



**MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE,
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE**

**Secrétariat d'Etat
à l'enseignement supérieur et à la recherche**

Résumés non techniques des projets autorisés (38)

3801. Les médulloblastomes sont des tumeurs qui se forment au niveau du cervelet. Ce sont les cancers neuraux les plus fréquents et les plus dévastateurs chez l'enfant. Leur gravité extrême nécessite une meilleure compréhension des mécanismes qui les causent afin de pouvoir proposer des approches thérapeutiques pertinentes. Pour cela, il est crucial d'une part d'approfondir notre connaissance des cellules à l'origine du cervelet, et d'autre part, de disposer de modèles animaux récapitulant la formation de médulloblastomes. Par sa faculté d'être manipulée génétiquement et par la grande proximité du développement de son cervelet avec celui de l'homme, la souris offre seule la possibilité de répondre simultanément à ces deux impératifs.

Le projet vise à utiliser des lignées de souris transgéniques pour isoler des sous-populations précises de cellules du cervelet et caractériser leurs propriétés et leur capacité à former des tumeurs, et pour modéliser deux grands types de médulloblastomes, afin de mieux comprendre comment ils se forment et de pouvoir envisager de nouvelles approches thérapeutiques.

Il met en œuvre 2338 animaux, étudiés entre la naissance et l'âge de 2 mois. Sur cette période, les phénotypes attendus ne portent pas atteinte à l'intégrité des souris et ne causent pas de dommages invalidants, Les nombres d'expériences et de répétitions sont limités au minimum pour effectuer des tests statistiques probants et respecter la règle des 3R. Une identification précoce des animaux et un étude statistique adaptée, basée sur des tests non paramétriques nous permettront de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la significativité des résultats obtenus. Dans un souci de raffinement, un suivi étroit des animaux et des points limites précoces et adaptés sont mis en place tout au long des expérimentations.

3802. Ce projet a pour but d'étudier les fonctions des gènes de la famille Otx, codant des facteurs de transcription, protéines qui régulent l'expression d'autres gènes, au cours du développement de l'œil chez la souris. Il met en œuvre 2986 animaux, porteurs de modifications génétiques inductibles. Les animaux sont étudiés entre le stade embryonnaire E13 ou la naissance et l'âge de 4 mois. Sur cette période, les phénotypes attendus ne portent pas atteinte à l'intégrité des souris et ne causent pas de dommages invalidants, les souris KO conditionnelles Otx2 vivant normalement 2 ans dans les conditions d'élevage usuelles. Les nombres d'expériences et de répétitions sont limités au minimum pour effectuer des tests statistiques probants et respecter la règle des 3R. Une identification précoce des animaux et un étude statistique adaptée, basée sur des tests non paramétriques nous permettront de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la significativité des résultats obtenus. Dans un souci de raffinement, un suivi étroit des animaux et des points limites précoces et adaptés sont mis en place tout au long des expérimentations.

Chez les mammifères, la famille Otx comprend 3 membres, issus de duplications ancestrales : Otx1, Otx2 et Crx. Les 3 gènes ont des domaines d'action qui peuvent être différents : Otx1 agit sur le développement du cortex cérébral, de l'oreille interne, Otx2 sur le développement précoce du cerveau, du cervelet, et Crx sur le développement des photorécepteurs, les cellules sensibles à la lumière de la rétine. Toutefois, il est un organe où l'expression de ces 3 gènes se superpose : l'œil. Comme les 3 protéines Otx1, Otx2 et Crx sont très semblables, une redondance fonctionnelle est possible lorsqu'elles coexistent.

A l'aide de lignées de souris génétiquement modifiées créées dans notre laboratoire et permettant le KO conditionnel du gène Otx2, nous avons montré que dans la rétine, l'ablation d'Otx2 affecte le programme génétique d'une population où ce gène est exprimé seul, l'épithélium pigmentaire, mais pas celui des photorécepteurs où Crx est aussi présent. Comme nous avons montré qu'Otx2 et Crx peuvent se lier à de nombreux sites communs du génome, nous supposons que Crx supplée à l'absence d'Otx2. De même, Otx1 agit dans la rétine périphérique où il pourrait aussi compenser l'absence d'Otx2. Pour le prouver, et pour isoler la fonction de chaque membre de la famille, il faut pouvoir réaliser l'ablation d'un, deux ou trois de ces gènes dans chacun des domaines où ils s'expriment. Or, pour les gènes Otx1 et Crx, il n'existe pas d'outils génétiques semblables à ceux que nous avons développés pour le gène Otx2, qui permettent de les inactiver de façon contrôlée dans le temps et dans l'espace. Ce projet va utiliser les nouvelles méthodes d'édition du génome pour créer les lignées mutantes conditionnelles Otx1 et Crx, et les mettre en œuvre avec les lignées mutantes conditionnelles Otx2 pour isoler les fonctions uniques et redondantes de chaque membre de la famille Otx dans le développement et le maintien de l'œil.

Ce projet est destiné à améliorer nos connaissances des mécanismes qui régissent le développement de l'œil. Notre modèle de souris KO conditionnel Otx2 est déjà établi comme un bon modèle de pathologies dégénératives tardives. Il peut connaître des prolongements appliqués aux pathologies oculaires, qu'il s'agisse de dégénérescences comme la DMLA, la rétinite pigmentaire ou de cancers comme les rétinoblastomes.

3803. Ce projet a pour but d'étudier les fonctions du gène Otx2 dans le développement et le fonctionnement du cervelet, une région du système nerveux central des mammifères contrôlant la motricité, la posture, l'équilibre et de nombreux apprentissages. Il s'agit d'un projet de recherche fondamentale visant à décrypter des mécanismes de mise en place et de maintenance du cervelet chez la souris contrôlés par un gène « maître ». Les gènes maîtres jouent un rôle important dans le développement de l'organisme en définissant des propriétés cardinales de régions entières et en imposant un destin à des types cellulaires précis. Leur dysfonctionnement au cours du développement

peut avoir des conséquences spectaculaires comme l'absence complète de la tête. Cependant, on connaît mal les mécanismes qui sous-tendent leurs fonctions. Notre laboratoire est engagé depuis plusieurs années dans l'étude détaillée de l'un d'entre eux, Otx2, et a développé des outils génétiques permettant de façon contrôlée dans le temps et dans l'espace au cours du développement de la souris. Nous avons obtenu des résultats préliminaires indiquant un rôle indiscutable de ce gène dans le développement du cervelet. Il s'agit maintenant de comprendre les bases moléculaires de ce rôle.

Ce projet est susceptible de faire progresser notre connaissance des mécanismes qui régissent le développement du cervelet. Il possède des prolongements qui peuvent être appliqués aux pathologies du cervelet, qu'il s'agisse de dégénérescences comme l'atrophie olivo-ponto-cérébelleuse ou des cancers comme les médulloblastomes.

Le projet utilisera 1387 souris expérimentales, nombre optimisé pour garantir une valeur statistique des analyses avec un nombre de répétitions limitées à 2, pour respecter la règle des 3R. Les dommages causés aux animaux sont minimes car les modifications ont un déclenchement génétique, et les expérimentations sont limitées à des injections bénignes et des procédures sans réveil. Les phénotypes produits ne portent pas atteinte à l'intégrité des souris et ne causent pas de dommages invalidants, les souris KO conditionnelles Otx2 vivant normalement 2 ans dans les conditions d'élevage usuelles.

3804. La détermination du volume des divers compartiments liquidiens de l'organisme est basée sur la technique de dilution d'un produit « traceur ». Le projet consiste plus particulièrement ici à mesurer le volume sanguin chez le rat.

Dans ce but, une quantité connue d'une substance traceur (non toxique ; ni détruite ni excrétée rapidement par l'organisme ; restant dans le compartiment liquidien que l'on désire mesurer) est introduite dans le système circulatoire. Après répartition homogène du traceur, un prélèvement de sang est effectué ; la concentration du traceur dans le sang permettra de déduire le volume dans lequel la substance s'est distribuée, à savoir le volume sanguin.

L'injection intraveineuse du traceur puis un prélèvement de sang important (nécessaire pour le dosage du traceur) se feront sous anesthésie générale. L'anesthésique est administré par injection intrapéritonéale, la dose nécessaire étant calculée en fonction du poids corporel. La profondeur de l'anesthésie et donc l'absence de sensibilité à la douleur est évaluée en testant la disparition de certains réflexes. Si nécessaire des injections supplémentaires d'anesthésique seront pratiquées. Toujours sous anesthésie générale, à l'issue de l'expérience l'animal est euthanasié, avec contrôle visuel de l'arrêt respiratoire et contrôle par palpation de l'arrêt cardiaque.

Nombre d'animaux – remplacement, réduction, raffinement

Ce protocole s'inscrit dans le cadre de travaux pratiques de physiologie, prévus dans les maquettes de licence, conformément aux exigences de l'article R214-105 du décret n° 2013-118. Il ne s'adresse qu'à un très petit nombre d'étudiants de 3ème année d'enseignement supérieur, inscrits dans un parcours qui débouche notamment sur des carrières de chercheurs et ayant opté pour cet enseignement optionnel, qui s'inscrit dans leur projet professionnel.

Le protocole « mesure du volume sanguin » s'intègre dans l'étude de la fonction de nutrition ; il permet d'aborder des techniques d'expérimentation animale invasives, dans le contexte de cette unité d'enseignement qui a pour objectif l'étude des différentes méthodes pouvant être employées pour explorer les mécanismes vitaux de l'organisme animal. Il est nécessaire de former correctement ces étudiants aux aspects pratiques de ce type d'expérimentation, dans le respect des bonnes pratiques animales.

L'expérience est réalisée sur le rat, animal de laboratoire couramment utilisé ; le choix de cette espèce s'impose pour la formation des futurs chercheurs.

Pour se former convenablement à l'expérimentation animale tout en minimisant le nombre d'animaux, les étudiants ne travaillent pas seuls mais en binôme (voire en trinôme). Selon les années cet enseignement rassemble entre 15 et 30 étudiants, nécessitant l'utilisation d'au maximum 15 rats par an (soit 15 x 5 ans = 75 animaux).

Les animaux, fournis par un élevage agréé, sont stabulés dans l'animalerie au maximum 3 semaines avant la séance de travaux pratiques. L'enrichissement dans la cage (cartons à déchiqueter) et la présence de 2 animaux par cage sont appliqués afin de réduire l'anxiété et le stress des animaux durant cette phase de stabulation. Une surveillance quotidienne est exercée pour s'assurer du bon état général des animaux ; en cas de problème, des mesures d'urgence sont appliquées. La manipulation elle-même se déroule sous anesthésie générale, afin d'abolir toute sensation douloureuse.

C'est l'enseignant qui procède à l'anesthésie des animaux, quelques minutes avant le début de la séance, afin de réduire le stress que pourrait causer l'entrée des étudiants dans la salle.

Après euthanasie (par l'enseignant), un certain nombre d'animaux sont conservés congelés en vue de les réutiliser dans de travaux pratiques d'anatomie. Sur d'autres animaux, différents organes peuvent être prélevés à des fins d'utilisation pédagogique ou en recherche.

3805. Le projet consiste à étudier certains aspects de la réponse d'un organisme à un stress, de comparer les effets de stress physique, chimique et psychologique et en tirer des conclusions par rapport à un lot d'animaux témoins.

Les paramètres explorés sont le pH urinaire, la présence ou non du glucose dans les urines, le taux de globule rouge, la concentration de glucose dans le sang, la quantité résiduelle d'adrénaline et de noradrénaline dans les glandes surrénales.

Dans ce but, l'animal est stressé ou non durant 15 minutes, euthanasié par inhalation de CO2 suivie d'une rupture des cervicales et dans les 3 minutes qui suivent des prélèvements de sang et d'urine sont réalisés.

3806. Le projet consiste à étudier quelques aspects de la régulation neurohumorale de la pression artérielle.

Dans ce but, les variations de pression intra-carotidienne seront enregistrées en continu, et des expériences successives réalisées afin d'étudier différentes voies de régulation de la pression artérielle. Elles permettront de démontrer l'action du nerf parasympathique innervant le cœur ; la localisation et le mode de fonctionnement d'un des barorécepteurs (capteurs de pression artérielle distribués dans le système circulatoire) ; les effets de différentes substances pharmacodynamiques.

Nécessitant une intervention invasive, l'expérience se déroule sous anesthésie générale. L'anesthésique est administré par injection intrapéritonéale, la dose nécessaire étant calculée en fonction du poids corporel. La profondeur de l'anesthésie et donc l'absence de sensibilité à la douleur est évaluée en testant la disparition de certains réflexes, notamment le réflexe de retrait (patte postérieure). Si nécessaire des injections supplémentaires d'anesthésique seront pratiquées. Toujours sous anesthésie générale, à l'issue de l'expérience l'animal est euthanasié, avec contrôle visuel de l'arrêt respiratoire et contrôle par palpation de l'arrêt cardiaque.

Nombre d'animaux – remplacement, réduction, raffinement

Ce protocole s'inscrit dans le cadre de travaux pratiques de physiologie, prévus dans les maquettes de licence et de master, conformément aux exigences de l'article R214-105 du décret n° 2013-118.

Il ne s'adresse qu'à certains étudiants de 3^{ème} ou 4^{ème} année d'enseignement supérieur, ayant fait le choix de parcours spécifiques qui débouchent notamment sur des carrières de chercheurs, dans des domaines où le recours à l'expérimentation animale est souvent indispensable. Il est donc nécessaire de former correctement ces étudiants aux aspects pratiques de ce type de manipulation, et au respect des bonnes pratiques d'expérimentation animale. Les travaux pratiques permettent de former les étudiants à l'approche expérimentale de la physiologie, et d'approfondir les thématiques abordées de façon théorique dans les cours magistraux.

Le lapin s'impose pour cette expérience car le matériel nécessaire à l'enregistrement en continu des variations de pression artérielle est conçu pour cette espèce. De plus, le lapin faisant partie des animaux de laboratoire assez couramment utilisés, le choix de cette espèce est important pour la formation des futurs chercheurs.

Pour se former convenablement à l'expérimentation animale, tout en minimisant le nombre d'animaux, les étudiants ne travaillent pas seuls mais en binôme (voire trinôme). Selon les années ces formations rassemblent entre 110 et 140 étudiants, nécessitant donc l'utilisation d'un maximum 70 lapins par an (soit 70 x 5 ans = 350 animaux).

Les animaux, fournis par un élevage agréé, sont stabilisés dans l'animalerie 1 semaine avant la séance de travaux pratiques. Une surveillance quotidienne est exercée pour s'assurer du bon état général des animaux ; en cas de problème, des mesures d'urgence sont appliquées. La manipulation elle-même se déroule sous anesthésie générale, afin d'abolir toute sensation douloureuse. De plus les animaux sont anesthésiés par le responsable du TP afin de réduire le stress de l'animal à l'arrivée des étudiants dans la salle.

C'est également l'enseignant qui procède à l'euthanasie en fin d'expérience.

3807. Parmi les infections de la mamelle, ou mammites, qui sont fréquentes chez la chèvre. les plus sévères sont causées par *Staphylococcus aureus*. Les mammites staphylococciques provoquent généralement une phase initiale clinique qui impacte le bien-être des animaux atteints et entraîne l'utilisation d'antibiotiques. Souvent cette phase clinique débouche sur une infection chronique durable de la mamelle, sur un mode subclinique entrecoupé d'épisodes cliniques. Ces infections chroniques avec excrétion de bactéries dans le lait pose des problèmes de santé publique (entérotoxines staphylococciques), favorise l'utilisation fréquente d'antibiotiques et diminue la qualité technologique du lait (aptitude à la transformation fromagère). La maîtrise des mammites représente donc un enjeu majeur de la filière caprine, d'un point de vue économique et réglementaire mais également en termes d'image et de sécurité alimentaire, dans un contexte où le lait, matière première, est fortement valorisé sous forme de fromages AOC.

Les résultats d'un précédent projet indiquent que la sélection des chèvres sur la base de la numération cellulaire du lait s'accompagne d'une augmentation de la résistance aux infections mammaires dans les conditions d'élevage. L'objectif du nouveau projet, est de déterminer si la sélection sur le critère numération cellulaire du lait correspond bien à une amélioration de la résistance aux mammites staphylococciques dans des conditions expérimentales contrôlées qui permettront de préciser les mécanismes immunologiques mis en jeu et d'identifier les régions du génome impliquées dans la résistance aux mammites chez les caprins.

Pour ce faire, des chèvres issues de la sélection seront soumises à un modèle d'infection mammaire expérimentalement induite, qui a été validé expérimentalement lors d'une expérience pilote. Compte tenu de la variabilité des réponses immunitaires de défense des chèvres observée et publiée lors d'expérimentations impliquant des infections mammaires expérimentales, il est prévu d'utiliser 12 chèvres de chaque lignée dans la protocole d'infection expérimentale de la mamelle. La moitié des chèvres infectées seront vaccinées au préalable avec un extrait de la souche de *S. aureus* utilisée pour l'infection, de façon à étudier les interactions entre la sélection et la vaccination. La vaccination a également l'avantage d'induire un niveau de protection qui a pour effet de réduire le nombre d'infections cliniques. Pour prendre en compte une proportion attendue d'environ un tiers de chèvres répondant faiblement à la vaccination, 9 chèvres de chaque groupe de sélection seront vaccinées ce qui permettra de choisir les 6 meilleures répondeuses à la vaccination pour l'épreuve infectieuse.

Des analyses approfondies seront réalisées par toutes les équipes participant au projet aux plans clinique, immunologique, génomique, transcriptomique et protéomique. La stratégie d'expérimentation choisie consiste à multiplier les observations réalisées sur chaque animal de façon à réduire le nombre d'expérimentations, et in fine le nombre total d'animaux utilisés. Concrètement, une seule expérimentation avec un modèle adéquat et un nombre suffisant d'animaux devra permettre d'obtenir les informations complémentaires nécessaires pour la mise en place d'une sélection génomique dans la population caprine laitière. Durant toute la durée de l'étude les chèvres seront conduites comme en élevage traditionnel.

La totalité du projet nécessite donc l'utilisation de 30 chèvres en lactation, à savoir 15 par groupe de sélection, comprenant 6 témoins et 9 vaccinées. Au final, 24 chèvres seront soumises à une infection expérimentale de la mamelle.

