organisation de la chromatine.

Le modèle souris est devenu un modèle de choix dans la recherche génétique sur les mammifères en raison de ces étroites similitudes génétiques et physiologiques avec les humains, et à la facilité avec laquelle son génome peut être manipulé et analysé. De récents travaux ont établi la souris comme un excellent modèle de vieillissement humain. Elle se révèle être un système idéal pour étudier le rôle de gènes sur le plan physiologique et moléculaire et permettre d'identifier et proposer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Nous avons développé des modèles de souris génétiquement modifiées exhibant des éléments précurseurs d'un vieillissement prématuré. Afin de poursuivre la caractérisation des modèles et de comprendre les mécanismes de régulation épigénétique ayant lieu dans les cellules post-mitotiques au cours du maintien de l'homéostasie musculaire ainsi qu'au cours du vieillissement, nous souhaitons mesurer par des tests d'effort usuels si notre modèle présente une perte de force musculaire.

Pour ce type d'expérience le modèle murin reste l'unique moyen d'une part pour étudier fonctionnellement le muscle dans son entité au cours du vieillissement et d'autre part pour évaluer l'impact des défauts musculaires au niveau de l'organisme. Un nombre de 60 animaux seront utilisés pour permettre d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Chaque animal utilisé pour les tests sera exploité au maximum (tests d'activités suivis de prélèvements multiples des muscles squelettiques et autres organes en vue d'analyses biochimiques et histologiques pour des tests parallèles). Les protocoles d'efforts les moins invasifs et les moins douloureux possibles seront privilégiés. Le protocole sera initialisé par des tests couramment utilisés pour l'étude des fonctions neuromusculaires des modèles murins de maladies musculaires et neurodégénératives. Pour limiter au maximum la douleur sans remettre en cause les résultats, les procédures expérimentales seront réalisées selon un ordre précis (analyse des masses par « minispec », mesure de l'activité spontanée sur roue, course d'endurance imposée). Nous laisserons les animaux s'acclimater durant 2 semaines avant de démarrer les tests. Les animaux seront suivis de manière individuelle pendant toute la durée des analyses. La surveillance permettra de détecter tout comportement anormal (prostration, grattage, absence de toilette) lors des deux premiers tests. Pour le troisième, le tapis de course sera immédiatement arrêté dès que l'animal montrera des signes de fatigabilité ou de refus de courir.

5291. L'anticorps anti-CTLA4 a démontré une efficacité clinique dans plusieurs cancers tels que le mélanome ou le cancer de la prostate. Néanmoins, cette thérapie a un coût important, n'est efficace que chez 15 à 30% des patients et son efficacité clinique est au prix de toxicités comme des colites nécessitant parfois l'interruption du traitement.

Nous savons que l'anti-CTLA4 permet une réinduction de la réponse immunitaire qui se trouve supprimée par les cellules cancéreuses mais nous ignorons encore les mécanismes responsables.

Des résultats réalisés par notre laboratoire ont démontré que l'efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA4 était diminuée en absence de flore intestinale (que cette absence soit provoquée par un traitement antibiotique ou chez des souris sans flore dites axéniques). Ces travaux font suite à des études publiées ayant décrit l'importance de flore intestinale dans l'efficacité de chimiothérapies. Pour préciser le rôle de la flore intestinale sur l'efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA4 nous avons utilisé des antibiotiques spécifiques de certaines bactéries et nous avons précisé le type de bactéries impliquées. En leur absence l'efficacité du traitement est diminuée alors qu'en absence d'autres bactéries non impliquées l'anti-CTLA4 demeure efficace.

Nous avons en parallèle analysé les modifications de la flore intestinale induite par notre traitement, par culture des selles notamment et avons retrouvé une famille bactérienne augmentée après notre traitement. Dans cette famille, une bactérie *Parabacteroides distasonis* retient notre intérêt, en effet cette bactérie majoritairement présente après le traitement pourrait être responsable de l'effet anti-tumoral. Nous souhaitons donc compenser l'absence de flore chez des souris axéniques avec cette bactérie, et ainsi valider notre hypothèse.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants hôtes d'une flore commensale et plus particulièrement la souris. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire ex-vivo du fait de sa complexité. Par ailleurs, les modèles de tumeur utilisés dans ce projet ont été développés chez la souris et sont indispensables à l'étude.