3808. L'efficacité de la majorité des traitements anti-tumoraux réside dans l'élimination de la totalité des cellules tumorales par des effets cytotoxiques directs. Cependant, les thérapies conventionnelles ne remplissent pas toujours cet objectif et sont associées à une lourde morbidité. Récemment a été démontrée que la mort cellulaire induite par certains médicaments anti-tumoraux conventionnels (anthracyclines) pouvait générer une réponse immunitaire anti-tumorale participant de façon synergique à l'efficacité thérapeutique. L'utilisation de méthodes de génotypage à haut débit nous a permis d'identifier un polymorphisme du gène, FPR1 (Formyl Peptide Receptor 1), impliqués dans l'efficacité de la chimiothérapie. La présence de ce polymorphisme a été corrélée à une plus faible survie chez des patients atteints de cancer du sein recevant des anthracyclines. Le but de ce projet est de caractériser la fonction de ce polymorphisme in vivo. Nous souhaiterons effectuer cette étude en utilisant des souris C57Bl/6 (n. 2600) et aussi des souris transgéniques C57Bl/6 Fpr1-/- (n.1000), accessible dans le commerce et qui présentent un phénotype complètement normal. Nous effectuerons des expériences de vaccination et croissance tumorales. Pour la réalisation de cette étude, nous utiliserons des groupes de 5 souris C57Bl/6 WT et 10 souris C57Bl/6 Fpr1-/- et nous chercherons de regrouper les expérimentations dans le but de garder un nombre minimum d'animaux pour les groupes contrôles. Ce projet vise à une meilleure compréhension de la fonction de FPR1, un facteur pronostique négatif pour la réponse aux traitements anti-carcéaux à base d'anthracyclines, afin d'orienter la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques chez les patients atteint de cancer du sein. Nous préconisons que l'accomplissement de ce projet fournira des connaissances sur la régulation de la réponse immunitaire aux cancers pour la mise en place de stratégies thérapeutiques ciblées.

3809. Nous sommes une entreprise de développement d'anticorps monoclonaux à visée diagnostique (pour laboratoires pharmaceutiques ou vétérinaires) et recherche (laboratoires de recherche publique ou privée). Certains de nos clients demandent des productions d'anticorps en ascite. Cela nécessite l'utilisation de souris. Environ 5000 souris seront utilisées pour ce projet (sur 59 mois). Ce type de production est de plus en plus remplacé par des productions in vitro (culture cellulaire), comme l'indique les chiffres donnés ci-dessous : Environ 2000 souris ont été utilisées en 2012, 1500 en 2013, 250 au premier semestre 2014 et environ 800 sont prévues au second semestre, à partir du 29 juillet.

Bien que la production d'ascite tende à disparaître, elle ne peut pas être toujours remplacée par la production in vitro:

- certains clones sont de très mauvais producteurs in vitro
- les clients ayant déposé des brevets ou AMM sur les anticorps produits en ascite doivent continuer sur les mêmes anticorps / difficulté à changer de procédé

Les mâles sont mis jusqu'à 5 ou 6 par cage et les femelles jusqu'à 10 par cage. Afin d'améliorer le bien-être des animaux, du papier essuie-tout est introduit dans chaque cage.

3810. La famille émergente des longs ARN non-codants (lncRNA) pourrait représenter un élément manquant dans notre compréhension des altérations favorisant le développement tumoral. En effet, les lncRNA contrôlent l'expression génique par divers mécanismes incluant notamment des modifications de l'organisation de la chromatine ou le contrôle de la transcription ou de la stabilité des ARNm. De récents travaux ont également montré que les lncRNA régulent la prolifération des cellules, leur mort et leur pouvoir invasif responsable notamment des métastases cancéreuses. Cependant, l'implication des lncRNA dans la physiopathologie du cancer est fortement suspectée mais encore peu documentée. Leurs profils d'expression sont dérégulés dans divers cancers, mais moins de 1% de ces transcrits ont été caractérisés sur le plan structural et fonctionnel.

Dans ce contexte, nous nous intéressons au rôle des lncRNA dans deux sortes de tumeurs, les Cancers Broncho- Pulmonaires Non à Petites Cellules (CNPC) de stades précoces et les carcinomes spinocellulaires cutanés (cSCC). Nous avons identifié et caractérisé une dizaine de lncRNA candidats dont l'expression est augmentée dans l'un ou l'autre de ces cancers. In vitro, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de 6 de ces lncRNA dans des lignées tumorales pulmonaires ou épidermoïdes affecte des processus cellulaires comme la prolifération, la survie ou la migration suggérant que ces transcrits pourraient jouer un rôle dans le développement tumoral.

Notre objectif est de confirmer que l'inhibition de l'expression de ces 6 lncRNA altère également la croissance tumorale in vivo. Dans cette optique, nous utiliserons des souris immunodéficientes Nude afin de réaliser des xéno greffes sous-cutanées de cellules humaines d'adénocarcinome broncho-pulmonaire et des souris FVB/N pour générer des greffes syngéniques intradermiques de cellules de carcinome spinocellulaire murin. Le développement tumoral sera suivi sur une durée maximale de 3 à 4 semaines.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les hypothèses qui sous-tendent ce projet ont été préalablement validées sur des modèles cellulaires in vitro. Notamment, l'efficacité des molécules inhibitrices utilisées ainsi que leur concentration optimale ont été testées préalablement in vitro sur des cultures cellulaires, ce qui permet de réduire substantiellement le nombre d'animaux nécessaires à l'étude in vivo. Le nombre d'animaux utilisés, sera le plus restreint possible tout en permettant l'analyse statistique des résultats. Nous utiliserons au maximum un total de 360 souris dans ce projet (240 souris Nude et 120 souris FVB/N- femelles adultes). Toutes les dispositions seront prises pour limiter au maximum l'inconfort ou la douleur des animaux, en prévoyant notamment l'utilisation d'anesthésiques lors de l'injection des cellules tumorales et en établissant des points limites appropriés. Tous les intervenants sont titulaires d'une formation à l'expérimentation animale, et les animaux seront observés quotidiennement afin de prendre en charge tout signe de douleur, de stress ou d'inconfort.

A terme, une meilleure connaissance de la fonction des lncRNA dérégulés dans les CNPC ou dans les cSCC pourrait constituer une avancée significative dans la prise en charge de ces cancers en identifiant : i) de nouveaux marqueurs de mauvais pronostic, ii) des cibles moléculaires potentielles, permettant le développement de traitements anticancéreux complémentaires à l'ablation chirurgicale qui consisteraient notamment à corriger les anomalies d'expression de lncRNA dans ces tumeurs.

3811. Le projet vise à tester des composés potentiellement actifs ex vivo pour le traitement des maladies métaboliques et de leurs complications sur des modèles animaux normaux ou physiopathologiques. Les modèles physiopathologiques sont obtenus par induction alimentaire, chimique ou chirurgicale (cf. projet « Obtention de modèles animaux induits pour l'évaluation de l'effet de composés potentiellement actifs in vivo dans le traitement des maladies métaboliques et de leurs complications ») ou par l'intermédiaire de centres d'élevage agréés.

Les techniques employées dans ce projet nécessitent le recours aux organes ou aux tissus des animaux (cerveau, foie, pancréas, muscle, tissu adipeux) et ont pour finalité des dosages de substances biochimiques (glucose, insuline, glucagon...) ou d'activité enzymatique réalisés sur les tissus ou les organes cibles d'intérêt.

Le nombre total d'animaux nécessaire à la réalisation du projet est estimé à 2500 rats / souris confondus. Afin de limiter l'utilisation de ces animaux (remplacement et réduction), les seuls composés testés dans ce projet sont ceux ayant montré au préalable des effets positifs dans des tests in vitro (screening). Tous les animaux du projet font l'objet (raffinement) d'un enrichissement systématique et de conditions d'hébergement conformes à la directive 2010/63/UE, d'une période d'habituation par la manipulation avant l'expérience afin de limiter le stress, d'un protocole d'atténuation de la souffrance par l'administration d'anesthésique quand nécessaire et d'un suivi systématique des critères d'interruption (points d'arrêt anticipés).

3812. Le but du projet est d'améliorer les connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans l'obésité, une maladie aux conséquences délétères prononcées chez l'homme. De nombreuses études au cours de ces dix dernières années indiquent que l'obésité est accompagnée d'une inflammation dite « de bas grade » en périphérie, notamment dans le tissu adipeux, qui serait essentielle à la mise en place et au maintien du surpoids associé à une résistance à la leptine et à l'insuline. Une inflammation locale dans l'hypothalamus a aussi été mise en évidence chez des animaux rendus obèses par un régime hyperlipidique. L'utilisation de modèles animaux génétiquement modifiés a d'autre part permis de montrer qu'il est possible de bloquer le développement du surpoids en supprimant ces réponses inflammatoires cérébrales. Les troubles de la prise alimentaire seraient associés à une modification de l'expression des cytokines et/ou chimiokines pro-inflammatoires pouvant agir au niveau cérébral en perturbant le fonctionnement des réseaux neuronaux impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire. Il est établi que les neurones de l'hypothalamus, vers lesquels convergent de nombreux signaux nerveux et humoraux, jouent un rôle prépondérant dans ce contrôle et seraient directement ou indirectement la cible de cytokines et/ou chimiokines. Notre projet s'attachant à étudier les relations entre les organes périphériques et le système nerveux central dans la régulation du poids corporel, il est nécessaire de réaliser notre étude chez l'animal car il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de prendre en compte la complexité des interactions existantes dans la réponse périphérique et centrale d'un organisme. Notre projet s'attachera à déterminer l'importance des réponses inflammatoires sur la mise en place et/ou le maintien de l'obésité dans un modèle d'obésité nutritionnelle. Ce projet répond étroitement à la règle des 3R (Remplacement/Réduction/Raffinement) et son origine vient d'un résultat obtenu chez l'homme. En effet, il a été récemment montré que les concentrations de la chimiokine

RANTES/CCL5 étaient 8 fois plus importantes dans le sérum de patients obèses que chez des sujets contrôles. Ce résultat permet d'éviter de nombreuses expériences préliminaires sur l'animal et de restreindre notre projet à cette chimiokine de manière à étudier son rôle sur la mise en place et/ou le maintien de l'obésité. De plus, nous utiliserons, un modèle de souris établi qui ne présente pas de phénotypes dommageables et des procédures expérimentales à niveau de douleur très modéré sur des souris sauvages et des souris invalidées pour la chimiokine CCL5. Nous induirons chez la souris adulte une obésité par un régime hyperlipidique et nous pratiquerons des injections intracérébroventriculaires de molécules impliquées dans le contrôle de l'inflammation chez des souris sauvages et des souris invalidées pour la chimiokine CCL5. Notre projet nécessitera au maximum l'utilisation de 2064 souris. L'ensemble des résultats obtenus lors de ces études pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques directement liées au traitement de l'inflammation et permettra de proposer des approches pharmacologiques innovantes pour le traitement de l'obésité.

3813. La maladie rénale est un problème de santé majeur dans les sociétés occidentales et les estimations récentes suggèrent qu'une personne sur dix souffrira de pathologie rénale à un moment dans sa vie. Des défauts du développement des reins contribuent de façon significative à cette maladie et sont la cause principale d'insuffisance rénale chez les enfants. En outre, la diminution du stock du nombre de néphrons (unités de filtration du rein) a été associée à un risque accru de développer une hypertension. L'étude du développement du rein et l'identification des gènes qui sont à la base d'un développement anormal sont donc importants.

Le suppresseur de la tumeur de Wilms WT1 code pour une protéine importante pour la formation des organes. L'étude de patients a identifié des mutations dans WT1 dans une grande variété de syndromes qui affectent le système urogénital comme les syndromes WAGR, de Denys-Drash, de Frasier et la tumeur de Wilms. Ce rôle essentiel de Wt1 pendant la formation des reins au cours de l'embryogénèse a été confirmé par plusieurs modèles de souris.

L'étude du développement du rein et des malformations associées est importante, puisque cela nous permet de:

1) Identifier les gènes essentiels pour l'organogenèse et l'identification des gènes responsables des syndromes chez les patients humains. L'analyse d'échantillons de patients qui souffrent des mêmes anomalies conduira à l'identification de mutations et ainsi aidera les cliniciens lors des conseils génétiques.

2) Générer des modèles murins pour des mutations identifiées au préalable dans des pathologies humaines. Une analyse détaillée des souris modifiées génétiquement aidera à mieux comprendre l'étiologie des maladies, leur début et leur progression, cela pourrait même servir de modèle pour tester des approches thérapeutiques.

Etablir les connaissances fondamentales du développement et de la différenciation des reins in vitro est essentiel. Actuellement nous ne savons pas générer/cultiver in vitro des reins fonctionnels. Il s'agit d'un but essentiel à long terme car la culture d'organes artificiels nous permettrait de contourner la pénurie permanente de donneurs d'organes pour la transplantation.

Ces dernières années dans notre laboratoire nous avons identifié un ensemble de gènes dont l'activité dépend de celle de Wt1. L'activité de ces gènes s'avère d'être importantes pour le développement rénal. Parmi ces gènes cibles nous analyserons plus particulièrement les gènes de la famille des Rspndins, des Sox et Phf. Le but de ce projet est d'identifier le rôle de ces gènes et leur lien avec WT1. Aucune étude sur la fonction de ces gènes dans les reins n'a été décrite dans la littérature scientifique. Ces analyses sont donc uniques.

Pour ces études nous utiliserons des modèles de souris génétiquement modifiés afin d'inactiver ces gènes cibles au cours de la formation des reins. Ces expériences nous permettront de déterminer la fonction de ces gènes, et d'extrapoler ces analyses à la formation du rein humain et aux processus d'apparition de pathologies.

Comme c'est le cas pour WT1, on s'attend à ce que ces nouveaux gènes soient également importants pour la formation du rein. Pour cette raison, toute mutation dans ces gènes pourrait empêcher les reins de se former correctement.

Les anomalies importantes dans la formation du rein conduisent à une létalité à la naissance. Par conséquent, nous allons restreindre nos analyses chez l'embryon (Raffinement). Et s'il y a des animaux qui survivent à partir de la naissance ils seront observés et examinés tous les jours et les points limites seront appliqués selon notre grille de surveillance. Par conséquent, aucun animal qui pourrait avoir des reins défectueux ne sera laissé en vie. Dans une perspective de réduire le nombre de souris utilisées, nous essayons de regrouper nos expérimentations sur les échantillons prélevés (Réduction). Dès que nous atteignons le nombre suffisant d'échantillon pour conclure nos résultats de façon significative, nous arrêtons nos expérimentations (Réduction).

Afin d'éviter toute souffrance animale nous allons suivre plusieurs stratégies (Raffinement) :

1- Nous utiliserons des systèmes de mutations inductibles suite à l'administration d'une molécule (le Tamoxifène). Cela nous permettra d'induire ces mutations

- Soit à un moment précis de la vie de l'animal.

- Soit uniquement dans les reins tout au long de la vie d'adulte.

L'ensemble de ces animaux seront suivis quotidiennement et les points limites seront respectés selon notre grille de score.

Pour ce projet nous planifions d'utiliser au total 2776 animaux, ce qui correspond à 501 femelles gestantes à sacrifier, 225 animaux en élevage, et 2050 embryons. Cela correspond à une période de travail de 3 ans.

3814. L'équipe de chercheurs à l'origine de la demande a développé un nouveau système d'imagerie biologique et médicale non invasif basé sur la polarisation de lumière. Ce système est destiné à aider les chirurgiens lors de la résection de tumeurs avec l'objectif principal de distinguer en temps réel les limites de la bordure tumorale avec le tissu sain. Cette approche permettra d'optimiser la chirurgie en limitant les risques de récurrence tumorale par une meilleure élimination du tissu tumoral tout en évitant une exérèse préventive trop large (et donc potentiellement délétère) dans le tissu sain. Le prototype du système est déjà disponible, et après une phase de test sur différents objets biologiques isolés il est nécessaire d'évaluer ses performances techniques dans différents modèles de tumeurs générées chez la souris. Ce système d'analyse par imagerie non invasive, d'imagerie permet de suivre la cinétique d'évolution des tumeurs et de calculer l'accroissement tumoral individuel, sans avoir à sacrifier des animaux. Il permet donc de réduire le nombre d'animaux utilisés (150 pour la totalité de l'étude) par rapport à une étude classique en expérimentation animale.

Le nombre d'animaux utilisés par groupe dans cette étude est réduit au minimum et correspond à ce qui est classiquement utilisé en expérimentation animale. Ceci afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables.

De plus, les souris seront surveillées quotidiennement depuis l'injection jusqu'au sacrifice, pour détecter des signes éventuels de douleurs post-opératoires. Si un animal présente des symptômes traduisant l'apparition de douleurs, une injection en IP d'un analgésique sera effectuée 1x par jour. Les souris seront également pesées et leur état général évalué 3 fois par semaine. Les données issues de ce suivi individuel seront enregistrées dans un tableau spécifique définissant les points limites expérimentaux, et aussitôt analysées. De ce fait, si un animal atteint à un moment donné de l'expérience, un de ces points limites définis, il sera immédiatement sacrifié.

3815. L'angiogenèse est un processus de formation de nouveaux vaisseaux à partir d'un réseau préexistant, et constitue une étape limitante de la progression tumorale.

Le ciblage de facteurs impliqués dans l'angiogenèse représente un enjeu majeur dans la prise en charge des patients atteints de cancers. Néanmoins, l'adaptation des tumeurs en réponse à un traitement anti-angiogénique peut entraîner leur récurrence, avec un caractère souvent plus agressif. Il est donc nécessaire d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour contrer ces mécanismes de résistance. Nous utiliserons le modèle murin RIP1-Tag2 de tumorigenèse pancréatique pour identifier les déterminants cellulaires et moléculaires impliqués dans l'angiogenèse tumorale.

Ce modèle a permis de mettre en évidence le « switch angiogénique », une étape précoce et nécessaire au développement de tumeurs, et d'identifier plusieurs cibles impliquées dans l'angiogenèse tumorale en pathologie humaine. Il constitue donc un modèle préclinique pertinent, rassemblant l'ensemble des composantes du microenvironnement des tumeurs et permettant leur étude à des stades précoces et tardifs de la progression tumorale.

Les expériences *in vitro* ne permettant pas de modéliser la complexité et le caractère multifactoriel de cette progression, l'utilisation du modèle animal est donc nécessaire.

Des résultats préliminaires suggèrent que la ténascine-C (TNC) et la périostine (POSTN), deux protéines de la matrice extracellulaire, contribuent à la formation de lésions précoces vascularisées (à 8 semaines) et au développement de tumeurs tardives (12 semaines). Une augmentation de l'expression de la périostine dans les souris invalidées pour la TNC suggère un mécanisme compensatoire lors de la progression des insulinomes.

Nous souhaitons donc étudier les conséquences histologiques, fonctionnelles et moléculaires de l'inactivation de la TNC, de la POSTN, et des deux molécules sur l'angiogenèse et le développement de tumeurs.

Nous souhaitons également analyser les conséquences de leur absence/inactivation, sur la réponse adaptative (invasion tumorale accrue) observée en réponse au traitement de souris RIP1-Tag2 par un anticorps bloquant le VEGFR2, un récepteur jouant un rôle crucial dans l'angiogenèse tumorale.

Deux protocoles de traitements sont prévus avec cet anticorps :

i) de 5 à 8 semaines pour prévenir le « switch angiogénique » ;

ii) de 10 à 12 semaines pour étudier l'impact de la TNC et de la POSTN sur l'invasion tumorale induite par le traitement.

Afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, nous utiliserons des groupes de 10 souris au stade précoce de formation des lésions angiogéniques (8 semaines) et à un stade tardif permettant la détection de tumeurs macroscopiques (12 semaines), seront utilisés pour les analyses en histologie (paraffine et tissus congelés), en fonctionnalité vasculaire et en hypoxie intra-tumorale.

Des groupes de 20 souris seront utilisés pour l'analyse transcriptionnelle et protéomique des molécules dérégulées au cours du « switch angiogénique » (à 8 semaines), pour les 4 génotypes d'intérêt (groupe contrôle inclus).

Les expériences de traitements anti-angiogéniques nécessiteront des groupes de 25 animaux (protocole de prévention à 8 semaines), ou 20 souris (intervention à 12 semaines), prenant en compte la mortalité escomptée liée à l'allèle tumorigénique, ce pour 4 génotypes, 2 traitements (anticorps bloquant et contrôle) à deux stades de développement, portant le nombre total d'animaux expérimentaux à 840 (hors production de ces animaux).

Le nombre d'animaux utilisés par groupe dans cette étude est réduit au minimum et correspond à ce qui est classiquement utilisé en expérimentation animale. Ceci afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables.

De plus, les souris seront surveillées quotidiennement tout au long de l'étude jusqu'au sacrifice, pour détecter des signes éventuels de douleurs. Si un animal présente des symptômes traduisant l'apparition de douleurs, une injection en IP d'un analgésique sera effectuée 1x par jour. Si un animal à un moment donné de l'expérience, présente toujours des signes de douleur malgré l'injection de l'analgésique, il sera alors immédiatement sacrifié.

3816. L'angiogenèse est un processus de formation de nouveaux vaisseaux à partir d'un réseau préexistant, et constitue une étape limitante de la progression tumorale.

Le ciblage de facteurs impliqués dans l'angiogenèse représente un enjeu majeur dans la prise en charge des patients atteints de cancers. Néanmoins, l'adaptation des tumeurs en réponse à un traitement anti-angiogénique peut entraîner leur récurrence, avec un caractère souvent plus agressif. Il est donc nécessaire d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour contrer ces mécanismes de résistance. Nous utiliserons le modèle murin RIP1-Tag2 de tumorigenèse pancréatique pour identifier les déterminants cellulaires et moléculaires impliqués dans l'angiogenèse tumorale.

Ce modèle a permis de mettre en évidence le « switch angiogénique », une étape précoce et nécessaire au développement de tumeurs, et d'identifier plusieurs cibles impliquées dans l'angiogenèse tumorale en pathologie humaine. Il constitue donc un modèle préclinique pertinent, rassemblant l'ensemble des composantes du microenvironnement des tumeurs et permettant leur étude à des stades précoces et tardifs de la progression tumorale.

Les expériences *in vitro* ne permettant pas de modéliser la complexité et le caractère multifactoriel de cette progression, l'utilisation du modèle animal est donc nécessaire.

Des résultats préliminaires suggèrent que la ténascine-C (TNC) et la périostine (POSTN), deux protéines de la matrice extracellulaire, contribuent à la formation de lésions précoces vascularisées (à 8 semaines) et au développement de tumeurs tardives (12 semaines). Une augmentation de l'expression de la périostine dans les souris invalidées pour la TNC suggère un mécanisme compensatoire lors de la progression des insulinomes.

Nous souhaitons donc étudier les conséquences histologiques, fonctionnelles et moléculaires de l'inactivation de la TNC, de la POSTN, et des deux molécules sur l'angiogenèse et le développement de tumeurs.

Nous souhaitons également analyser les conséquences de leur absence/inactivation, sur la réponse adaptative (invasion tumorale accrue) observée en réponse au traitement de souris RIP1-Tag2 par un anticorps bloquant le VEGFR2, un récepteur jouant un rôle crucial dans l'angiogenèse tumorale.

Deux protocoles de traitements sont prévus avec cet anticorps :

i) de 5 à 8 semaines pour prévenir le « switch angiogénique » ;

ii) de 10 à 12 semaines pour étudier l'impact de la TNC et de la POSTN sur l'invasion tumorale induite par le traitement.

Afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, nous utiliserons des groupes de 10 souris au stade précoce de formation des lésions angiogéniques (8 semaines) et à un stade tardif permettant la détection de tumeurs macroscopiques (12 semaines), seront utilisés pour les analyses en histologie (paraffine et tissus congelés), en fonctionnalité vasculaire et en hypoxie intra-tumorale.

Des groupes de 20 souris seront utilisés pour l'analyse transcriptionnelle et protéique des molécules dérégulées au cours du « switch angiogénique » (à 8 semaines), pour les 4 génotypes d'intérêt (groupe contrôle inclus).

Les expériences de traitements anti-angiogéniques nécessiteront des groupes de 25 animaux (protocole de prévention à 8 semaines), ou 20 souris (intervention à 12 semaines), prenant en compte la mortalité escomptée liée à l'allèle tumorigénique, ce pour 4 génotypes, 2 traitements (anticorps bloquant et contrôle) à deux stades de développement, portant le nombre total d'animaux expérimentaux à 840 (hors production de ces animaux).

Le nombre d'animaux utilisés par groupe dans cette étude est réduit au minimum et correspond à ce qui est classiquement utilisé en expérimentation animale. Ceci afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables.

De plus, les souris seront surveillées quotidiennement tout au long de l'étude jusqu'au sacrifice, pour détecter des signes éventuels de douleurs. Si un animal présente des symptômes traduisant l'apparition de douleurs, une injection en IP d'un analgésique sera effectuée 1x par jour. Si un animal à un moment donné de l'expérience, présente toujours des signes de douleur malgré l'injection de l'analgésique, il sera alors immédiatement sacrifié.

3817. Le cerveau joue un rôle clé dans la mémoire, la pensée, le langage et la conscience. Au cours du développement, les neurones du cerveau doivent migrer sur de très longues distances avant pouvoir rejoindre leur destination finale. La migration de ces neurones et l'établissement de connexions entre neurones sont essentielles pour le bon fonctionnement du cerveau, et dépendent de l'expression de plusieurs gènes. L'altération de ces processus a de lourdes conséquences sur la santé humaine et peut conduire à des maladies neurologiques graves, comme le retard mental, l'épilepsie et l'autisme. Les études génétiques ont identifié plusieurs gènes associés à des malformations du développement du cerveau. Notre projet vise à étudier plusieurs mécanismes majeurs à la base du développement du cerveau en posant des questions clés sur la façon dont le cerveau s'organise pendant la vie embryonnaire.

Nous utilisons la souris comme modèle du développement du cerveau chez un mammifère pour mieux comprendre les mécanismes à la base des troubles du développement du cerveau chez l'homme. Nous avons modifié génétiquement des facteurs de transcription impliqués dans la migration cellulaire et la maturation neuronale : COUP-TFI, COUP-TFII et Hoxb1. Ces gènes sont exprimés à des stades spécifiques au cours du développement et agissent dans des régions et populations distinctes du cerveau. Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons comparer des souris génétiquement modifiées pour ces gènes avec des souris contrôles à divers stades de développement et marquer les types cellulaires impliqués. Nous utiliserons des techniques d'analyse histologique post mortem, des immunomarquages et de la détection d'ARN (hybridation in situ) pour suivre la distribution des types cellulaires et la migration cellulaire. Notre étude est basée sur une caractérisation des souris génétiquement mutantes combinée à des approches ex vivo, comme le transfert de gènes et l'enregistrement de l'activité neuronale dans des cultures organotypiques de tissus prélevés post mortem, qui nous permettront de tester directement les conséquences fonctionnelles des altérations du développement induites et des gènes transférés.

Nos procédures expérimentales incluront principalement la fixation du tissu cérébral par perfusion intracardiaque d'une solution fixative, et pour certains animaux l'injection de traceurs (fluorochromes) par stéréotaxie pour suivre la connectivité axonale des différentes populations neuronales. Nous utilisons l'électroporation in utero, qui nous permettra de modifier l'expression des gènes dans des zones ciblées de l'encéphale en développement. Notre projet inclut également l'injection de nucléotides modifiés pour suivre la multiplication cellulaire in vivo, et l'élevage d'animaux pour lesquels l'altération de l'expression de COUP TFI au cours du développement modifie le comportement à l'âge adulte. L'association des techniques d'études sur organes ex vivo de préférence et de cultures cellulaires in vitro nous permettra de remplacer autant que possible les expériences sur animaux vivants et de réduire finalement le nombre total d'animaux utilisés selon la règle des 3 « R ». Les procédures sont mises en œuvre en utilisant systématiquement des traitements analgésiques et des critères d'arrêt précoce des procédures comme mesures de raffinement de l'expérimentation. Nous prévoyons d'utiliser au plus 2615 souris dans le cadre de ce projet (1670 adultes, 720 souriceaux (de P0 à P7) et 225 jeunes adultes (P21)

3818. L'insuffisance cardiaque (IC) est une des principales causes de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. Compte tenu du vieillissement de notre population et la prévalence des maladies telles que le diabète et l'hypertension qui prédisposent les patients à ce syndrome, l'IC va augmenter dans la prochaine décennie. Les traitements actuels ralentissent sa progression néanmoins il reste un réel besoin de développer de nouvelles thérapies nécessitant des tests dans des modèles animaux appropriés.

En effet, l'utilisation d'animaux est inévitable dans l'étude d'une maladie aussi complexe qui affecte également d'autres organes que le cœur (les reins, le système nerveux, le système hormonal). Les interactions complexes entre ces organes, qui jouent un rôle majeur dans le développement de la pathologie, ne peuvent pas être reproduites de manière adéquate avec des cellules isolées ou des simulations informatiques.

Ce modèle a été utilisé avec succès pour développer des médicaments actuellement utilisés pour traiter l'insuffisance cardiaque tels que les inhibiteurs du système rénineangiotensine. Les études réalisées au sein du Centre de Recherche sont encadrées par des consignes établies et validées par le Comité d'Éthique, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (l'hébergement, les soins, la manipulation, les expérimentations), et ayant toutes pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal. Par ailleurs, chaque procédure impliquant l'utilisation d'un animal est soumise à approbation par le Comité d'Éthique, avant toute intégration des animaux dans les études. Un support en biostatistiques est apporté au Comité d'Éthique par des experts de la spécialité, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées, et réduire ainsi le nombre d'animaux utilisés dans les études. Enfin, les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques fondamentaux.

Etant donné la complexité du modèle, seules les molécules très avancées pourront être testées ce qui limitera le nombre d'études et nous estimons que nous allons utiliser 128 chiens par an.

3819. Les protocoles de radiothérapie sont établis à partir du modèle linéaire-quadratique qui découle de l'expérience clinique et des modèles biologiques. Toutefois, les connaissances biologiques dans le domaine des irradiations fortes restent lacunaires. De ce fait, différents essais cliniques ont mis en évidence l'incapacité de ce modèle à prédire la réponse thérapeutique lors de l'utilisation de doses fortes ou de certains fractionnements de dose.

Ainsi, nous proposons d'étudier la comparaison biologique de l'effet des irradiations fortes et fractionnées (délivrance de fractions de dose de 2 Gy par jour) sur des tumeurs obtenues chez la souris nude. Ce modèle murin est en effet très couramment utilisé en cancérologie. Cette étude permettra une meilleure compréhension des deux types d'irradiation du point de vue biologique et pourra améliorer les protocoles de radiothérapie chez l'humain.

Une approche *in vitro* a déjà été effectuée et a permis de proposer certaines hypothèses à valider. De ce fait, une étude *in vivo* doit être entreprise afin de valider la réponse à l'irradiation dans un modèle animal et permettre l'analyse de la réponse moléculaire, l'effet sur la vascularisation et finalement la réponse tumorale aux irradiations (qui ne peuvent être observés *in vitro*). A l'heure actuelle, aucune expérimentation similaire sur ce sujet n'a été publiée *in vivo*.

Afin d'obtenir des données significatives du point de vue statistique, nous envisageons l'utilisation de lots de 8 souris par condition, ce qui amènerait le nombre total d'animaux à 178. Ce nombre de souris est en effet couramment utilisé dans la littérature en cancérologie. De nombreuses analyses seront réalisées sur les tumeurs prélevées afin d'exploiter au maximum ces expériences *in vivo*.

Le protocole d'irradiation sera mis au point de manière à protéger les souris au maximum et les irradiations seront administrées de manière ciblées. Des boucliers en plomb permettront de protéger les souris en irradiant uniquement la tumeur. Les irradiations seront effectuées sous anesthésie générale de l'animal afin de ne subir aucun stress. De plus, l'état général de la souris sera régulièrement surveillé afin de sacrifier l'animal lorsqu'il aura perdu 20% de sa masse corporelle de départ ou lorsque la tumeur aura atteint un volume de 2000 mm³, deux des critères permettant de délimiter le point limite. En cas de douleur, des analgésiques seront administrés aux souris. Les souris nudes seront hébergées dans des conditions spécifiques garanties sans pathogènes.

3820. Nous effectuerons ces expériences afin de mieux comprendre le rôle du les ganglions de la base (GB) dans le contrôle du mouvement et de la cognition. Certains des noyaux du GB, notamment le noyau subthalamique (NST) et le globus pallidus interne (GPi), sont des cibles de choix du traitement neurochirurgical par stimulation cérébrale profonde (SCP) des maladies comme la maladie de Parkinson (MP) ou le trouble obsessionnel compulsif. La MP provoque des symptômes moteurs invalidants qui sont améliorés significativement par la SCP. Cependant, des effets secondaires peuvent survenir, source de handicaps. Ceci souligne le manque de compréhension du mode d'action de la SCP et du rôle du NST et GPi. Comprendre le rôle de ces structures apparaît primordial pour améliorer la SCP. L'objectif de nos expériences est de caractériser le rôle du NST et GPi dans la préparation, la sélection, l'initiation et l'exécution du mouvement. Nous enregistrerons l'activité neuronale du NST, GPi et afférences corticales motrices chez le singe normal et rendu légère parkinsonien. Comprendre comment ces zones initie et guide les mouvements à l'état normal et parkinsonien offrira une meilleure compréhension du système et pourrait permettre d'améliorer le traitement neurochirurgical par stimulation profonde chez les patients. Ces travaux impliqueront 10 singes macaques. L'utilisation de primates pour notre projet est essentielle car notre objectif est de comparer directement les résultats obtenus chez l'homme et l'animal pour des expériences menées en parallèle. D'une façon générale, les similitudes relatives entre les modes d'action et de perception des primates humains et non humains facilitera grandement cette comparaison, qui se révèle parfois impossible pour avec d'autres espèces. De plus, l'un des buts majeurs de notre projet de recherche est de comprendre la pathophysiologie de la maladie de Parkinson. Pour cela, nous utiliserons un modèle singe de la maladie, ce modèle s'étant avéré essentiel pour le développement de la stimulation cérébrale profonde chez les patients parkinsoniens. Il reste le meilleur modèle animal de la maladie, puisqu'il développe de façon reproductible les symptômes cardinaux de la maladie, ce qui est crucial pour établir des comparaisons avec les données obtenues chez l'homme. Le modèle primate est donc le plus prédictif et le plus pertinent pour espérer une transposition à l'homme la plus fiable possible. Les animaux sont élevés en groupe, ce qui permet un bon maintien de leurs relations sociales et ainsi de leur bien-être, et nous prévoyons, lorsque cela est possible, de les réhabiliter dans un centre d'accueil agréé.

3821. L'expérimentation animale de pharmacologie est inscrite dans le programme pédagogique national des études du Diplôme Universitaire de Technologie (DUT) option génie biologique « analyses biologique et biochimique » (ABB). Elle est présente dans les modules de 1ère année (physiologie animale) et 2nde année (pharmacologie expérimentale). Les étudiants du DUT ABB seront des futurs techniciens polyvalents. Ils doivent donc acquérir des gestes techniques dans le domaine de l'expérimentation animale qui leur serviront au cours de leur vie professionnelle, de leur poursuite d'étude éventuelle en UFR sciences.

Les travaux pratiques dispensés sur rongeurs vivants (rats) sont en lien direct avec l'enseignement dispensé au cours des 2 années de DUT ABB. Ils illustrent les régulations des grandes fonctions physiologiques (motilité intestinale, pression artérielle, respiration, système nerveux central...). 2000 rats sur 5 années seront utilisés

Notre projet respecte le principe des « 3R » :

La réduction du nombre d'animaux :

- Les étudiants travaillent en binôme ou trinôme sur un même animal pour la majorité des TP.

- Un même animal peut être utilisé pour plusieurs manipulations. Cela permet de réduire l'utilisation d'animaux. (ex 1 animal pour 4 manipulations).

- Un animal euthanasié en fin de séance pourra servir aux prélèvements d'organes pour l'histologie.

Le raffinement : les conditions d'hébergements sont celles validées par les services de la direction départementale de la protection des populations lors de l'agrément de l'établissement. Les animaux sont emmenés dans un local jouxtant la salle de travaux pratiques au calme avant d'être anesthésiés et analgésiés conformément à la Loi.

Le remplacement est utilisé si possible. L'IUT de Quimper s'est doté d'appareils de monitoring modernes permettant des simulations d'expériences, cependant toutes les manipulations ne sont pas disponibles en virtuel et aucune simulation ne pourra remplacer le geste technique acquis.

3822. Notre recherche est concentrée sur l'étude des cellules souches de l'intestin, de la glande mammaire et de la prostate, des tissus qui sont aussi à l'origine d'importantes pathologies, notamment le cancer colorectal, le cancer du sein et celui de la prostate. Nous étudions la voie de signalisation Notch, en raison de son rôle central dans le développement et l'homéostasie des tissus. Nous avons récemment développé une collection unique de souris transgéniques qui nous permettent d'évaluer l'expression de Notch dans les cellules souches normales et tumorales *in vivo*. L'organisation générale, le développement et le fonctionnement des trois tissus que nous étudions sont très similaires chez la souris et chez l'homme. Le modèle souris est donc très utilisé dans la communauté scientifique afin d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires du développement normal du tissu et de la tumorigenèse.

Notre stratégie repose essentiellement sur l'analyse des tissus prélevés chez nos modèles murins transgéniques. Pour les 5 ans à venir, il est prévu d'étudier le phénotype d'une dizaine de lignées transgéniques différentes, conduisant à l'analyse d'environ 1000 souris au total.

Toutes les souris transgéniques sont viables et ne présentent aucun problème sévère de santé à l'âge adulte. Les modèles de tumorigenèse que nous avons développés n'entraînent pas de souffrance notable. Les tumeurs restent localisées et sont prélevées conformément aux règles de l'éthique. Toutes les interventions prévues sur les souris vivantes sont peu invasives (injections intra-péritonéales non douloureuses, transplantation cellulaire après chirurgie légère, castration). Toutes les précautions sont prises pour réduire au minimum la souffrance et le stress des souris (anesthésie pour les expériences de transplantation, soins opératoires et post-opératoires, surveillance continue des souris développant des tumeurs).

Le nombre de souris utilisées est ajusté au plus bas mais compatible avec l'obtention de résultats statistiquement fiables. Pour réduire au minimum le nombre d'animaux et exploiter au mieux les prélèvements, des informations seront obtenues au niveau phénotypique, cellulaire et moléculaire à partir du même animal. Pour cela, lorsque cela est possible, différents tissus seront prélevés sur le même animal. La stratégie de croisement des souris transgéniques est optimisée afin d'obtenir les cohortes de souris appropriées. De plus, une imagerie longitudinale sera utilisée pour suivre la croissance de tumeurs greffées et des implants orthotopiques évitant ainsi le sacrifice inutile d'animaux au cours du temps.

Dans un souci de remplacement, nous concentrons nos efforts sur l'optimisation de cultures organotypiques *in vitro* pour analyser le comportement dynamique des cellules souches. Nous les utilisons en priorité par rapport à l'expérimentation *in vivo*. Toutefois, les « organoïdes » étant composés exclusivement des cellules épithéliales, les données obtenues *in vitro* devront être complétées par une analyse *in vivo* dans un environnement cellulaire physiologique. De plus, les animaux seront essentiels pour suivre les cellules souches cancéreuses au sein de la tumeur, étant donné qu'il n'existe actuellement aucun modèle *in vitro* qui puisse récapituler l'hétérogénéité cellulaire tumorale. L'ensemble de notre projet contribuera à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulant la fonction des cellules souches et de leur rôle dans le développement tumoral.

3823. Les métastases, qui dérivent de la tumeur primaire, sont un vrai problème de santé publique. Les patients développant des métastases présentent un risque accru de thrombose et sont associés à un pronostic sombre et une survie diminuée. La complexité biologique de la formation de métastase est un point important qui ne peut être étudié que par des modèles animaux. Actuellement deux modèles animaux sont couramment utilisés : le modèle de métastase expérimentale (injection de cellules cancéreuses dans la circulation sanguine) et le modèle orthotopique avec le développement de métastases spontanées. Nous nous proposons d'étudier ces deux modèles pour les comparer au développement de métastase chez l'homme et évaluer les avantages et inconvénients. Pour cela nous nous proposons de travailler dans un modèle syngénique murin. Les lignées cancéreuses cellulaires utilisées sont transfectées par un vecteur bioluminescent pour évaluer l'évolution de la tumeur primaire et des métastases.

Nous étudierons la cinétique de thrombose *in vivo* (accumulation de plaquettes et de fibrine) et évaluerons la part de cellules cancéreuses circulantes et les microparticules dérivées des cellules cancéreuses par prélèvements sanguins. Dans le but de suivre la règle des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer) nous envisageons d'effectuer dans la mesure du possible ces expérimentations en parallèle de sorte à limiter le nombre de souris utilisées. Nous avons également défini des points limites stringents de manière à ce que la survenue d'un seul de ces points limites conduise à l'euthanasie immédiate de l'animal. Pour mener à bien cette étude, et dans le respect de la règle des 3R, nous aurons besoin au maximum de 310 souris sur 5 ans. Cet effectif pourra être réduit si une différence statistique est obtenue avec des groupes comprenant un nombre de souris restreint.

3824. La neuromyopathie de réanimation représente la pathologie neurologique acquise la plus fréquente en réanimation. Elle est associée à une augmentation de la morbidité, de la mortalité et de la durée du séjour à l'hôpital, mais également à des séquelles à long terme pouvant altérer la qualité de vie des patients. Son principal facteur de risque est une réaction inflammatoire systémique secondaire à une infection (sepsis). L'atteinte musculaire est sévère et elle prédomine au niveau des membres, mais touche également les muscles respiratoires rendant l'utilisation d'un respirateur artificiel obligatoire et durable. La physiopathologie de la neuromyopathie est complexe et incomplètement connue. L'inflammation et en particulier les cytokines pro-inflammatoires, semblant jouer un rôle central, sont à l'origine d'une production de radicaux libres très toxiques et aux conséquences multiples. Le présent projet se propose d'étudier les effets thérapeutiques de biomolécules à activité antioxydante (composés phénoliques, huiles essentielles,...) extraites de plantes extrémophiles issues de régions arides et/ou à forte salinité, sur des lots de rats septiques. L'administration des extraits se fera par gavage, puis différentes mesures seront ensuite réalisées à partir de prélèvements effectués sur les animaux (plasma, muscle) avec des approches électrophysiologiques, histologiques, biochimiques et par biologie moléculaire. Ces travaux seront menés sur une cohorte de 350 rats wistar, effectif justifié par le besoin important de matériel biologique utilisé dans plusieurs techniques de dosage. Préalablement, des essais *in vitro* ont été réalisés sur des cellules intestinales en culture afin de confirmer l'absence de toxicité, de préciser les posologies qui seront préconisées ultérieurement et de mieux comprendre l'activité anti-oxydante de ces extraits végétaux. Cette étape a un objectif double : substituer une partie des tests sur animaux par des tests *in vitro* (Remplacement) et donc en conséquence de réduire le nombre d'animaux expérimentés en se limitant à l'effectif minimal permettant une validation scientifique des résultats obtenus (Réduction). Comme l'exige l'éthique, dans tous les cas, des protocoles d'anesthésie et d'analgésie appropriés seront appliqués (Raffinement).

3825. La construction d'un réseau de neurones fonctionnel au cours du développement dépend non seulement des programmes génétiques, mais aussi des interactions cellulaires qui organisent et régulent la séquence temporelle de ces programmes. Un des aspects remarquables de ces interactions est l'apparition d'une activité électrique périodique qui apparaît dès la mise en place des premiers groupes de neurones. Cette activité périodique est une marque générale du système nerveux central immature et elle est indispensable au bon développement des réseaux de neurones. Cependant, peu de choses sont connues sur les mécanismes cellulaires et moléculaires qui contrôlent cette activité primitive aux stades précoces du développement. Nous avons récemment montré que l'activité électrophysiologique spinale chez l'embryon apparaît au début de la synaptogenèse et que des progéniteurs, les cellules radiaires régulent l'activité de la moelle épinière et sa propagation en libérant de la glycine par un mécanisme mécano-sensible. Nous poursuivons notre étude en analysant les mécanismes qui sous-tendent les bouffées d'activité des premiers réseaux de neurones. Il s'agit de comprendre comment les motoneurones et/ou les interneurones peuvent jouer les chefs d'orchestres (hiérarchisation de l'activité) de cette activité précoce au moment où apparaît l'activité coordonnée des groupes de neurones dans la moelle épinière de souris (entre E12.5 et E14.5). Pour répondre à cette question nous utilisons des approches multiples associant enregistrement extracellulaire, enregistrement en patch clamp des motoneurones, immunohistochimie et microscopie confocale. Pour cela, les embryons sont prélevés après euthanasie de la mère pour les études moléculaires et cellulaires et les études fonctionnelles (patch clamp ; imagerie calcique). Nombre de souris au stade embryonnaire E14.5 : 400.

Dans la mesure où la formation et le fonctionnement de ces réseaux ne peut être observée que dans le cadre d'un organisme vivant, cette étude nécessite l'utilisation de souris transgéniques et ne peut être remplacé par une autre approche. Le nombre d'animaux utilisés a été réduit autant que possible tout en préservant la pertinence scientifique du projet. Enfin, le projet n'implique aucune manipulation susceptible d'induire une douleur sur l'animal vivant, tous les animaux étant sacrifiés avant manipulation expérimentale.

3826. Diversifier ses sources d'approvisionnement est une clef de la survie d'un individu et de ses capacités d'adaptation aux changements du milieu. Une espèce ubiquiste comme la souris domestique est capable de coloniser des milieux très différents de son milieu naturel d'origine et est ainsi considérée comme une spécialiste de la non-spécialisation. Elle a suivi l'être humain dans ses déplacements et est présente presque partout sur Terre. Cette réussite écologique implique des changements drastiques du régime alimentaire afin d'utiliser les ressources disponibles localement. Inclure de nouveaux aliments dans son régime alimentaire constitue néanmoins un risque pour l'individu. Que ce soit en milieu naturel ou en milieu anthropisé, les risques d'intoxication sont nombreux. Afin de réduire ces coûts, les souris peuvent utiliser les congénères comme sources d'information. On a ainsi pu montrer chez le rat de laboratoire l'existence de « centres d'information » dans lesquels les individus qui venaient de consommer une nourriture odorisée pouvaient servir de démonstrateur passif pour des rats naïfs par le biais des relations sociales. Ces rats informés choisissaient alors une nourriture odorisée par la même substance lors d'un test de choix. D'autre part on sait aussi que les odeurs corporelles véhiculent un grand nombre d'informations sur l'individu qui les émet, dont son état sanitaire et son régime alimentaire. Il a été récemment montré que les rongeurs étaient capables d'utiliser cette information pour choisir entre deux aliments nouveaux. L'avantage de cette stratégie est qu'elle n'implique pas un contact direct entre le sujet naïf et le donneur d'odeur. Le but de la présente étude est de comparer ces deux modalités de prises d'information (i.e. contact social vs flairage d'une marque odorante d'un congénère) sur les choix alimentaires de souris domestiques naïves (sujets). Cette étude se déroulera en trois étapes :

1) Mise au point méthodologique des protocoles des deux types de prises d'information afin de permettre leur comparaison. Le test de choix est identique, seul diffère le protocole de prise d'information : contact direct avec un congénère démonstrateur ou mise en présence de la marque odorante d'un congénère donneur. L'étude se fera chez des sujets familiers ou non familiers avec le démonstrateur/donneur. On s'attend à ce que l'effet du niveau de familiarité sur la prise d'information soit plus important dans le cas d'un contact direct avec le congénère. Les animaux seront des femelles adultes, plus tolérantes que les mâles. Quatre lots de 16 femelles serviront de sujets (facteurs croisés : type de prise d'information x niveau de familiarité), et 32 femelles supplémentaires serviront de donneur/démonstrateur, soit au total 96 femelles.

2) Application du protocole au transfert d'information au sein de différentes dyades : mâle-mâle (deux lots de 16 mâles serviront de sujets et 16 mâles supplémentaires serviront de donneur) ; mâle-femelle (64 femelles et les donneurs mâles sont ceux utilisés pour la transmission entre mâles). Dans le cas des rencontres entre mâles adultes et du fait de leur forte intolérance, seuls les tests utilisant les marques odorantes seront réalisés. Au total 48 mâles et 64 femelles sont prévus pour cette étape.

3) Le but de cette troisième étape est d'évaluer l'influence de l'information acquise lors d'un test de choix en situation conflictuelle. La phase de prise d'information est la même que pour les étapes 1 et 2 et seul change le test de choix. Lors du test de choix standard les deux aliments nouveaux sont présentés ensemble dans la cage de test. Ici chaque aliment sera présenté dans une logette indépendante à laquelle le sujet aura un libre accès. La logette contenant l'aliment donné au congénère démonstrateur contiendra un odorant répulsif (odeur de prédateur par exemple), par contre la logette contenant l'autre aliment nouveau ne sera pas odorisée. Le test comparera les deux systèmes de prise d'information et utilisera 32 sujets femelles.

Les régimes alimentaires seront constitués d'une pâte alimentaire commune auquel on ajoutera des additifs odorants permettant de les différencier.

Un total de 240 souris (48 mâles et 192 femelles), de souche sauvage et issues de notre élevage, est prévu pour cette étude. La réutilisation systématique des sujets d'une expérience en donneurs/démonstrateurs d'une autre expérience permet de limiter le nombre total d'animaux utilisés. A noter que les souris ont un vieillissement rapide et ne peuvent être utilisées de manière fiable passé un an.

Pour toutes les rencontres sociales, le comportement relationnel des animaux sera quantifié et une procédure est prévue pour interrompre la rencontre en cas de conflit (point limite). Afin d'identifier les individus, des coupes de poils seront réalisées sur des régions spécifiques du corps des animaux (flanc gauche, flanc droit etc.).

3827. Le projet a pour objectif d'assurer que la consommation d'aliments complets, destinés aux chats et aux chiens, assure un fonctionnement optimal des systèmes digestif et rénal en vue de promouvoir et maintenir la santé de ces mêmes espèces. Le projet s'étalera sur une période de 5 ans ; période durant laquelle différentes recettes d'aliments seront évaluées selon des procédures identiques. Le projet requerra sur cette période de 5 ans, 80 chats et 80 chiens. Dans le cadre de ce projet, les animaux seront hébergés individuellement pendant une courte période afin de pouvoir collecter des échantillons de selles et d'urine. Dans le cadre de l'application des 3R, les mesures suivantes ont été prises : 1) l'hébergement individuel a été limité au nombre de jours minimum requis pour assurer une collecte suffisante d'échantillons ; 2) La surface des logements individuels utilisés est supérieure aux exigences réglementaires en vigueur pour les espèces concernées, et favorisent le contact visuel, olfactif et auditif avec d'autres individus de la même espèce ; 3) Le nombre d'animaux par groupe d'étude a été réduit au minimum recommandé dans la littérature ; 4) Les animaux bénéficient d'un contact quotidien et régulier avec leurs soigneurs, à l'intérieur ou à l'extérieur de leur box d'hébergement.

3828. La peau constitue la première barrière de la peau contre les rayonnements ultraviolets qui sont responsables de dommages au niveau cellulaire et peuvent conduire au mécanisme de cancérisation cutanée. Les facteurs de transcription USF1 et AhR ainsi que l'enzyme TYRP1 jouent un rôle majeur dans les mécanismes de protection contre les UV en favorisant la pigmentation. Leurs implications dans d'autres fonctions plus générales comme la prolifération cellulaire et l'invasion ont été mise en évidence lors de la réponse UV. Ces rôles sont supportés à la fois par USF1, AhR et TYRP1 mais aussi par les ARNm régulés par ces trois acteurs clefs de la pigmentation. Notre projet vise à caractériser le rôle de ces acteurs d'une part dans le contrôle physiologique de la réponse UV au niveau de la peau et d'autre part dans l'apparition de tumeur et la progression tumorale (mélanome). Le projet porte sur :

- Le suivi de la progression tumorale de cellules de mélanome génétiquement invalidés (TYRP1, USF, AhR ou les acteurs en aval) greffées dans des souris nude nmri ou des souris C57/BL6 ou hairless (wt ou KO) pour USF1 et AhR.
- La modulation de cette croissance tumorale par des molécules thérapeutiques.

Remplacement : Au cours du projet, les différents gènes candidats et molécules thérapeutiques validés expérimentalement in vitro seront testés in vivo chez la souris qui est le seul modèle pour étudier le rôle de nos gènes candidats sur le développement de tumeurs et pour tester l'efficacité thérapeutique de nouvelles molécules candidates anti-mélanome. Pour cette étude, nous utiliserons le modèle murin de souris invalidées de manière constitutive pour le gène *Usf1* ou *AhR* dont dispose notre équipe.

Dans notre projet, nous n'avons pas d'autres alternatives (modèles) pour étudier le rôle de nos gènes candidats sur le développement de tumeurs et pour tester l'efficacité thérapeutique de nouvelles molécules candidates anti-mélanome. Seuls les gènes candidats et molécules thérapeutiques validés expérimentalement in vitro seront testés in vivo.

Réduction : L'expertise développée au sein du groupe pour préparer les cellules à greffer et la dextérité acquise pour leur injection permettent déjà de réduire au minimum ce nombre de souris par lot d'un point de vue statistique (10/lot).

Raffinement : afin de réduire au maximum la douleur, le stress et l'angoisse des animaux, nous suivons scrupuleusement la procédure de suivi des animaux xéno greffés en accord avec les points limites indiqués dans ce document (4.2) et les recommandations de la cellule bien être animal de l'animalerie Biosit de Rennes. De plus, nous utilisons des procédures d'anesthésie pour les expériences le nécessitant. Par ailleurs, nous réduisons au minimum les mesures en bioluminescence pour favoriser les mesures au pied à coulisse.

Le nombre estimé d'animaux est de 300 souris.

En conclusion, nos expériences menées dans les organismes modèles ont pour objectif de récapituler in vivo les processus moléculaires impliqués dans le mélanome et de tester de nouveaux candidats thérapeutiques en accord avec la règle des 3R.

3829. Les Camélidés possèdent naturellement, en plus des anticorps conventionnels présents chez tous les mammifères, des anticorps particuliers constitués uniquement de deux chaînes polypeptidiques au lieu de quatre. Ces anticorps, plus petits et plus solubles que des anticorps classiques, permettent de nombreuses applications en recherche. L'objectif du projet présenté ici est de produire des fragments d'anticorps de lama (baptisé « nanobodies » ou « VHH ») dirigés spécifiquement contre des protéines d'intérêts. Ces protéines sont étudiées dans différents projets de recherche, dont un programme européen dédié au cancer et au diabète. Les nanobodies produits dans notre laboratoire serviront d'« outils moléculaires » pour différentes applications.

La résolution de structure de protéines par cristallographie est une technologie couramment employée en recherche pour la découverte de médicaments. Elle permet de visualiser les interactions entre des médicaments et leur cible, mais également de comprendre comment une protéine fonctionne et est régulée par des molécules naturelles ou artificielles interagissant avec elle. Cependant, il est très difficile d'obtenir des cristaux pour certaines protéines. De part leurs propriétés particulières, les VHH (partie variable des anticorps de camélidé) permettent de faciliter la cristallisation de ces protéines dites « difficiles », lorsque toutes les autres techniques de cristallisation classiques échouent. D'autre part, les anticorps utilisés à des fins thérapeutiques connaissent depuis quelques années un développement exponentiel. En effet, les anticorps peuvent moduler l'activité et/ou supprimer la fonction de leur protéine cible. De part leurs propriétés structurales particulières, les nanobodies présentent un avantage significatif comparés aux anticorps classiques car ils peuvent cibler des zones cryptiques de la protéine d'intérêt, comme les sites catalytiques enzymatiques, contrairement aux anticorps classiques qui ne peuvent pas atteindre ces zones enfouies. Le but dans ce cas est de trouver parmi les anticorps spécifiques générés, les VHH qui auront un effet inhibiteur, neutralisant ou activateur de la protéine étudiée, comme le font les médicaments classiques développés à partir de molécules chimiques. Le principal avantage des anticorps, par rapport aux molécules chimiques, est que le mode d'action des anticorps implique un plus grand nombre d'interactions moléculaires qu'une petite molécule. Cette caractéristique augmente significativement les chances d'une meilleure spécificité de l'anticorps pour sa cible comparativement au médicament chimique. Plus de spécificité étant généralement synonyme de moins d'effets secondaires, l'anticorps thérapeutique aura plus de chances d'être mieux toléré qu'un médicament chimique classique. Les nanobodies présentent ainsi un double avantage : cibler des zones stratégiques pour la fonction d'une protéine, accessibles aux molécules chimiques mais inaccessibles aux anticorps classiques, tout en conservant la haute spécificité des anticorps classiques par rapport aux molécules chimiques.