Il s'agit d'un projet sur 36 mois qui nécessitera 120 souris axéniques. L'absence de flore intestinale chez ces souris nous permettra de moduler spécifiquement leur flore en mono-colonisant les animaux avec des bactéries d'intérêt comme *Parabacteroides distasonis* et démontrer ainsi leur rôle. Nous projetons de resoumettre ce projet en fonction de l'avancement des travaux et de la suite envisagée. Ce nombre d'animaux se justifie par l'étendue de la diversité de la flore intestinale ainsi que les différentes voies de signalisation étudiées.

Les procédures expérimentales décrites dans ce projet ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur). Cependant, nous veillerons à respecter les exigences de réduction et raffinement. Ainsi, les groupes seront constitués du minimum d'animaux nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. L'ensemble des procédures expérimentales présente un certain degré de sévérité, cependant les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux.

5292. Les infections des voies respiratoires inférieures représentent la première cause de mortalité dans les pays à faible revenu, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (données 2012). Ces infections résultent de l'inhalation d'agents pathogènes qui pénètrent dans l'organisme au niveau de la muqueuse pulmonaire selon des mécanismes qui ne sont toujours pas compris à l'heure actuelle.

Le poumon, en tant qu'organe dédié aux échanges gazeux, offre une interface considérable entre l'organisme et l'environnement extérieur (environ 75 m²) et est à ce titre constamment confronté à des particules étrangères de diverses natures. Malgré la présence de plusieurs couches de filtration mécanique, chimique et biologique depuis les voies aériennes supérieures, l'air inhalé arrivant au niveau terminal de l'arbre respiratoire, lieu où se jouent les échanges gazeux via la barrière alvéolo-capillaire, contient encore de nombreuses particules extérieures. C'est justement à partir des alvéoles pulmonaires que certains agents pathogènes responsables d'infections pénètrent dans l'organisme. Les mécanismes à l'origine de ce passage sont encore mal connus mais pourtant cruciaux pour la compréhension des phases précoces de l'infection. Une des raisons de la méconnaissance de ces mécanismes tient au fait de la difficulté d'étude à l'échelle submicrométrique d'un organe en perpétuel mouvement.

C'est dans ce contexte que nous nous proposons d'étudier le rôle de plusieurs populations de cellules immunitaires pulmonaires dont les travaux préliminaires de notre équipe ont montré l'implication complémentaire dans le passage de la barrière épithéliale alvéolaire par des bactéries.

Notre étude est destinée à analyser le rôle éventuellement coopératif de quatre populations de cellules immunitaires majeures (macrophages, monocytes, cellules dendritiques et neutrophiles) confrontées à la présence de particules bactériennes et impliquées dans le passage de celles-ci à travers la barrière alvéolaire :

1. Analyser le comportement de quatre populations de cellules immunitaires pulmonaires principales (macrophages, monocytes, cellules dendritiques et neutrophiles) confrontées à la présence de particules bactériennes.
2. Déterminer l'implication de ces cellules dans la pénétration des bactéries à travers l'épithélium alvéolaire
3. Evaluer le rôle éventuellement coopératif des populations cellulaires mises en évidence à l'étape précédente dans le passage des bactéries à travers l'épithélium alvéolaire.