Pour atteindre les objectifs de ce projet, nous immuniserons des lamas, (famille des Camélidés), une vingtaine d'individus, avec nos protéines d'intérêt. Un seul animal ne sera utilisé par campagne d'immunisation et chaque animal ne participera qu'à une seule. Nous disposons actuellement d'une dizaine de lamas. Les conséquences pour les animaux sont minimes car en dehors des immunisations et d'une prise de sang, les animaux sont totalement libres d'évoluer dans leur milieu habituel et conservent leur régime alimentaire classique. Ils sont juste placés dans une zone « expérimentale » pour être séparés des autres animaux pour minimiser le risque de transmission de maladie car les immunisations sollicitent leur système immunitaire. A la fin de la campagne, ils retrouvent le groupe des animaux après obtention du consentement de la DDPP13.

3830. L'intestin est une des frontières les plus importantes et les plus complexes entre l'organisme et le milieu extérieur. La prise de nourriture peut s'accompagner de l'ingestion de pathogènes contaminants ou de substances xénobiotiques. Nous avons montré chez la drosophile que :

- i) une toxine bactérienne formant des pores, l'hémolysine de *Serratia marcescens*, attaque les entérocytes et entraîne une extrusion importante de leur cytoplasme, sans toutefois tuer les entérocytes; l'épithélium intestinal est alors considérablement aminci;
 - ii) les entérocytes sont capables de se régénérer dans les six-neuf heures suivantes et l'épithélium intestinal recouvre sa forme et son épaisseur originelles;
 - iii) cette régénération nécessite une cycline conservée au cours de l'évolution et dont la fonction était jusqu'à présent inconnue, la cycline J.
- Ce projet a pour but de déterminer dans quelle mesure ces résultats sont transposables dans un modèle mammifère, la souris en l'occurrence qui possède un épithélium plus complexe (autres types cellulaires en présence) et qui est soumis à un microenvironnement (présence de cellules stromales et immunitaires) plus proche de celui de l'homme. De ce fait une approche in vivo est nécessaire pour permettre de reproduire ces interactions cellulaires qui n'existent pas in vitro. De plus un modèle murin de transgénèse - invalidation du gène de la cycline J - nous permettra de tester l'implication directe de cette molécule en réponse à l'hémolysine.

Remplacer : Des expériences ont été réalisées préalablement chez la Drosophile afin de définir les conditions optimales.

Réduire : Nous envisageons l'utilisation de 6 souris par point d'expérience, nombre suffisant afin d'obtenir des résultats significatifs du point de vue statistique.

Raffiner : Le modèle murin est choisi dans le but de reproduire le plus fidèlement possible les infections étudiées chez la Drosophile. Les conditions de travail seront raffinées afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associées aux procédures expérimentales. L'injection de la toxine bactérienne sera réalisée de façon contrôlée et de façon à ne pas être dommageable à l'animal (doses minimales, temps de contact relativement courts).

Un nombre total d'animaux (souris contrôles et invalidées) d'expérimentation de 132 animaux est envisagé.

3831. L'autophagie (AP) est un processus physiologique qui régule l'homéostasie cellulaire. L'AP est conservée au cours de l'évolution et caractérisée par une importante accumulation de vacuoles autophagiques à double membrane (autophagosomes) dans le cytoplasme des cellules. L'AP est aussi un mécanisme d'adaptation cellulaire en condition de stress et son absence est souvent observée dans des maladies neuro-dégénératives et cancers. Il a été récemment démontré que l'induction de l'AP induit une libération rapide de ACBP (Acyl-CoA binding protein). ACBP est une petite protéine qui fonctionne à la fois au niveau intracellulaire, dans le cadre du métabolisme des acides gras, et de manière extracellulaire comme inhibiteur du récepteur de type A de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Les récepteurs GABA de type A (GABAA) sont des canaux ioniques qui sont activés par fixation du GABA. Ces récepteurs ionotropes ont une grande importance en physiologie des mammifères, étant le GABA le principal neurotransmetteur inhibiteur. Les canaux GABAA sont la cible de plusieurs molécules pharmacologiques, inclus les benzodiazépines, les barbituriques, les alcools, les anesthésiques généraux volatils. Jusqu'à présent, la relation fonctionnelle entre l'AP et la modulation du récepteur GABAA n'a pas été étudiée. Le but de ce projet consiste à évaluer cette régulation. A cette fin, nous allons mettre au point des modèles où l'on inhibe les récepteurs GABAA in vivo. L'impact de l'inhibition de ces canaux sur la réponse autophagique sera également étudié. Cette étude peut être conduite seulement in vivo car la modulation du récepteur du GABA implique et/ou affecte des voies métaboliques et/ou des régulations physiopathologiques qui ne peuvent pas être évalués in vitro. Nous avons choisi la souris comme modèle pour la facilité d'hébergement, d'élevage (rapidité de reproduction et nombre de souris par portée) et l'accès au développement d'animaux transgéniques. Pour réaliser ce projet nous avons conçu 3 procédures, dont la 3^e sera mise en œuvre seulement si les 2 précédentes ont validées l'hypothèse de départ. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales seront négatives par rapport à l'hypothèse de travail. Nous souhaiterons effectuer cette étude en utilisant des souris: immunocompétentes sauvages (n. 720); transgéniques déficientes en autophagie (n. 1440); transgéniques qui présentent un marqueur d'autophagie fluorescente en verte (n. 480); transgéniques qui ne présentent pas la protéine ACBP (n. 432); transgéniques qui présentent une mutation du récepteur du GABA (n. 1152). Pour la réalisation de cette étude, nous chercherons de regrouper les expérimentations dans le but de garder un nombre minimum d'animaux pour les groupes contrôles. Néanmoins nous pouvons utiliser moins de souris si nous trouvons une significativité avec moins de souris. La stabulation des animaux sera conventionnelle et ils recevront un régime alimentaire normal. Un milieu enrichi adapté est prévu pour l'hébergement des souris pour minimiser l'angoisse (présence, dans les cages, des nids végétaux et/ou tunnels en cartons). Tous ces modèles de souris sont importants pour cette étude qui permettra une meilleure compréhension des mécanismes et des acteurs physiologiques qui sont responsables de la modulation du récepteur GABAA et permettra d'améliorer les traitements des maladies neuro-dégénératives et neuro-psychiatriques. Ce projet permettra à long terme d'élaborer une combinaison de traitements pour le moment inédites afin d'optimiser le taux de réussite de ces traitements.

3832. Ce projet s'intègre dans le cadre général de l'étude des mécanismes cérébraux du contrôle de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique. Le but du projet est d'améliorer les connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans le phénomène d'anorexie-cachexie. En effet, l'anorexie qui accompagne de nombreuses maladies (infections et cancers) est un problème majeur dans la mesure où elle est souvent à l'origine d'un syndrome de "cachexie-anorexie" qui peut être léthal. A ce titre, elle fait l'objet de nombreuses recherches, et il est établi que plusieurs cytokines/chimiokines participent à sa physiopathologie chez l'homme et chez l'animal. Les mécanismes qui conduisent ces messagers du système immunitaire à modifier l'équilibre énergétique sont encore mal connus. En particulier, l'effet des cytokines/chimiokines sur l'expression des peptides de l'hypothalamus impliqués dans la régulation du comportement alimentaire, n'a pas encore été recherché.

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés au rôle des cytokines et chimiokines sur la régulation des systèmes neuronaux, contrôlant l'anorexie liée à l'inflammation chez la souris.

Notre projet s'attachant à étudier le rôle du système nerveux central dans la régulation du poids corporel, il est nécessaire de réaliser notre étude chez l'animal car il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de prendre en compte la complexité de ces interactions. Nous déterminerons l'importance des réponses inflammatoires sur la régulation du poids corporel et notamment la perte de poids. Nous utiliserons des procédures expérimentales à niveau de douleur très modéré sur des souris sauvages et des souris invalidées pour la chimiokine CCL2. Nous induirons chez la souris adulte une inflammation générale par des injections intracérébroventriculaires (icv) de Lipopolysaccharide (LPS) et nous pratiquerons des injections icv de molécules impliquées dans le contrôle de l'inflammation chez des souris sauvages et des souris invalidées pour la chimiokine CCL2.

Ce projet répond étroitement à la règle des 3R (Remplacement/Réduction/Raffinement). D'une part, le nombre de souris sera réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables (basé sur nos expériences et un calcul statistique pour trouver un effet significatif). D'autre part, les animaux seront hébergés dans des cages sur portoirs, avec nourriture et boisson ad libitum. Avant expérimentation, les souris seront acclimatées pendant une semaine durant laquelle les expérimentateurs les habitueront à être manipulées. A partir du début de l'expérience, les animaux seront pesés au début de l'expérience avant injection icv et à chaque point déterminé post-injection afin de suivre l'évolution de leur poids. Les expérimentateurs évalueront aussi l'état général des souris après l'injection et ce jusqu'au sacrifice, afin de déterminer la présence ou non de signes de stress ou de souffrance (attitude soumise, dos voûté, respiration difficile, extrémités pâles, démarche anormale, diarrhée, vocalises,...). En cas de stress ou de souffrance, les animaux seront soignés selon la sévérité de la douleur observée et en cas où les signes de souffrance persisteraient, les animaux souffrants seront euthanasiés.

Notre projet nécessitera au maximum l'utilisation de 692 animaux. L'ensemble des résultats obtenus lors de ces études pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques directement liées au traitement de l'inflammation et permettra de proposer des approches pharmacologiques innovantes pour le traitement de l'anorexie.

3833. Le principal objectif du projet est de mettre au point une nouvelle technique qui permette de faire varier de manière sélective, in vivo et exclusivement dans le cœur, un gène d'intérêt. L'approche sera développée pour évaluer le rôle des récepteurs bêta-adrénergiques (β -AR) dans la phase précoce de l'infarctus du myocarde. En effet les récepteurs β -AR sont responsables en grande partie du contrôle de la contraction cardiaque, et l'impact de la stimulation de ces β -AR reste mal compris. Une meilleure compréhension de la fonction de chaque sous-type de récepteurs β -AR dans la phase précoce de l'infarctus pourrait être déterminante dans le développement de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour cela, un des projets de l'équipe consiste à faire varier chez le rat un à un chaque sous-type de récepteurs β -AR cardiaques (surexpression ou sous-expression) et d'en évaluer les conséquences sur la fonction cardiaque in vivo (échographie, boucles pression-

volume) et ex vivo (cœur isolé, perfusé en mode travaillant, muscle papillaire, cardiomyocytes isolés) et sur l'expression et la fonction des autres sous-types de récepteurs β -AR.

Les variations d'expression génique seront réalisées in vivo chez le rat par une injection directe dans le cœur, 1) de vecteur adénoviral porteur du gène humain codant pour les β -AR, et/ou 2) de petits ARN interférents (siRNA) pour invalider les gènes β -AR rat. Des expériences préliminaires de surexpression/sousexpression effectuées chez le rat, ont permis de valider notre technique et nous encourageant fortement à l'appliquer à une pathologie fréquente dans les pays développés.

Nous prévoyons dans cette étude une première phase de mise au point qui permettra de déterminer la meilleure dose et le meilleur design du siRNA à employer. Afin de réduire un maximum le nombre de rats utilisés, les différentes procédures expérimentales (cf. ci-après) de cette première étape seront réalisées sur des effectifs réduits afin de tester l'efficacité de plusieurs siRNA. Dans un second temps, lorsque les conditions d'utilisation optimales des siRNA auront été déterminées, les procédures seront réalisées sur un plus grand nombre d'animaux avec seulement les conditions sélectionnées dans la première étape. Dans notre étude, plusieurs investigations sont également réalisables sur les mêmes animaux, ce qui permettra de limiter la multiplication de groupes expérimentaux. Les groupes seront alors constitués du nombre nécessaire d'animaux afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables ($n=8-15$ suivant les manipulations), le but étant de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés mais de garder une puissance statistique suffisante pour pouvoir conclure sur nos résultats. Au total, le projet devrait intégrer environ 450 rats, répartis comme suit :

Nous nous attacherons à respecter la règle des 3 R (remplacer, raffiner, réduire). cependant, la complexité des mécanismes mis en œuvre au cours de l'infarctus du myocarde ne nous permet pas d'utiliser de modèle in vitro. Néanmoins, pour réduire le nombre d'animaux, les groupes seront constitués du nombre nécessaire d'individus afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Enfin, afin d'optimiser au maximum notre étude, nous apporterons un soin particulier à prévenir la souffrance et le stress des animaux intégrés au protocole, en mettant en place une surveillance des animaux pendant toute la durée du protocole, des mesures préventives et correctives pour lutter contre la douleur (administration de traitements analgésiques-dérivés morphiniques et anti-inflammatoires non stéroïdiens- suivant des modes d'administration validé) et l'inconfort, et surtout des points limites au-delà desquels les animaux seront retirés de l'étude.

3834. Mesures sur poules pondeuses en production de l'énergie métabolisable et/ou de la digestibilité de tout autre nutriment des matières premières et additifs destinées à l'alimentation des animaux de rentes en élevages de production.

En plus des analyses chimiques faites sur les matières premières, il est nécessaire de mesurer in vivo les coefficients de digestibilité de certains nutriments (acides aminés et énergie en particulier), les méthodes in vitro étant insuffisamment précises et discriminantes.

En effet, les matières premières utilisées dans les rations des animaux d'élevage ne sont jamais valorisées à 100% dans le tractus digestif ; une fraction indigestible vient diminuer la valeur nutritionnelle apparente et la mesure de la proportion de chaque nutriment réellement métabolisée permet de mesurer la digestibilité vraie.

Les coefficients de digestibilité sont spécifiques aux différents nutriments dans chaque matière première et pour chaque espèce animale. Cette donnée est essentielle pour la caractérisation des produits utilisés pour la formulation des aliments afin d'optimiser leur utilisation d'un point de vue technique et sur le plan économique.

Au-delà des coefficients de digestibilité, certains additifs nutritionnels (eg acides aminés) ou zootechniques (eg enzymes) ont pour vocation d'améliorer l'efficacité des aliments (épargne d'énergie et amélioration des équilibres dans la ration). Cette amélioration doit être mesurée in vivo, en complément de tests préalables in vitro, sur les animaux auxquels ils sont destinés.

Pour ce faire, des animaux sont utilisés dans des procédures spécifiques adaptées au type d'animal et aux objectifs de mesures à réaliser. Des échantillons de quelques kilos suffisent pour être utilisés en l'état ou être incorporés dans des aliments. Les additifs alimentaires sont utilisés en complément des rations spécifiques des animaux.

La période d'essai proprement dite dure entre 3j et 2 semaines en fonction des procédures mises en oeuvre.

Le principe général de la digestibilité est de comparer les données analytiques des produits avant ingestion et après digestion par les animaux (mesure analytique des fèces).

Pour être statistiquement significatives, les mesures sont réalisées sur des effectifs d'animaux compatibles avec la sensibilité des procédures mises en œuvre qui tient compte de la nature des produits testés et des réponses attendues des animaux utilisés (informations issues d'expériences antérieures). Des tests de puissance expérimentale sont réalisés pour déterminer le nombre optimal d'animaux à mettre en essai.

Chaque procédure utilise 120 animaux qui sont logés dans des conditions conformes au respect de leur bien-être et ne doivent subir aucun dommage durant la phase expérimentale ; les animaux peuvent être utilisés pour plusieurs procédures de même nature.

1200 poules sont nécessaires au maximum pour réaliser le projet.

Effectuées par des personnels parfaitement formés selon les bonnes pratiques précisément décrites dans des procédures, les manipulations des animaux sont sans conséquence sur le devenir des animaux (raffinement).

Des techniques de mesures de digestibilité in vitro de la matière sèche des matières premières et aliments ont été développées en parallèle afin de ne réserver les mesures in vivo qu'aux produits sélectionnés parmi plusieurs (screening) afin de limiter le nombre d'essais (réduction).

3835. La leptospirose est considérée comme la maladie zoonotique la plus répandue dans le monde et touche principalement les îles tropicales, où l'on enregistre les taux d'incidence chez l'homme les plus élevés. A la Réunion par exemple, l'incidence annuelle est de 6,4 /100000 habitants, et le taux de létalité d'environ 4%. Les rongeurs et chauves-souris sont des hôtes réservoirs importants et excrètent les bactéries *Leptospira* dans leurs urines. L'infection chez l'homme résulte de ce fait soit d'un contact direct avec des animaux infectés, soit via l'environnement contaminé. Sur l'île de La Réunion, bien que les chauves-souris du genre *Mormopterus* soient fortement infectées par des leptospires proches de la souche pathogène *Letospira borgpetersenii*, on ne sait pas si elles jouent un rôle dans l'épidémiologie humaine de la leptospirose.

L'abondance et le caractère synanthropique des chauves-souris *Mormopterus* sur l'île pourrait représenter un risque important de transmission de leptospires pathogènes de la faune sauvage vers l'homme. Pour pouvoir prédire les risques de transmission de leptospirose, il est crucial de mieux comprendre les dynamiques d'infection chez les populations de chauves-souris.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer les dynamiques d'infection et la maintenance des leptospires chez *Mormopterus jfrancoismoutoui* sur l'île de la Réunion. Des sessions de capture seront réalisées dans plusieurs colonies de l'île pour évaluer l'évolution temporelle de l'infection par les leptospires et le développement de l'immunité. La manipulation de chaque individu se fera sur le site de capture dans un temps réduit. Les prélèvements réalisés sont rapides et adaptés à la petite taille de cette espèce. Un maximum de 50 individus sera

échantillonné à chaque session de capture pour pouvoir estimer des taux d'infection inférieurs à 5%. 40 sessions de captures seront réalisées, ce qui représente un total de 2000 individus maximum durant toute la durée du projet.

3836. Le cancer est à l'heure actuelle un enjeu de santé publique mondiale. D'après les études du site GLOBOCAN 2012 (<http://www.globocan.iarc.com>), l'incidence des nouveaux cas de cancers dans le monde est estimée à 14,1 millions de personnes et le taux de mortalité associé est porté à 8,1 millions de personnes. Les pays développés sont particulièrement touchés par ce fléau, ils comptabilisent environ 64 % des décès liés au cancer dans le monde. Parmi les différentes stratégies actuellement en développement pour lutter contre ce fléau, la vaccination anti-tumorale apparaît comme prometteuse. Cette dernière, permet de stimuler ou de renforcer l'action naturelle du système immunitaire de l'organisme afin de lutter contre le cancer. Dans ce contexte, ce projet de pharmacologie s'inscrit dans une phase de développement préclinique de différents vaccins destinés à lutter contre les différentes formes de cancer. Il aura pour but de valider le mécanisme d'action et l'activité anti-tumorale de plusieurs candidats vaccins. Néanmoins, il n'est actuellement pas envisageable d'administrer un nouveau vaccin aux patients (cancéreux) sans qu'il ait été préalablement testé et évalué (efficacité, toxicité,...) chez l'animal. Ainsi, l'évaluation de l'efficacité anti-tumorale de nos vaccins, sera réalisée dans des modèles expérimentaux tels que la souris. En effet, au cours de ce projet qui s'échelonne sur 5 ans, il est prévu d'utiliser entre 3360 et 6300 souris. Il est important de noter que l'expérimentation animale sera utilisée de manière rationnelle et selon les réglementations en vigueur qui garantissent un traitement éthique de l'animal de laboratoire. De plus, les molécules utilisées au cours de ce projet ayant déjà montré leur innocuité chez la souris et l'Homme, aucun dommage majeur / effet perversif n'est escompté chez la souris. D'une part ces études, nous permettrons d'obtenir l'accord de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) pour évaluer l'efficacité de nos candidats vaccins dans des phases cliniques sur des patients atteints de cancers. D'autre part, elles seront constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché « AMM ». En effet, ces futurs vaccins devront répondre à des normes internationales de qualité scientifique qui seront étroitement évaluées par les autorités de santé pour la délivrance de l'AMM. Conscient du nombre élevé d'animaux prévus pour ce projet, nous allons tous les ans, réévaluer et réduire autant que possible le nombre d'animaux à utiliser en fonction des résultats. En effet, un screening in vitro puis in vivo chez l'animal nous permettra de réduire le nombre de candidats vaccins. Le but étant au fur et à mesure d'éliminer les vaccins les moins pertinents afin d'aller au bout du projet avec un nombre restreints de candidats vaccins. Cette réévaluation annuelle nous permettra ainsi de réduire le nombre de souris prévu initialement.

3837. Notre projet de recherche vise à mieux comprendre les mécanismes pathophysiologiques responsables du dérèglement de l'excitabilité neuronale observé dans les crises d'épilepsies. Les canaux ioniques sont les acteurs majeurs de cette excitabilité neuronale et leur étude est fondamentale pour la compréhension des mécanismes impliqués dans ces pathologies. Notre projet de recherche concerne plus particulièrement les canaux ioniques sélectifs au sodium et dépendants du potentiel. Ces derniers sont responsables de la genèse et de la propagation du potentiel d'action. De nombreuses mutations observées sur plusieurs types de canaux ioniques sont responsables des différentes formes génétiques d'épilepsie souvent graves, pharmaco-résistants et présentant des déficits cognitifs. L'impact fonctionnel de plusieurs mutations sur l'activité des canaux ioniques a jusqu'à présent été étudié surtout dans des cellules non neuronales, ce qui a abouti à des résultats controversés car les conditions expérimentales ne reproduisent pas les conditions pathophysiologiques. Afin de pallier à ce problème, notre groupe s'intéresse à l'effet de ces mutations, dans plusieurs modèles et avec des approches expérimentales variées, reproduisant les conditions physiopathologiques et préservant la diversité et les propriétés des réseaux neuronaux. Afin de réduire au maximum l'utilisation des animaux, nous étudions les courants ioniques à partir de cultures neuronales in vitro exprimant les canaux mutés pour comprendre leurs changements de fonctionnalité. Afin de comprendre comment ces mutations modifient la coordination des neurones entre eux, nous réalisons également des études intégrées dans des réseaux neuronaux sur des tranches de cerveau ex vivo, ce qui réduit le nombre d'animaux utilisés (plusieurs tranches utilisées pour chaque animal). Cependant, les études des phénotypes générés par les mutations et le développement des stratégies thérapeutiques nécessitent des expérimentations in vivo. Nous proposons dans ce projet d'utiliser différents modèles d'épilepsie avec des souris génétiquement modifiées. L'induction d'une crise d'épilepsie peut être obtenue par augmentation de la température sur nos modèles de souris génétiquement modifiées. L'objectif de notre projet est donc la compréhension du rôle de notre canal ionique d'intérêt dans l'excitabilité neuronale et la genèse des crises d'épilepsie, l'importance de l'activité épileptique sur l'aggravation du phénotype et la génération des déficits cognitifs et, enfin, le développement d'approches thérapeutiques. Les différentes approches pour répondre à cette question sont les suivantes:

- 1) Etudier les propriétés électriques des réseaux de neurones de nos modèles de souris génétiquement modifiées avec des enregistrements d'électrocorticogramme sur animaux vigiles, appareillés au préalable par la pose d'électrodes corticales sous anesthésie générale.
- 2) Etudier les conséquences fonctionnelles des altérations génétiques et de l'activité épileptique sur les processus de mémorisation et de plasticité neuronale en utilisant des tests comportementaux peu invasifs.
- 3) Evaluer de nouveaux traitements pharmacologiques et utiliser de nouvelles approches thérapeutiques telles que la transduction virale de micro-ARN permettant la réduction de l'activité de gènes cibles.

A la fin des différentes procédures les animaux seront sacrifiés dès que possible afin de faire des études d'histologie et de limiter les colonies. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum, en conservant un nombre suffisant pour obtenir des statistiques fiables (15 animaux prévus par groupe d'étude). Par conséquent, nous prévoyons l'utilisation d'un nombre maximal de 1005 souris sur une période de 5 ans. Ce projet est en accord avec le principe des 3R :

Remplacer l'expérimentation animale par d'autres techniques chaque fois que cela est possible. Comme mentionné plus haut, une partie du projet est réalisée en utilisant des lignées cellulaires pour exprimer les protéines d'intérêt, afin de remplacer l'expérimentation animale, mais pour étudier les propriétés dans un milieu neuronal, l'effet sur l'activité des réseaux neuronaux et l'effet sur les phénotypes il est nécessaire d'effectuer les expériences avec des animaux.

Réduire le nombre d'animaux utilisés au maximum La quantité d'animaux utilisée a été calculée en considérant 1/ le nombre d'expériences nécessaires planifiées 2/ la variabilité expérimentale des paramètres étudiés pour chaque type d'expérience, afin d'obtenir une puissance statistique suffisante (>80%). Cette variabilité expérimentale a été estimée d'après des expériences similaires préalablement effectués dans notre laboratoire ou d'après des études d'autres laboratoires publiées dans des revues internationales à comité de lecture. La puissance statistique sera régulièrement réévaluée afin de réduire les effectifs de souris utilisés autant que possible. L'utilisation de différentes souches de souris est due aux besoins expérimentaux spécifiques. La dimension des colonies de souris génétiquement modifiées sera maintenue au minimum.

Raffiner la façon dont les expériences sont menées pour minimiser toute souffrance. Nous utilisons des protocoles d'anesthésie et d'analgésie chaque fois que la procédure l'exige. Nous prenons soin de mettre tout en œuvre pour minimiser tout stress douleur ou inconfort aux animaux vigiles, à travers les conditions de d'hébergement et les manipulations. Durant les procédures menées sur animaux vigiles nous utilisons des grilles de score permettant d'évaluer les éventuelles souffrances, et de les limiter par l'application de points limites précoces et adaptés.

A terme, ces études vont améliorer notre connaissance des mécanismes impliqués dans l'épilepsie et devraient permettre la mise au point de traitements ciblés et efficaces des crises d'épilepsies qui font actuellement défaut.

3838. La prévalence de l'obésité s'est accrue de manière épidémique dans les pays développés. Compte tenu du lien étroit entre obésité et maladies métaboliques, cela pose un grave problème de santé publique. Résultant d'un déséquilibre entre calories ingérées et dépensées, l'excès de poids a souvent pour origine une perturbation du comportement alimentaire et/ou du métabolisme énergétique. Bien que les parts environnementale et génétique jouent un rôle indéniable dans ces perturbations, on sait maintenant que comportement alimentaire et métabolisme énergétique nous sont, en partie, dictées par notre héritage épigénétique. Ainsi l'alimentation d'un individu influencerait non seulement l'expression de ses propres gènes mais également celle des gènes de sa descendance.

Pourquoi dans un environnement similaire, des individus deviennent-ils obèses et développent des maladies métaboliques alors que d'autres restent sains ? Pour apporter des éléments de réponse à cette question, des souris mâles seront soumises à un régime riche en graisse. Nous savons que dans ces conditions, certaines souris développent une obésité et des signes de diabète à l'âge adulte alors que d'autres semblent résister à ce régime enrichi en graisse et ne deviennent ni obèse ni diabétique. Ainsi bien que ces deux groupes de souris possèdent le même génome, elles réagissent différemment à un régime enrichi en graisse. Afin de disséquer les mécanismes moléculaires de ce processus, il nous faut dans un premier temps analyser plus finement le phénotype métabolique de ces souris. Une fois ces phénotypes définies, nous pourrions envisager de cibler un tissu altéré (ie : pancréas, tissus adipeux...) pour étudier in vitro les mécanismes moléculaires altérés ce qui nous permettra à terme de limiter le nombre de souris. Afin d'analyser le phénotype métabolique de souris soumises à un régime riche en graisse, les expériences suivantes seront réalisées :

- 1) Nourrir des souris avec un régime riche en graisse
- 2) Test de Résistance à l'insuline (ITT) et de tolérance au glucose (GTT)
- 3) Prélever l'urine des souris
- 4) Un prélèvement sanguin

Notre travail porte sur la transmission paternelle de caractères nouvellement acquis sur un mammifère. Etant donné que les mécanismes moléculaires de ce type d'hérédité ne peuvent être analysés in vitro, nous utilisons parallèlement à notre modèle murin (Projet BIO-ADAPT) un modèle non-vertébré, *C. elegans*. Ce modèle nous permettra d'étudier certains aspects des mécanismes moléculaires de cette hérédité (Remplacement). Cependant, ce modèle a des limites. Il n'est, notamment, pas possible d'analyser les effets métaboliques d'une alimentation riche en graisse. Afin de calculer la taille de l'échantillon nécessaire, nous avons réalisé un calcul de puissance en utilisant comme paramètre une puissance de 0.9 (risque de ne pas rejeter l'hypothèse nulle H_0 alors qu'elle est fautive est de 0.1), pour un alpha de 0,05 (risque de rejeter l'hypothèse alors que l'hypothèse nulle H_0 est vraie). Ce test nous a permis de minimiser le nombre d'échantillons et donc d'animaux nécessaires pour valider ou non notre hypothèse de départ (Réduction). Afin de réduire la contrainte imposée à chaque animal, les différents tests seront réalisés en respectant un intervalle d'au moins une semaine entre chaque test (Raffinement). Nous prévoyons utiliser au plus 390 souris pour l'ensemble de ces travaux.

3839. Le projet présenté s'inscrit dans le cadre du développement d'un complément alimentaire hypoglycémiant innovant à partir d'un extrait enrichi en peptides bioactifs, associé à 2 extraits végétaux standardisés en polyphénols. Les peptides identifiés, largement présents dans les protéines de coproduits marins, ont en effet montré une inhibition forte et novatrice d'une enzyme cible dans la prévention et le traitement du diabète de type 2. L'adjonction des extraits standardisés en polyphénols permettra d'obtenir un complément alimentaire ciblant différentes cibles stratégiques dans la prévention et le traitement du diabète de type 2.

Ce projet vise donc à objectiver les effets individuels des molécules identifiées (peptides et polyphénols) afin de développer de manière optimale les différents vecteurs (hydrolysats de protéines pour les peptides et extraits végétaux) et in fine, leur combinaison.

La combinaison d'extraits de végétaux sera ainsi incorporée dans la nourriture des animaux sur une durée de 6 semaines. Le projet inclut 25 groupes de 20 souris diabétiques.

Les procédures réalisées sur les animaux (pesée, composition corporelle, injection d'insuline, mesure de la glycémie à jeun) sont pour la plupart non-invasives et réalisées sans anesthésie car elles n'engendrent qu'un état de stress minimal.

Le modèle de souris diabétique est particulièrement bien adapté à l'étude des syndromes du diabète, l'âge choisi correspond au début du développement du syndrome métabolique chez ce modèle. Le recours à un modèle in vitro n'est pas souhaitable car les modèles cellulaires de mimétisme du diabète de type 2 sont très incomplets et peu représentatifs du fonctionnement in vivo. Nous avons choisi de le compléter avec un modèle de souris saines nourries avec un régime riche en graisse afin de vérifier l'efficacité de la combinaison sur un modèle non-mutant.

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 20 animaux par groupe est ainsi nécessaire pour mettre en évidence un résultat statistiquement significatif.

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. Le projet inclut ainsi 4 étapes au cours desquelles 25 groupes de 20 souris diabétiques (soit un nombre total de 500 souris db/db) seront utilisées pour les travaux de recherche.

3840. Nous étudions la contribution des enzymes régulant la structure de la chromatine à la progression tumorale. En effet, de nombreuses publications ont maintenant montré que l'épigénétique a un rôle important dans la progression tumorale. Cet axe de recherche est l'objet d'une attention particulière pour le développement thérapeutique.

Nous développons une nouvelle méthode pour évaluer l'intérêt thérapeutique d'inhiber des modificateurs de la chromatine. Le but étant de pouvoir appliquer cette méthode à des Xénogreffes dérivées de biopsies.

Nous avons conçu notre projet en limitant au maximum le recours aux modèles murins, le nombre prévu de souris est de 470 animaux.

Ainsi, les lignées cellulaires sont d'abord analysées avant de passer aux modèles murins dans un second temps sur un nombre beaucoup plus restreint d'échantillons. Toutefois, la culture cellulaire ne peut pas remplacer la complexité de l'environnement tumorale in vivo nous

obligeant à valider nos résultats dans des modèles murins. Nous allons mettre au point une nouvelle approche basée sur les techniques de modification du génome qui devrait nous permettre d'évaluer l'importance de plusieurs gènes dans la progression tumorale tout en utilisant un nombre très limité d'animaux. Les interventions prévues sur les souris vivantes sont peu invasives (transplantation cellulaire après chirurgie légère).

Toutes les précautions sont prises pour réduire au minimum la souffrance et le stress des souris (anesthésie pour les expériences de transplantation, soins opératoires et post-opératoires, surveillance continue des souris développant des tumeurs).

3841. L'arthrose est une maladie dégénérative des articulations. Elle se caractérise par une disparition du cartilage et une modification de l'os sur lequel il repose. On sait actuellement que les communications entre le cartilage et l'os jouent un rôle crucial dans le maintien de l'articulation dans un état sain. L'interface entre le cartilage et l'os se modifie au cours de l'arthrose. Notre équipe a pu identifier la protéine 14-3-3ε dans la communication os/cartilage au cours de l'arthrose. Son récepteur à la surface des chondrocytes semble être CD13/APN. Nous pensons que la protéine 14-3-3ε, médiateur catabolique libéré par l'os, viendrait se fixer sur CD13/APN au niveau des chondrocytes du cartilage et jouerait un rôle important dans la progression de l'arthrose. Nous voulons déterminer si l'absence de CD13 empêcherait l'interaction avec 14-3-3ε à l'interface entre le cartilage et l'os et in fine aurait un rôle protecteur de l'arthrose. En créant une arthrose chez les souris CD13^{-/-} par déstabilisation chirurgicale du ménisque au genou, nous déterminerons si les souris CD13^{-/-} développent une arthrose moins sévère 4 et 8 semaines plus tard par rapport aux souris contrôles. Parallèlement, nous injecterons au niveau intra-articulaire de la 14-3-3r pour voir si les souris développeront une arthrose plus sévère.

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 228 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de projet. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo.

3842. Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme, de telle manière que la survie de ce dernier est menacée. Malgré des recherches complexes, difficiles qui permettent de mieux comprendre les mécanismes de la maladie, le cancer reste une des causes de mortalité importante dans le monde. Le cancer est un enjeu thérapeutique de taille pour l'industrie pharmaceutique. L'objectif de ce projet est d'étudier le potentiel thérapeutique de nouveaux composés sur les paramètres biologiques liés aux altérations métaboliques issues de pathologies spontanées (génétiques) ou induites soit par l'alimentation, l'environnement.

Le rongeur est utilisé pour évaluer les propriétés thérapeutiques anticancéreuses de produits innovants de thérapie ciblée. Seuls les produits ayant démontré des propriétés thérapeutiques par des tests in vitro sur cellules sont sélectionnés pour être testés in vivo. Différents types de modèles sur souris sont utilisés en fonction des modèles expérimentaux nécessaires. Les souris immunodéprimées permettent le développement de tumeurs humaines à partir de lignées cellulaires et/ou de biopsies humaines de patients; Les souris immunocompétentes permettent la croissance de tumeurs murines et la création des modèles par injections de génotoxiques. En particulier, ils aboutissent à des modèles de cancers hépatiques ou colorectaux très proches de ceux établis chez les patients. Ils permettent également d'étudier l'influence du système immunitaire sur les tumeurs. Les modèles de souris et de rats transgéniques permettent de comprendre les aspects génétiques liés au développement des cancers. Les produits à propriétés anticancéreuses sont administrés sur animaux vigiles par les voies conventionnelles d'administration. Les études réalisées permettent d'évaluer la tolérance, l'efficacité anti-tumorale, les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des produits sur les modèles animaux.

Les études réalisées au sein du centre de recherche sont encadrées par des recommandations internes, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (hébergement, soins, manipulation, expérimentations), et ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal.

Un support en bio statistiques est apporté par des experts de la spécialité, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées et de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact l'animal et à l'observation des signes cliniques fondamentaux.

Ce projet couvre l'utilisation de 26000 animaux (25000 souris et 1000 rats) pour 5 ans.

3843. La maladie rénale est un problème de santé majeur dans les sociétés occidentales et les estimations récentes suggèrent qu'une personne sur dix souffrira de pathologie rénale à un moment dans sa vie.

L'étude du développement du rein et des malformations associées est importante, puisque cela nous permet de:

- 1) Identifier les gènes essentiels pour l'organogenèse et l'identification des gènes responsables des syndromes chez les patients. L'analyse d'échantillons de patients qui souffrent des mêmes anomalies conduira à l'identification de mutations et ainsi aidera les cliniciens lors des conseils génétiques.
- 2) Générer des modèles murins pour des mutations identifiées au préalable dans des pathologies humaines. Une analyse détaillée des souris génétiquement modifiées aidera à mieux comprendre l'étiologie des maladies, leur début et leur progression, cela pourrait même servir de modèle pour tester des approches thérapeutiques.
- 3) Etablir les connaissances fondamentales du développement et de la différenciation des reins in vitro est essentiel. Actuellement nous ne savons pas générer/cultiver in vitro des reins fonctionnels. Il s'agit d'un but essentiel à long terme car la culture d'organes artificiels nous permettrait de contourner la pénurie permanente de donneurs d'organes pour la transplantation.

Dans notre laboratoire nous étudions les gènes responsables de la formation du rein pendant l'embryogenèse en particulier le gène Wt1. La mutation de ce gène aboutit à la formation de la forme la plus répandue de tumeur rénale chez les enfants : La tumeur de Wilms.

Nous avons identifié un ensemble de gènes dont l'activité dépend de celle de Wt1. Parmi ces gènes cibles nous analyserons le gène Phf19. Au laboratoire, nous avons démontré que le Phf19 est exprimé uniquement dans les cellules souches rénales. Aucune étude sur la fonction de ce

gène dans les reins n'a été décrite dans la littérature scientifique. Ces expériences nous permettront de déterminer la fonction de Phf19, et d'extrapoler ces analyses à la formation du rein humain et aux processus d'apparition de pathologies.

Nous avons créé un modèle d'inactivation de Phf19 chez la souris pour lesquels nous sommes en phase d'analyse. Cependant, nous n'excluons pas une mortalité très précoce (dans les premiers jours après conception).