Pour cela, nous utiliserons un type de microscopie optique de fluorescence appelée microscopie biphotonique, qui permet l'imagerie de tissu plus épais que ceux observés par des méthodes classiques de microscopie optique, condition indispensable à l'imagerie du tissu pulmonaire. Ainsi, la microscopie biphotonique permet d'observer in vivo les événements cibles de notre étude (passage de bactéries à travers l'épithélium alvéolaire par l'entremise de cellules immunitaires) chez la souris anesthésiée et ventilée. Le recours à l'animal vivant est justifié par l'absence de modèle in vitro d'alvéole pulmonaire qui intégrerait en plus de la ventilation les composantes vasculaires et lymphatiques du poumon, cruciales dans la réponse immunitaire pulmonaire. Cependant, dans un souci de limitation des souffrances infligées à l'animal, l'imagerie pulmonaire in vivo (imagerie sur animal anesthésié et ventilé) sera systématiquement effectuée sans réveil de l'animal, ou bien directement sur explant pulmonaire prélevé après mise à mort de l'animal.

Ce projet contient donc deux procédures de classe légère, selon que l'imagerie est effectuée sur explant pulmonaire (après mise à mort de l'animal, procédure « ex vivo ») ou sur animal vivant, anesthésié et ventilé, auquel cas il s'agit de procédure sans réveil «

procédure « in vivo »). Dans les deux cas, les actes les plus invasifs consistent en l'instillation d'un faible volume d'une solution contenant des particules biologiques inactivées et des marqueurs fluorescents.

Ce projet a été élaboré dans le souci de réduire le nombre de souris – nombre évalué à 252 partagé entre mâles et femelles âgés de 8 à 12 semaines – et de limiter la sévérité des expérimentations à la classe légère, pour une durée de 3 ans. Le calcul du nombre d'animaux nécessaire a été effectué à l'aide de nos données préliminaires et d'analyses statistiques. Pour éviter tout processus douloureux ou d'inconfort nous aurons recours à une anesthésie générale et à des antalgiques, et les procédures invasives seront réalisées sans réveil. En cas de problème lors de l'anesthésie, l'animal sera mis à mort par injection d'une surdose d'anesthésique.

5293. Il est estimé qu'environ 15% des cancers peuvent être attribués à des microorganismes. Le tube digestif est hautement colonisé par des bactéries et différentes études montrent que des modifications du microbiote sont impliquées dans la carcinogenèse colique. Il a notamment été montré que la muqueuse intestinale de patients atteints de cancer colorectaux (CCR) est anormalement colonisée par des souches de *E. coli* pathogènes qui ont la capacité à s'internaliser dans les cellules épithéliales intestinales et/ou à produire des toxines pro-carcinogènes. Ces études chez l'homme sont réalisées à un stade tardif de la maladie lors de la chirurgie. Pour des raisons éthiques, les biopsies de lésions précoces obtenues lors des examens de coloscopie sont réservées au diagnostic histologique. Ainsi il est difficile d'étudier, chez l'homme, la colonisation bactérienne et les relations hôte/pathogène aux stades précoces de la maladie. Il est donc essentiel pour définir précisément le rôle de ces bactéries pathogènes dans le développement du cancer colorectal, d'utiliser des modèles animaux.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet procarcinogène de souches bactériennes isolées de notre cohorte de patients CCR afin de mieux comprendre le dialogue hôtes-bactéries sur la cancérogenèse colique. Nous avons choisi de travailler avec le modèle murin de prédisposition à développer des CCR : APC^{min/+}. Ces souris porteuses d'une mutation dans le gène *apc* (Adenomatous Polyposis Coli) développent spontanément des tumeurs intestinales et sont ainsi un modèle animal de référence pour étudier la carcinogenèse colique. Ce gène *apc* est un gène suppresseur de tumeur qui est muté dans 80% des cancers colorectaux chez l'homme.

L'expérimentation animale est indispensable pour ce projet : en effet il n'y a pas de méthodes alternatives pour évaluer les effets promoteurs sur le développement du cancer colorectal et pour étudier la colonisation bactérienne du tube digestif. L'expérimentateur observera quotidiennement le comportement général de l'animal (activité, locomotion, état du poil, prostration, vocalise...) et contrôlera la présence d'eau et de nourriture pour chaque cage. Les signes d'inflammation colique seront également considérés, le cas échéant : diarrhée, présence de sang dans les fèces, inflammation visible de la zone anale. Des pesées régulières des animaux sont prévues tout au long du protocole. Si des signes de douleur sont observés, l'animal concerné sera isolé et du paracétamol (200mg/kg) lui sera administré par gavage 2 fois par jours. Dans le cas où une perte de poids importante serait observée, les animaux seront euthanasiés lorsqu'ils atteindront 80% de leur poids initial. Enfin, les animaux seront euthanasiés s'ils présentent une attitude inhabituelle traduisant un mal-être pendant plus d'une semaine.

Le nombre d'animaux est réduit au minimum dans la mesure où cela ne compromet pas les objectifs du projet. Le nombre de 6 souris/lot permettra d'analyser statistiquement les résultats

Le nombre estimé d'animaux est de 480 souris sur une période de 5 ans.

A long terme les résultats générés par ces recherches devraient permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques en ciblant ces bactéries pathogènes intestinales.

5294. Les communications inter-auriculaires (CIA) représentent la malformation cardiaque la plus fréquemment observée chez l'adulte. Leur traitement a longtemps consisté en une fermeture chirurgicale mais, depuis environ 20 ans, le développement des techniques de cathétérisme interventionnel permet leur occlusion de manière sûre et peu invasive dès l'enfance (à partir de 10-15 kg). La très grande majorité de ces occlusions est réalisée grâce à des prothèses en nitinol. Ces prothèses ont d'excellents résultats à court et moyen terme mais posent 2 principaux problèmes au long cours: 1) un défaut de cicatrisation et d'endothélialisation de la prothèse entraînant la formation potentielle de caillots et 2) un relargage de Nickel excessif responsable d'une hypersensibilité et de tableaux migraineux parfois sévères. Une société a mis au point une nouvelle prothèse également fabriquée en nitinol mais dont le recouvrement devrait permettre une meilleure cicatrisation au sein du cœur et un relargage de Nickel moindre. Ces données sont théoriques et doivent être validées in vivo.

Ce projet a pour but de caractériser la biocompatibilité et la durée de cicatrisation de la nouvelle prothèse mais également le relargage de Nickel qu'elle occasionne, en comparaison avec la prothèse « classique ».

Ce projet sera développé autour d'un modèle animal porcin de CIA. En effet, afin de nous permettre de répondre aux questions d'ordre clinique, des modèles animaux de pathologies humaines et des tissus animaux sont nécessaires. Le porc a été choisi en raison de la proximité de son anatomie avec l'homme, notamment au niveau du septum inter-atrial et des oreillettes et de sa croissance accélérée. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans cette étude et dans le but d'obtenir un plus grand bénéfice de l'utilisation de ces animaux, nous avons fixé une limite maximale de 12 cochons au total. Il s'agit, de par notre expérience, du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité optimale et permettant une analyse statistique fiable. Les animaux seront répartis en 2 groupes pathologiques : 1 groupe chez qui nous implanterons la prothèse à tester (6 animaux), et 1 groupe contrôle chez qui nous implanterons la prothèse « classique » servant de Gold-standard (6 animaux). Si les objectifs expérimentaux peuvent être atteints par l'utilisation de moins d'animaux, alors plus aucun animal supplémentaire ne sera utilisé. D'autre part, nous sommes en mesure de pratiquer la plupart des différentes investigations à la suite les unes des autres (étude de biocompatibilité, relargage du Nickel) ce qui nous permettra d'accroître la quantité d'informations obtenues à partir d'un animal et ainsi de limiter l'utilisation globale d'animaux. Les résultats de cette étude seront précieux quant à la validation de cette nouvelle

prothèse permettant de diminuer le nombre de complications survenant après fermeture. Afin de prendre en compte les 3R, le raffinement sera mis en place par différentes mesures tout au long des différentes étapes du projet. Des mesures de raffinement seront mises en place lors de l'opération pour éviter leur angoisse par l'utilisation d'une prémédication adaptée ainsi qu'une anesthésie générale durant toute la procédure, lors de l'hébergement pour favoriser leur bien-être au sein de l'établissement agréé (notamment par la mise en place de jouets, de pierre à sel, de box favorisant le contact des congénères) et l'entretien des animaux sera réalisé par des personnes compétentes.