Par conséquent, pour continuer cette étude, nous allons créer un modèle « conditionnel » de souris chez lequel on inactivera le gène à un stade plus avancé pendant l'embryogenèse lorsque le rein commence à se former. La mutation de Phf19 pourrait probablement conduire à une malformation du rein. Aussi, nous allons focaliser nos analyses sur l'organogénèse pré-natale, à un stade auquel la fonction rénale reste accessoire. En l'absence d'anomalies morphologiques à la naissance, des animaux seront conservés après la naissance, seront examinés et évalués tous les jours selon notre grille de surveillance, et des points limites précoces seront appliqués. De cette façon, aucun animal qui pourrait avoir des reins défectueux ne sera durablement exposé aux conséquences d'un génotype délétère (Raffinement).

Nous regrouperons nos prélèvements et analyses par différentes techniques sur mêmes animaux porteurs de mutations, pour en diminuer le nombre total nécessaire (Réduction). Dès que nous atteindrons un nombre suffisant de prélèvements pour conclure à des résultats de façon significative, nous arrêterons nos expérimentations.

Pour compléter l'étude moléculaire de la voie de signalisation étudiée, nous remplacerons le modèle animal par des organoïdes rénaux que nous sommes sur le point de générer *in vitro* (Remplacement).

Pour réaliser ce projet nous utiliserons 403 animaux qui correspondent à 283 souris adultes+120 embryons.

3844. Les performances de reproduction des troupeaux bovins laitiers ont chuté régulièrement au cours des 20 dernières années. Les échecs de gestation ont majoritairement (~75%) lieu au cours des étapes précoces de la reproduction allant de l'ovulation à l'implantation de l'embryon dans l'utérus, en passant par la fécondation et les premières étapes de développement de l'embryon. Ces différentes étapes constituent chacune une étape clé de la reproduction et les mécanismes les régulant doivent être compris et maîtrisés afin d'améliorer les performances de reproduction en élevage. Face à ce contexte, de nombreux programmes de recherche ont déjà été menés sur la fertilité des vaches laitières et ont abouti à l'identification de protéines d'intérêt dont les effets doivent être précisés. Le projet qui fait l'objet de cette demande fait suite à différents programmes de recherche et travaux de thèse conduits sur la fertilité des vaches laitières et va permettre de valoriser les résultats issus de ces travaux. L'objectif est ainsi de développer des dosages et des applications pour ces molécules candidates, soit au niveau plasmatique (circulation générale), soit au niveau d'autres fluides facilement accessibles (liquide folliculaire et milieux de culture *in vitro*) ou encore au niveau de l'embryon lui-même. En effet, 4 protéines ont été particulièrement étudiées pour leur lien avec la fertilité de façon générale, et notamment leur lien avec la qualité des ovocytes et le développement embryonnaire précoce. Après avoir développé des méthodes de mesure de ces protéines, leur rôle sera étudié dans la fertilité chez les bovins, et leurs intérêts pour la maîtrise de la reproduction et l'optimisation de la fertilité seront explorés.

L'objet de la présente demande d'autorisation concerne l'étude du lien entre les niveaux d'expression des protéines et le potentiel de développement des ovocytes jusqu'au stade d'embryon après un processus de maturation, fécondation et culture *in vitro*. Pour cela, des collectes répétées d'ovocytes seront réalisées sur 8 génisses de race Holstein, puis les ovocytes seront mis en maturés et fécondés *in vitro*. La cinétique de développement *in vitro* des embryons sera suivie et évaluée à différents stades critiques de leur développement. De fait et compte-tenu de l'objectif même de l'étude, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude *in silico*. Le programme prévoit 4 collectes d'ovocytes sur chacune des 8 génisses afin de capter la variabilité inter et intra femelles mais également de répondre aux besoins en échantillons biologiques pour les analyses moléculaires et de cinétiques de développement tout en diminuant le nombre d'animaux utilisés. Une attention particulière sera portée aux animaux dès leur introduction dans les installations expérimentales et pendant toute la durée du programme (installations modernes permettant de répondre aux enjeux du bien-être animal, suivi continu de la rumination...). Ce projet devrait permettre d'aboutir à une validation des protéines candidates qui pourraient être utilisées soit pour optimiser la qualité des embryons produits *in vitro* pour renforcer l'efficacité de la conduite des schémas de sélection mais également pour développer des tests utilisables en élevage permettant une conduite d'élevage plus aisée et réactive.

3845. En France, 35000 personnes souffrent d'insuffisance rénale terminale, et leur nombre grossit de 150 par million d'habitants et par an. En l'absence de greffon, la fonction vitale de leur rein nécessite d'être suppléée au rythme de 3 séances hebdomadaires d'hémodialyse, quelques fois à vie. Cette technique de filtration du sang nécessite un abord vasculaire, de préférence une fistule artério-veineuse. Il s'agit de mettre en communication volontairement une veine et une artère, afin que la veine augmente de diamètre, et que le sang y passe à gros débit. Ainsi, le sang peut être récupéré, traité et réinjecté dans le malade par le biais de deux aiguilles placées dans cette même veine. Malheureusement, cette veine, soumise à des conditions de flux artériel, ne se développe pas comme souhaité dans 20% des patients, et même après un développement initial, elle sera le siège de rétrécissement (sténose) et d'occlusion (thrombose) chez 40 à 50% des patients. Cela représente une contrainte et un danger pour le malade, ainsi qu'un coût très important, car ces échecs impliquent des réinterventions successives. A l'instar des greffons veineux utilisés pour les pontages coronariens ou périphériques, la physiopathologie de ces échecs comprend le développement d'une hyperplasie intimale excessive, avec mise en jeu de systèmes physiologiques complexes et intriqués : immunité, coagulation, prolifération cellulaire.

Cependant, les conditions hémodynamiques ne sont pas les mêmes, et la maturation de la fistule artério-veineuse ne met pas forcément en jeu les mêmes mécanismes cellulaires. Jusqu'à présent, aucun médicament visant les processus cités n'a prouvé son efficacité dans la préservation de la fonction de l'abord artério-veineux.

Néanmoins, le rôle de l'hypoxie, du métabolisme cellulaire et de la mitochondrie n'a jamais été étudié dans ce système. Hors, des études préliminaires ont montré que 1) l'insuffisance rénale et la dialyse augmentaient le stress oxydatif et changeaient les caractéristiques des parois vasculaires, et 2) l'acte chirurgical créait un stress cellulaire avec une augmentation de HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor -1) et du VEGF-A au niveau de la paroi veineuse, et ce alors même que la PaO₂ sanguine augmentait dans la veine. Nous avons donc émis une succession d'hypothèses : 1) HIF serait stabilisé dans la veine par le biais des espèces réactives d'oxygène (ROS) d'origine mitochondriale, et ce, en situation de normoxie, 2) si la stabilisation de HIF permet une première phase de maturation de la veine, son activation prolongée serait délétère (hyperplasie intimale excessive), 3) en agissant sur le métabolisme cellulaire, la production de ROS et la stabilisation de HIF, nous pourrions stopper l'hyperplasie intimale des fistules artério-veineuses. La vérification de ces hypothèses se fait par l'utilisation d'un modèle animal possédant la fistule artério-veineuse qui permettra tout d'abord l'évaluation du métabolisme cellulaire et de l'expression de HIF au cours du temps dans la maturation des fistules artérioveineuses.

Puis, dans un deuxième temps, le modèle permettra d'identifier la nature et la dose de médicaments candidats qui agiront sur le métabolisme cellulaire et/ou sur HIF. Enfin, dans un troisième temps, il nous permettra de comprendre le mécanisme d'action du médicament identifié. Environ 1200 souris seront nécessaires pour ce projet.

3846. La polykystose rénale autosomique dominante (PKD) est la maladie héréditaire monogénique la plus fréquente chez l'homme avec une prévalence de 1/1000. La PKD est provoquée par la mutation des gènes PKD1 ou PKD2 codant pour les polycystines PC1 et PC2. Cette pathologie multisystémique est caractérisée par l'apparition lente et progressive de kystes qui surviennent tandis que la détection du flux par les cellules épithéliales ciliées des néphrons et principalement des tubules collecteurs est altérée. Les kystes créent des tensions mécaniques sur les néphrons sains, entraînant à leur tour leur altération (dédiérenciation des cellules épithéliales). Les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la PKD demeurent cependant mal compris. Le modèle de ligature de l'uretère est le seul qui permette de recréer ce stress mécanique dans la médullaire interne du rein par accumulation de l'urine.

Une analyse protéomique par spectrométrie de masse nous a permis d'identifier plusieurs protéines interagissant avec PC2. En particulier, nous avons identifié une protéine du réticulum endoplasmique de fonction encore inconnue (TMEM33). En utilisant une lignée cellulaire de tubules rénaux, nous avons montré que la surexpression de TMEM33 réduit la résistance des cellules à l'apoptose induite par la thapsigargine. A l'inverse, son invalidation par des siRNA les protège de la mort cellulaire.

Afin d'établir l'implication de TMEM33 dans la PKD, nous n'avons pas d'autre alternative que de créer une hydronéphrose chez des souris qui n'expriment pas TMEM33 et comparer l'apoptose et la fibrose induite par la ligature de l'uretère par rapport à celles observées chez des souris contrôles de la même portée. Nous estimons que 288 souris seront nécessaires afin de faire une étude cinétique et statistique. Une cinquantaine de souris servent à maintenir l'élevage.

Cette étude permettra d'appréhender les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la pathogenèse des kystes associés à la PKD. Le bénéfice escompté sera une meilleure connaissance de la maladie génétique rénale la plus fréquente chez l'homme et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

3847. La mitochondrie à travers la phosphorylation oxydative constitue le site principal de production d'énergie sous forme d'ATP en conditions aérobie dans le muscle. Cet organelle est très sensible aux modifications de l'environnement cellulaire en particulier celles observées en réponse à un exercice. Si les effets d'un entraînement en endurance de plusieurs semaines sur la fonction mitochondriale sont bien connus chez le mammifère, la façon dont les différents mécanismes impliqués se mettent en place dans le temps est plus rarement étudiée. Chez le poisson, ce type de données est pratiquement inexistant. Ce projet a donc pour objectif d'étudier chez le poisson les effets de différentes durées d'entraînement de type endurance sur la fonction mitochondriale dans le muscle squelettique et dans le cœur en mettant l'accent sur le rôle des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO dont des radicaux libres) dans ces adaptations ainsi que de leur persistance dans le temps.

En effet environ 2 à 5% de l'oxygène utilisé par la mitochondrie est converti par le biais d'une fuite d'électrons en ERO connues principalement pour leurs effets délétères. La production excessive d'ERO est dépendante entre autres de facteurs comme la pollution, le stress et l'exercice physique intense. Leur rôle (à concentration modérée) dans la signalisation cellulaire et la régulation du métabolisme énergétique est largement documenté dans le cadre de l'exercice physique.

De plus dans la littérature, il est souvent rapporté la difficulté de discuter les résultats avec d'autres études portant sur des animaux de sexe différent. Ainsi, il a été montré des différences d'activités des systèmes antioxydants et de dommages oxydatifs selon le sexe après entraînement, mais à notre connaissance l'impact du genre sur la fonction mitochondriale et les réponses radicalaires après entraînement restent peu étudiés. Il s'agira donc d'étudier également l'influence du sexe sur les liens entre performance physiologique et réponses radicalaires suite à des entraînements physiques de durées différentes.

Le modèle poisson nous servira pour ce projet. Les poissons en tant que modèle dans la recherche biomédicale s'impose de plus en plus comme des alternatives efficaces et moins coûteuses que les mammifères lorsqu'une étude sur l'homme reste impossible. Par ailleurs, il est de plus en plus rapporté une ubiquité des mécanismes cellulaires de l'adaptation à l'exercice. La diversité des espèces permet également l'utilisation de modèles présentant des caractéristiques physiologiques différentes voire des performances différentes. L'objectif secondaire sera aussi de mettre en avant l'intérêt du modèle poisson dans l'étude des effets bénéfiques d'un entraînement physique en lien avec les recommandations de l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS).

Ainsi 270 truites arc-en-ciel (140 femelles et 130 mâles) suivront un protocole d'entraînement à la nage d'intensité modérée de durées de 0 jours, 1-5 jours, 10-15 jours ou 20-30 jours.

Les réponses métaboliques seront abordées sur ces poissons selon deux approches :

- une première in vivo (animal vivant) pour étudier l'effet de l'entraînement sur la performance de nage: mesure de Vitesse Maximale Critique, la consommation d'oxygène
- une seconde in vitro (au niveau tissulaire) sur des fibres musculaires cardiaques et squelettiques pour étudier l'effet de l'entraînement à la fois sur le métabolisme énergétique mitochondrial (consommation d'oxygène, production d'ATP), et l'effet des ERO sur la fonction mitochondriale (sensibilité aux ERO). Notre choix s'est porté sur ces deux types musculaires : cardiaque et squelettique car il s'agit des tissus les plus sollicités lors de l'exercice physique.

Ce projet est construit en respectant la règle des 3 R :

Réduction : le nombre de poissons comprend 10 animaux par lot (1 lot = 1 sexe, 1 durée de nage, 1 condition (entraîné ou non) et 1 approche d'étude : in vivo ou tissulaire, nous ne pouvons réaliser les 2 approches sur les mêmes poissons car il existe des effets directs de l'approche in vivo sur les mesures in vitro). Ce nombre de 10 animaux par lot pour un total de 24 lots constitue un minimum pour effectuer l'étude statistique des résultats obtenus suite à la réalisation des procédures expérimentales contenues dans ce projet. Il faut compter également 30 truites qui nous serviront pour réaliser des essais (mise au point du matériel et du protocole). Remplacement : ce projet ne pourrait se faire sans utiliser d'animaux étant donné l'objectif secondaire de ce projet (cf plus haut). Le raffinement est respecté dans le cadre des conditions d'hébergement des animaux.

3848. Notre laboratoire s'intéresse aux circuits neuronaux qui sous-tendent la perception des odeurs. Nous utilisons une combinaison d'approches expérimentales chez la souris incluant, génétique moléculaire, imagerie in vivo, et analyse du comportement, pour comprendre la logique du codage de l'information sensorielle par les différents relais olfactifs du cerveau. La perception des odeurs repose d'une part sur la reconnaissance des divers composants odorifères en périphérie, et d'autre part sur des mécanismes généraux dans le cerveau qui permettent la discrimination des odeurs. Chez les souris, les odeurs sont reconnues par des récepteurs olfactifs exprimés à la surface des

neurones sensoriels de l'épithélium olfactif. Chaque odeur active un sous-ensemble de neurones sensoriels, et est représentée par un pattern d'activité glomérulaire spatialement invariant dans le bulbe olfactif, le premier centre de traitement de l'information olfactive. L'information encodée par l'activité des glomeruli est ensuite transmise par les cellules mitrales et projetée vers divers centres olfactifs de plus haut-niveau, qui pourraient être impliquées dans la production des réponses comportementales à partir des représentations corticales. Des expériences d'imagerie biphotonique in vivo et des analyses comportementales de ces souris nous ont suggéré un modèle du traitement de l'information olfactive selon lequel la reconnaissance de motifs d'activité neuronale au-dessus du bruit de fond (phénomène de contraste), est cruciale pour la détection des odeurs. Pour mettre à l'épreuve ce modèle, nous employons des techniques de pointe d'imagerie in vivo pour comprendre comment le cerveau génère les représentations corticales d'odeurs à partir des patterns d'activité glomérulaire. Nous utilisons des lignées de souris génétiquement modifiées pour caractériser l'activité neuronale induite par les odeurs dans les différents types de neurones du cortex olfactif. Enfin, nous utilisons des approches optogénétique pour analyser l'organisation fonctionnelle de ces différents circuits neuronaux et leurs rôles dans les réponses comportementales aux odeurs.

Le laboratoire utilise une approche interdisciplinaire, combinant génétique moléculaire de la souris, imagerie fonctionnelle in vivo et paradigmes comportementaux pour étudier ces questions clés de biologie sensorielle et neurosciences. Ce processus sensoriel ne peut être étudié que dans un animal en vie, et ne peut être reproduit en culture cellulaire.

Nombre total d'animaux pour le protocole d'optogénétique sur 5 ans : 1080 souris

Nombre total d'animaux pour le protocole d'imagerie in vivo sur 5 ans : 1320 souris donc un total de 2,400 souris.

Le nombre d'animaux utilisés dans notre projet est réduit à son minimum dans la limite de ce qui est permis pour obtenir des résultats statistiquement valides. Quand cela est possible les croisements sont réalisés entre parents homozygotes.

Il est cependant nécessaire de reproduire les résultats de manière indépendante et d'avoir plusieurs échantillons pour éviter les différences dues à la variabilité biologique. Il est également indispensable de maîtriser les techniques pointues de l'imagerie biphotonique in vivo. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Toutes les expériences invasives sont réalisées sous anesthésie.

3849. Le virus Herpes simplex de type 1 (HSV1) est un agent infectieux dont l'homme est le seul hôte naturel. La contamination (primo-infection) survient par la salive. Cette période, le plus souvent asymptomatique, est caractérisée par une migration du virus vers le système nerveux, où il entre en latence, c'est à dire qu'il y reste quiescent sans se répliquer. L'infection latente par HSV1 est retrouvée chez au moins 90% d'humains de plus de 50 ans. Le virus peut ensuite se réactiver (i.e. reprendre un cycle de réplication), à l'origine des récurrences herpétiques, le plus souvent dans la bouche (boutons de fièvre, 15% de la population), mais aussi dans l'œil, mais de façon presque toujours unilatérale. Plus de 90 000 français sont concernés par l'herpès oculaire, qui est aussi la première cause infectieuse de cécité unilatérale dans les pays occidentaux.

Il n'existe malheureusement pas de modèle in vitro de latence herpétique (les cultures cellulaires ne permettent pas d'obtenir une phase d'infection herpétique latente). Le recours à l'expérimentation animale est donc indispensable pour comprendre cet agent pathogène humain. Un modèle d'infection herpétique reproduit chez la souris une grande partie des données observées chez l'homme : une suspension de HSV1 inoculée dans la lèvre gauche entraîne une infection latente dans le système nerveux, de façon bilatérale mais asymétrique : alors que la charge de virus latents est symétrique, certains marqueurs biologiques, connus pour être associés à la possibilité ultérieure de réactivation virale, sont plus nombreux du côté de l'inoculation (gauche). Or, dans ce même modèle, la réactivation virale est effectivement plus efficace du côté gauche.

Ces résultats suggèrent que les événements précoces de l'infection aiguë (différent entre le côté de la primo-infection et l'autre) déterminent le niveau d'infection latente puis la capacité de réactivation. Ceci ouvre des perspectives majeures pour le développement d'une méthode vaccinale innovante, visant à induire une infection « contenue » (comme celle observée du côté opposé à la primo-infection) afin de bloquer la possibilité de réactivation ultérieure. Les avantages escomptés de ce projet expérimental sont donc de comprendre les phénomènes précoces de la mise en place de l'infection herpétique latente et leurs effets sur la possibilité de réactivation. Les dommages escomptés sont liés à l'inconfort des animaux pendant la phase de primo-infection et l'éventuelle réactivation (périodes couvertes par l'utilisation d'anti-inflammatoires).