5295. L'incidence de la douleur cancéreuse est particulièrement élevée chez les patients ayant des métastases osseuses. Les symptômes sont une douleur persistante augmentant en intensité avec la progression de la pathologie et la survenue d'épisodes douloureux spontanés très intenses, imprévisibles, et réfractaires aux traitements antalgiques usuels. Le but de l'étude est de rechercher si de nouveaux antalgiques que nous avons découvert comme étant efficaces pour le traitement de douleurs inflammatoires et neuropathiques ont un effet antalgique chez un modèle de douleur osseuse de métastases de prostate. Il nous faut mettre au point un tel modèle chez la souris et tester l'effet antalgique mais aussi les conséquences sur la progression tumorale de l'administration de nos composés en comparaison avec un antalgique de référence, la morphine. Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3 R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Notamment, des cellules de cancer de prostate modifiées pour exprimer de la bioluminescence seront utilisées pour permettre un suivi de l'évolution tumorale in vivo en imagerie optique sans sacrifier les animaux. Les souris seront observées et pesées régulièrement. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Le nombre d'animaux nécessaire est de 230 souris pour la durée (3 ans) du projet.

5296. Nos précédents travaux ont permis de mettre en évidence l'effet bénéfique d'une association de 5 extraits de végétaux sur le métabolisme de souris diabétiques, à travers différents paramètres mesurés, tels que la glycémie, les tests de tolérance à l'insuline ou à l'amidon, le profil lipidique sérique ou la composition corporelle. Toutefois, les mécanismes physiologiques qui sous-tendent ces adaptations positives restent à élucider. Ce projet propose ainsi de combiner différentes conditions qui permettent l'activation de certains mécanismes qui nous permettront de mettre en lumière ceux qui sont impliqués. La combinaison d'extraits de végétaux sera ainsi incorporée dans la nourriture des animaux sur une durée de 16 semaines. Le projet inclut 8 groupes de 12 souris saines. Les procédures réalisées sur les animaux (pesée, composition corporelle, injection d'insuline, mesure de la glycémie à jeun) sont non-invasives et réalisées sans anesthésie car elles n'engendrent qu'un état de stress minimal.

Seule une étape du projet implique pour certains animaux leur détention en cages calorimétriques et métabolique pendant une durée de 48h à chaque fois. Le modèle de souris de souris saines nourries avec un régime riche en graisse permet de développer une obésité et une insulino-résistance particulièrement adaptés à l'étude d'un produit qui se placera dans une finalité de prévention de facteurs de risques du syndrome métabolique.

Une justification statistique prédictive du nombre d'animaux nécessaire par groupe a été établie à partir de travaux similaires réalisés sur le même modèle, un minimum de 12 animaux par groupe est ainsi nécessaire pour mettre en évidence un résultat statistiquement significatif. Ce projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3rs, ainsi le nombre d'animaux utilisés est déterminé au minimum de la relevance statistique et une attention particulière sera prêtée au comportement des animaux par les expérimentateurs et la personne chargée du bien-être animal afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes de douleur chez l'animal, auquel cas ce dernier serait immédiatement sorti du protocole. Un nombre maximal de 96 souris saines seront utilisées pour ces travaux de recherche.

5297. La perte des gaines de myéline survenant dans le cerveau et la moelle épinière provoque de graves troubles locomoteurs et de lourds handicaps. Actuellement, les traitements tentent de limiter cette perte de myéline mais aucune thérapie visant à améliorer le processus de remyélinisation n'est disponible. L'objectif principal de ce projet est de développer des stratégies s'opposant au processus de démyélinisation ou promouvant une réparation de la myéline pour trouver de nouveaux traitements contre la sclérose en plaques (SEP), la principale pathologie démyélinisante du système nerveux central (SNC).

Le projet que nous souhaitons mener vise à utiliser le potentiel thérapeutique de l'exercice physique afin d'identifier de nouvelles voies thérapeutiques pour traiter la SEP. Cela consiste à analyser les effets bénéfiques de l'exercice physique pendant ou après démyélinisation du SNC dans un modèle murin de SEP.

Les souris seront traitées par la cuprizone (0,2% dans la nourriture journalière) pendant 12 semaines pour induire un démyélinisation du SNC. Soit pendant le traitement, soit durant 4 semaines suivant l'arrêt de la cuprizone, les souris seront soumises à une activité physique journalière (nage ou course quotidienne). Les capacités locomotrices des souris seront testées durant le processus de démyélinisation induit par la cuprizone, à l'arrêt du traitement à la cuprizone, et après 4 semaines d'entraînement pour le groupe de souris entraînées après démyélinisation. A l'issue des entraînements, les animaux seront utilisés pour mener des études biochimiques et histologiques du SNC en prélevant le maximum de tissus biologiques possible. Nous utiliserons les tests statistiques appropriés afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables à partir du plus petit nombre d'animaux possible. Ce projet nécessite 480 souris.

En conformité avec l'exigence des 3R, nous allons raffiner l'étude en évitant des tests comportementaux douloureux, en réduisant la durée de l'étude au minimum et en appliquant des points limites notamment la mise à mort des souris en cas de souffrance majeure. Ce projet permettra l'identification de cibles moléculaires impliquées dans les effets de l'exercice physique sur la

démyélinisation. Elles seront ultérieurement analysées in vitro dans des cellules en culture, évitant ainsi le recours à l'utilisation de nouveaux animaux.

Cette étude permettra de mettre en évidence l'efficacité de l'exercice physique pour régénérer les gaines de myéline et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques exploitables pour le traitement de la SEP.

5298. Les glioblastomes (GBM) (tumeurs astrocytaires de haut grade) sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes chez l'adulte. L'évolution de cette pathologie est rapide et fatale. La prise en charge thérapeutique associe la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. La médiane de survie de ces patients est inférieure à 15 mois. Améliorer la survie des patients passe par une meilleure compréhension de la pathologie et de ses mécanismes.

Il nous apparaît opportun de recourir à des modèles de glioblastomes précliniques comparables aux caractéristiques du microenvironnement tumoral retrouvé chez les patients.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'influence des anesthésiques intraveineux (utilisés en clinique lors de l'exérèse chirurgicale) sur la croissance tumorale de modèles murins (rats).

Pour évaluer l'effet des anesthésiques intraveineux sur la croissance tumorale, nous réaliserons un examen non invasif reposant sur l'imagerie IRM sous anesthésie avant et après exposition aux anesthésiques intraveineux (l'exposition aux anesthésiques intraveineux intervenant dans un délai de 15 jours après l'implantation tumorale). Afin de respecter la règle des 3R, les animaux seront hébergés en groupe dans des cages standard aux normes européennes (type IV). La nourriture, la boisson et la litière seront changées une fois par semaine. Il est à préciser que la boisson et la nourriture sont en accès illimité. Le choix s'est porté sur de la litière de peuplier "aspen small", plus douce et variée pour les animaux permettant ainsi d'optimiser le bien-être des animaux. L'utilisation de l'imagerie IRM nous permettra, non seulement de réduire le nombre d'animaux utilisés, mais aussi de définir des critères d'arrêt du protocole pour les animaux (volume de lésion tumorale supérieur à 200 mm³), sans atteindre de signe de souffrance. Les autres points limites fixés pour cette étude sont une perte pondérale de 15% (réalisation de pesées à la balance quotidiennes par un personnel formé), une prostration, des grincements de dents, une température corporelle basse (<35°C). Si un de ces critères apparaissait, l'animal serait mis à mort sur décision des responsables de la mise en œuvre du projet.

Dans le cadre de ce projet, nous aurons recours à des animaux immunocompétents et immunodéprimés. Des cellules tumorales murines et humaines seront utilisées. Ainsi, nous travaillerons sur 4 modèles de lignées cellulaires :

- Cellules 9L et rats Fischer 344
- Cellules C6 et rats Wistar
- Cellules U87-MG et rats Nude
- Cellules U 251-MG et rats Nude

Afin d'assurer une puissance statistique suffisante, on estime qu'il sera nécessaire d'utiliser 15 rats pour chaque modèle et pour chaque groupe (rats avec anesthésie intraveineuse et rats contrôles), ce qui correspond à un nombre total de 120 animaux au maximum (soit 15 rats pour 4 modèles et pour 2 groupes, à savoir $15 \times 4 \times 2 = 120$). Ces mêmes animaux seront ensuite répartis pour des analyses biologiques complémentaires. Ce nombre d'animaux permettra d'atteindre une puissance de l'ordre de 80%.

5299. La maladie des frontières, causée par le pestivirus Border (BDV pour Border Disease Virus), est responsable de pertes économiques considérables dans les élevages ovins, consécutives à des problèmes de reproduction, des avortements, de la mortalité néonatale et la naissance d'agneaux malformés, avec des troubles nerveux, ou chétifs. La transmission et la persistance du BDV dans les troupeaux résultent principalement de la naissance d'agneaux infectés permanents immunotolérants (IPI), qui sont excréteurs du virus tout au long de leur existence. La production d'agneaux IPI est la conséquence du passage transplacentaire du BDV, lors de l'infection de brebis gravides, entre 30 et 65 jours de gestation, période d'immunotolérance fœtale.

La vaccination est l'un des principaux moyens de contrôle des infections à pestivirus. Dans le cas du BDV, elle vise à réduire les troubles de la reproduction et à empêcher l'infection des fœtus chez les brebis gravides et, par voie de conséquence, la production d'agneaux IPI. Actuellement, il n'existe pas de vaccins spécifiques contre le BDV. Les vaccins utilisés sur le terrain sont des vaccins commercialisés contre le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV), pestivirus apparenté au BDV et capable d'infecter les ovins. Toutefois, il n'existe aucune donnée scientifique permettant d'évaluer objectivement l'efficacité de ces vaccins hétérologues dans l'espèce ovine.

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet, d'une durée de 3 mois, est d'évaluer la capacité de trois vaccins commerciaux dirigés contre le BVDV à conférer une protection fœtale chez des brebis gravides, infectées expérimentalement avec une souche de BDV.

En l'absence de méthode in vitro permettant de reproduire une gestation, nous utiliserons un modèle ovin, préalablement validé.

Cinquante-sept brebis gravides seront réparties en 3 groupes expérimentaux constitués chacun de 12 brebis vaccinées et de 7 brebis témoins non vaccinées. Ces effectifs ont été fixés en s'inspirant des exigences réglementaires de la pharmacopée européenne pour la démonstration de l'efficacité des vaccins contre le BVDV dans l'espèce bovine.

Les brebis seront transférées sur le site d'expérimentation 12 jours avant inoculation, de manière à leur permettre de s'adapter à leur nouvel environnement et réduire ainsi leur niveau de stress. Elles seront hébergées sur aire paillée (1,5 m²/animal) et nourries avec du foin à volonté et des concentrés (200 g/jour/animal).

L'inoculation d'épreuve sera effectuée à 52 jours de gestation (J0), par voie intramusculaire, avec une souche de BDV ayant démontré sa capacité à traverser la barrière placentaire et à infecter les fœtus (production de 100 % d'IPI) lors d'un essai précédent. Bien qu'aucun signe clinique ne soit attendu après inoculation, un suivi clinique et échographique des brebis sera réalisé par des vétérinaires tout au long de l'expérimentation. En outre, des prélèvements sanguins destinés à des analyses (i) virologiques (à J-7, de manière quotidienne de J0 à J10, puis à J12, J14, J21, J28 et J66, soit au total 17 prélèvements de 5 mL), (ii) sérologiques (de

manière hebdomadaire de J-7 à J28, puis à J42, J56 et J66, soit au total 9 prélèvements de 5 mL) et (iii) hématologiques (de manière quotidienne de J-3 à J7, puis toutes les 48 h de J10 à J14, soit au total 14 prélèvements de 5 mL) seront effectués pour suivre l'infection virale. Des écouvillons nasaux et des prélèvements fécaux seront également réalisés en même temps que les prélèvements sanguins destinés à la virologie, afin de mettre en évidence une éventuelle excrétion virale.

Tous les animaux seront euthanasiés par injection intraveineuse d'un mélange d'embutramide, de mébézonium et de tétracaïne, 66 jours après inoculation (J66), afin de récupérer les fœtus. La recherche de BDV dans les organes fœtaux permettra de déterminer si la vaccination a permis d'empêcher une infection transplacentaire et la production d'animaux IPI.

5300. Ce projet consiste à caractériser l'impact de l'âge et/ou d'un stress sur l'organisation des structures cérébrales impliquées dans la mémoire et la régulation des émotions. La formation de la mémoire est un phénomène dynamique qui repose sur l'encodage d'informations diverses par plusieurs systèmes cérébraux. Les mécanismes moléculaires par lequel l'âge et le stress influencent la dynamique entre ces systèmes cérébraux restent mal connus. Parmi les structures cérébrales impliquées dans la mémoire, le système hippocampique permet la formation de mémoires épisodiques contextualisées dans l'espace et dans le temps. Le système striatal permet la formation de mémoires égocentrées basées sur l'association simple d'un stimulus avec une réponse motrice pouvant conduire, avec la répétition ou le temps, à l'installation d'habitudes. Le système amygdalien quant à lui encode l'association d'une émotion aussi bien avec des stimuli simples qu'avec des épisodes contextualisés. S'il est connu que le stress et le niveau d'entraînement module aussi bien l'activité striatale que l'activité hippocampique et donc le poids de chacune des formes de mémoire gérées par ces deux systèmes, peu de travaux ont étudié l'effet de l'âge sur l'utilisation et la sélection de formes de mémoire hippocampique et striatale.

En résumé, ce projet d'une durée d'un an consiste en 3 volets nécessitant un Nb total de 350 souris comme suit:

le volet 1 (effet de l'âge sur l'utilisation des stratégies de navigation) = 90 souris.

le volet 2 (effet d'un stress aigu sur les stratégies de navigation de souris jeune-adultes et âgées) = 60 souris.

le volet 3 (Recherche de stratégie thérapeutique afin de prévenir les effets de l'âge et/ou du stress) = 200 souris.

La souris représente une espèce de choix du point de vue neurobiologique et comportemental pour comprendre les effets délétères de l'âge et/ou du stress sur les capacités de mémorisation. En effet, l'organisation du système nerveux murin est relativement proche de celle de l'Homme, ce qui permet une extrapolation acceptable des résultats obtenus chez la souris à l'espèce humaine. Cette étude ne peut être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. Les souris seront hébergées dans une pièce calme avec minimum de fréquentation par expérimentateurs ou techniciens animaliers de façon à réduire le stress ou l'inconfort. Les animaux seront surveillés quotidiennement et disposeront du matériel nécessaire pour construire un nid (papier sopalin ou « Nestlets ») pour l'enrichissement du milieu.

Les études comportementales et pharmacologiques nécessitent au minimum 12 à 15 animaux par âge, condition expérimentale ou drogue, étudiés, afin de garantir la solidité et une bonne interprétation des données. Aucune des procédures décrites dans ce projet ne provoquent ni douleur ni détresse.

Dans le cas d'atteinte de "point limite", l'euthanasie par surdose de pentobarbital est pratiquée dans les meilleurs délais.