Dans ce projet, un maximum de 880 souris (consanguines, afin de réduire la variabilité inter-individuelle et donc le nombre total d'individus) sera utilisé. Après répartition en groupes comparables, elles seront inoculées avec une première souche de HSV1 dans la lèvre (sauf les témoins), afin de contraindre une seconde souche de HSV1, inoculée quelques jours plus tard, à entrer dans un état de latence impropre à la réactivation. Le nombre de souris utilisé sera réduit au minimum indispensable pour apporter la preuve statistique de l'effet escompté. Elles auront par ailleurs un accès illimité à la nourriture et la boisson, et seront surveillées régulièrement pour détecter tout signe de mauvaise tolérance.

3850. Avec 75 % de la production mondiale, la France est le premier pays producteur de foie gras. En 1999, le Comité Permanent de la Convention Européenne pour la protection des animaux dans les élevages a recommandé que des études portant sur des méthodes alternatives à la prise forcée d'aliment chez les palmipèdes soient mises en place dans les pays producteurs de foie gras (articles 24 et 25). Depuis 2009 des essais ont été réalisés chez l'oie. Or la production de foie gras d'oie ne représente que 2,5% environ de la production française de foie gras.

Ce projet a pour enjeu d'améliorer le bien-être des canards lors de la production de foie gras en ne pratiquant pas d'acte de gavage. L'objectif de ce projet est donc d'étudier la faisabilité d'obtenir un foie engraisé sans prise forcée d'aliment chez le canard mulard. Ce projet repose sur une stimulation forte de la consommation des canards qui est la première étape pour le déclenchement d'un engraissement du foie. Ce protocole s'appuie 1) sur des cycles lumineux contrôlés simulant la période pré-migratoire automnale, 2) sur une alternance entre restriction alimentaire et alimentation à volonté et 3) sur l'accès à un aliment riche en énergie et avec une forte appétence pour les canards : le maïs. Quatre modalités seront testées selon un schéma expérimental 2x2 avec 2 types de présentation du maïs, en grain ou concassé, ce qui améliore la digestibilité du maïs et 2 modes de distribution du maïs lors de la période de stimulation de l'ingestion, à volonté ou via une augmentation progressive du distribué

A 8 et 12 semaines d'âge, avant alimentation au maïs, 40 canards par date seront abattus pour évaluer le développement des animaux. A 13, 14, 16 et 20 semaines d'âge 25 animaux par lot (100 au total par date) seront abattus afin d'évaluer l'engraissement du foie au cours du temps.

Les 480 canards impliqués dans ce projet représentent un nombre optimal d'animaux à utiliser pour observer un effet des modalités testées. C'est en effet un compromis entre l'effectif idéal par lot qui se situerait plutôt, d'un point de vue strictement statistique, à 30 individus par modalité par jour d'abattage et le souhait d'utiliser le moins d'animaux possibles tout en optimisant les conditions de logement. Aucune procédure provoquant de la douleur ne sera appliquée aux animaux. Les canards seront élevés en logement fermé de 6 semaines d'âge jusqu'à leur abattage pour contrôler la durée d'éclaircissement. La conduite de l'alimentation reposera sur deux phases : une première phase avec un accès contrôlé des canards à la mangeoire et réduit dans le temps, puis une phase avec une augmentation de l'accès à la mangeoire et une alimentation au maïs blanc. La conduite alimentaire permettra aux animaux de couvrir leurs besoins nutritionnels tout au long du protocole.

3851. L'objectif de cette étude est de caractériser l'apparition des plaques β -amyloïdes et la réaction neuroinflammatoire de façon longitudinale dans ce modèle animal TgF344-AD à l'aide de traceurs fluorés par imagerie moléculaire de Tomographie par Emission de Positons (TEP). Ce modèle animal de la maladie d'Alzheimer correspond à des rats doubles transgéniques de souche Fischer modifiés au niveau d'un gène codant le précurseur de la protéine chimère, la bêta-amyloïde (APP_{swe}), et le second gène codant la mutation « DeltaE9 » de la presélinine humaine. Nous ne serons pas en charge de la création de la lignée transgénique. Des couples de rats seront utilisés et permettront d'obtenir des petits qui seront génotypés, afin de vérifier s'ils sont porteurs ou non, et l'étude sera réalisée sur ces petits mâles. Ces travaux s'inscrivent dans la cadre d'un projet européen 7ème PCRD, INMIND (Imaging of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases). Un de nos partenaires, a reçu les 1ers couples d'animaux de leur laboratoire d'origine puis, après reproduction, sera en charge de distribuer la descendance chez 5 partenaires différents du consortium qui les utilisera pour leurs travaux spécifiques. L'objectif est de pouvoir comparer les résultats obtenus par les 5 différents centres européens dans un même modèle animal renforçant ainsi la synergie entre les partenaires. Ce type d'étude en clinique est difficilement envisageable dû à l'injection de radiotraceur et à la nécessité d'avoir des témoins pour exploiter les données (remplacement).

Deux études seront réalisées nécessitant l'utilisation de 135 animaux (10 femelles et 125 rats mâles) pendant 5 ans. Une première étude permettra de caractériser longitudinalement le modèle par imagerie. La seconde étude portera sur la neuroprotection par une substance pharmacologique permettant de cibler les récepteurs $\alpha 7$ nicotiques. Les animaux seront hébergés à raison de 2 par cages avec présence d'un enrichissement (raffinement).

L'utilisation de l'imagerie scintigraphique permet de réduire le nombre d'animaux utilisés car permet la réalisation d'études longitudinales et chaque animal est son propre contrôle (réduction). Des études préliminaires indiquent que des effectifs de n=10 par groupe en imagerie sont nécessaires pour dégager des effets significatifs au seuil de p<0,01 compte tenu de la variabilité inter-individuelle des animaux et de l'expérience. Les cerveaux des animaux passés en imagerie seront ensuite utilisés pour des analyses d'immunohistochimie et d'autoradiographie. Concernant les études d'autoradiographie et d'immunohistochimie, des effectifs de n=5 seront suffisants pour dégager des effets significatifs au seuil de p<0,01.

3852. Notre projet vise à évaluer chez le primate un traitement de thérapie génique pour les calpainopathies. Cette maladie génétique rare et de transmission récessive est due à des mutations d'une enzyme du muscle squelettique appelée calpain 3. Ces pathologies se manifestent vers l'âge de 10-20 ans, touchent principalement les muscles proximaux des ceintures musculaires (scapulaire et pelvienne). Les muscles de la face, ainsi que les muscles respiratoires et cardiaques sont épargnés. Il n'existe pas de traitement à l'heure actuelle. Ce projet se place dans un cadre d'étude préclinique en vue de tester et d'évaluer la toxicité et la biodistribution de notre vecteur sur des primates, animal adapté à ce type d'étude pour une prédiction transposable à l'homme vu la proximité de ces 2 espèces). Cette étude est une étude pilote qui permettra de déterminer la sécurité de notre vecteur et de définir l'intérêt de réaliser une étude réglementaire de tolérance ou non. Cette étape pilote s'inscrit donc dans une volonté de « raffiner » et « réduire » le nombre d'animaux utilisés (règle des 3R). Le nombre d'animaux (au nombre de 6) a été réduit au minimum tout en permettant l'exploitation future des résultats. Les animaux seront suivis quotidiennement par des animaliers et vétérinaire spécialisés dans les primates pour s'assurer de leur bien-être (évaluation du stress et douleur potentiels, et mise en place de points limites adaptés).

3853. Les dispositifs médicaux constituent un élément clé à la fois dans le domaine diagnostique et dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, ils incarnent des produits ingénieux dont la recherche et le développement s'avèrent désormais indispensables pour satisfaire l'ensemble des besoins de santé. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain. Dès lors, ils constituent une source potentielle de réactions indésirables comme des allergies, des irritations, voire des réactions généralisées de l'organisme.

Il est donc impératif, comme l'exige la réglementation, d'identifier ces risques avant de mettre un produit sur le marché et l'utilisation d'animaux est à ce jour primordiale pour y parvenir intégralement. En effet, si des méthodes alternatives existent, elles ne permettent pas de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux dispositifs médicaux, en particulier en raison de leur complexité chimique. Des modèles animaux sont donc définis pour chaque type d'essai réglementaire à mener : il s'agit dans ce projet de rongeurs et de lapins. Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal. Le nombre minimum d'animaux est défini dans les textes de référence. Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est estimé à 13 700 par an.

Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgesie). De plus, tous les animaux jouiront d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin de leur assurer un bien-être optimal tout au long des procédures. Enfin, les animaux grégaires seront hébergés en groupes dès que l'essai le permet; des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères seront maintenus dans tous les cas ; des chaînettes pourront être suspendues aux cages des lapins afin qu'ils puissent se divertir et des plateformes pourront être disposées pour qu'ils puissent s'isoler lorsqu'ils le souhaitent; enfin, de la musique sera diffusée dans les salles d'hébergement pour apaiser les animaux.

Un comité d'éthique et plusieurs vétérinaires sont intégrés aux équipes à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

3854. La douleur est une « expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle ou décrite en termes évoquant de telles lésions » (définition de l'International Association for Study of Pain). Elle est qualifiée de chronique

lorsqu'elle évolue depuis six mois ou persiste au-delà du temps normal de guérison suite à l'événement déclenchant (blessure, chirurgie, médicament, maladie). Il s'agit alors d'une pathologie à part entière, nécessitant un traitement à long terme. La douleur chronique est envahissante, invalidante moralement et physiquement. Elle a des conséquences psychologiques et sociales importantes: perte d'autonomie et frein aux activités quotidiennes voire professionnelles, isolement, risque de dépression. La douleur chronique concernerait 10 à 25 % de la population (source INSERM). Sa prévalence est particulièrement élevée chez le sujet âgé. Par son impact sur la qualité de vie et les recours aux systèmes de soins qu'elle induit, la douleur chronique représente un coût socio-économique élevé.

Malgré de récents progrès, la compréhension des mécanismes physio-pathologiques de la douleur chronique reste incomplète. Les médicaments existants ne parviennent à apaiser la douleur que pour moins de la moitié des patients, et en raison de leurs effets secondaires ne conviennent pas à tous les patients. Les recherches sur la douleur chronique sont donc une nécessité, pour en comprendre les mécanismes fondamentaux et pour découvrir de nouvelles solutions thérapeutiques.

L'objectif de ce projet est d'utiliser des modèles d'inflammation (aigüe ou persistante) ou de lésion nerveuse périphérique (atteinte neuropathique) chez le rongeur, afin d'identifier de nouveaux traitements. Ces modèles induisent des phénomènes d'hypersensibilité quantifiables chez le rongeur par des tests comportementaux largement décrits et calibrés. Le recours à l'animal permet aussi d'aborder dans sa globalité les conséquences cliniques d'une condition douloureuse, par l'évaluation concomitante des différentes fonctions (sensorielles, motrices, attentionnelles et mnésiques) et d'identifier des biomarqueurs qui pourront être utilisés en médecine translationnelle. Cette approche multifactorielle permet ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés. Le nombre maximal d'animaux utilisés dans le cadre de ces modèles est estimé à 1440 souris et 720 rats par an.

Les études réalisées au sein du Centre de Recherche sont encadrées par des consignes établies et validées par le Comité d'Éthique, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (l'hébergement, les soins, la manipulation, les expérimentations et la mise à mort), et ayant toutes pour objectif de prévenir ou réduire toute souffrance ou détresse chez l'animal. Dans ce projet, les signes cliniques attendus sont spécifiquement définis en fonction des pathologies étudiées tant sur le plan de leur nature que de leur intensité tolérée. Par ailleurs, chaque procédure impliquant l'utilisation d'un animal est soumise à approbation par le Comité d'Éthique, avant toute intégration des animaux dans les études. Un support en biostatistiques est apporté au Comité d'Éthique par des experts, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées, et réduire ainsi le nombre d'animaux utilisés. Enfin, les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques et comportementaux fondamentaux.

3855. Environ 10% des décès dans le monde sont d'origine traumatique et 30 à 40% d'entre eux sont liés à une hémorragie. Le choc hémorragique est ainsi la deuxième cause de mortalité après les traumatismes crâniens. L'état de choc se caractérise par une hypoxie tissulaire systémique persistante, conséquence de la diminution de la volémie plasmatique et de la perte des hématies transportant l'oxygène. Pour tenter de compenser le manque d'oxygène au niveau tissulaire, le métabolisme anaérobie sera activé. Une acidose lactique, la production de radicaux libres et de protons sont ainsi observées entraînant inflammation et mort cellulaire dont les conséquences (défaillance multi-viscérale et coagulopathie) engagent le pronostic vital du patient. En conséquence, améliorer l'oxygénation tissulaire en cas de choc hémorragique présente un intérêt majeur dans la prise en charge du choc hémorragique non contrôlé. Parmi les pistes potentielles, les substituts d'hémoglobine dont M101 biopolymère développé à partir de l'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* apparaît être un excellent candidat. En effet, ce substitut a démontré sa grande capacité de fixation de l'oxygène (156 molécules d'O₂ à saturation). Si l'innocuité de la molécule a été montrée (pas de mortalité après injection chez la souris), son efficacité dans le cadre de la prise en charge du choc hémorragique n'a jamais été évaluée.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'intérêt de l'utilisation de ce composé dans la prise en charge du choc hémorragique non contrôlé. Les travaux réalisés se veulent au plus proche « du terrain ». Ainsi, les protocoles expérimentaux réalisés sur modèle murin seront calqués sur les modalités de prise en charge clinique du choc hémorragique non contrôlé. In fine, l'objectif est de réaliser des travaux précliniques permettant d'évaluer l'intérêt et l'innocuité de M101 dans le cadre de la prise en charge du choc hémorragique non contrôlé avant de proposer, en fonction des résultats, des essais cliniques.

Ce projet a une durée de 36 mois. Il est divisé en 2 phases. La première phase a pour objectif de déterminer l'efficacité et l'innocuité de M101 lors de la prise en charge du choc hémorragique. Elle impliquera l'utilisation de 65 rats Sprague Dawley.

La seconde phase permettra d'évaluer le bénéfice du traitement par M101 sur les principales conséquences du choc hémorragique (métabolisme, inflammation, coagulation et microcirculation). Elle s'attachera en outre à valoriser les résultats obtenus en termes de communications et publications scientifiques. Cette deuxième phase impliquera elle aussi l'utilisation de 65 rats Sprague Dawley.

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

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

Les résultats attendus sont une amélioration significative de la survie des rats bénéficiant d'une prise en charge par M 101 par rapport aux rats avec une réanimation conventionnelle ainsi que vis-à-vis du groupe contrôle. A terme l'objectif est le développement d'une solution de réanimation utilisable en perfusion par voie intraveineuse assurant à la fois une oxygénation tissulaire et un maintien de la volémie.

En clinique humaine cette solution remplacerait l'association soluté d'expansion volémique et concentré sanguin globulaire (issu des collectes de sang) utilisé actuellement. Cette nouvelle solution s'affranchirait des contraintes liées à l'histocompatibilité des groupes sanguins A/B/O rhésus. La solution permettrait un usage hospitalier et extrahospitalier afin d'assurer une ré-oxygénation tissulaire précoce des tissus en souffrance anoxique tel que les chocs hémorragiques, les pneumonies graves, les infarctus du myocarde ou encore les accidents vasculaires cérébraux. De même elle pourrait potentiellement être un produit de substitution transitoire aux globules rouges sanguins lors des chirurgies hémorragiques.

3856. L'objectif de nos recherches est de définir les bases moléculaires du développement normal des certains organes vitaux comme le rein pour mieux cerner les dysfonctionnements qui conduisent à certaines pathologies humaines. En particulier, nous nous intéressons en particulier au facteur de transcription HNF1B impliqué dans le développement précoce du rein, pancréas et foie, en utilisant différents modèles de souris. Ce rôle primordial lors de l'organogenèse est documenté par le phénotype des patients porteurs des mutations hétérozygotes du gène HNF1B et responsable du syndrome complexe RCAD (Renal Cysts And Diabetes), MODY5 (Maturity Onset Diabetes of the Young Subtype 5), associé à une atteinte rénale anténatale (kystes rénaux, dysplasie rénale multikystique), des anomalies du tractus génital, ainsi qu'à un diabète de type 2 et des dysfonctions hépatiques.

Afin de mieux cerner la physiopathologie de ce syndrome complexe, nous avons généré des modèles murins portant des mutations de HNF1B identifiées chez l'homme et qui reproduisent assez fidèlement cette pathologie. Leur analyse vise à déterminer les modifications précoces associées à la formation de multiples kystes rénaux et le développement de certaines tumeurs caractéristiques de cette maladie, afin de les ralentir et/ou abolir. Ainsi nos résultats vont fournir à terme des outils pour l'élaboration de traitements adaptés.

La souris est un modèle expérimental de choix parce que son développement embryonnaire et sa physiologie, en particulier concernant le développement et la fonction rénale, est semblable en grande partie à celle de l'homme. D'autre part, ce modèle permet une manipulation facile de son génome à l'aide de techniques transgéniques et de ciblage génique. On dispose actuellement un nombre important et croissant de lignées de souris mutantes ainsi que des nombreux outils moléculaires et d'analyses phénotypiques.

Le nombre total des animaux à utiliser dans la totalité de ce projet est estimé de 400. Les souris sont placées dans des cages regroupant généralement 2-5 individus, avec accès à l'eau et la nourriture, avec litière et copeaux de carton ainsi que des petits abris et des cotons comme enrichissements

Nous respectons la règle des 3Rs (Replacement, Refinement & Reduction), en effectuant des expériences en culture organotypique afin de remplacer l'utilisation des animaux.

Le suivi des animaux est également régulier et des mesures de surveillance strictes sont mises en place afin de vérifier que les animaux ne présentent pas de signes de douleur ou d'autres défauts, en particulier suite aux prises du sang. Enfin, seul le nombre minimum des animaux suffisant pour des analyses statistiques est utilisé à chaque expérience.

3857. Malgré des efforts considérables pour lutter contre le cancer et trouver un traitement efficace, cette pathologie reste l'une des principales causes de décès chez l'homme dans le monde et en France. La majorité des approches pour traiter le cancer ont été élaborées sur la base d'études cellulaires *in vitro*. Malheureusement, elles se sont révélées infructueuses pour de nombreux types de cancers. En effet, le développement tumoral est un processus complexe qui nécessite des analyses *in vivo* dans des modèles murins. Les recherches actuelles ont révélé qu'un traitement efficace du cancer dépend non seulement de l'élimination d'une grande partie de la tumeur, mais aussi de l'élimination spécifique de cellules cancéreuses rares appelées cellules souches cancéreuses (CSC). Comprendre le comportement des CSC pourrait ainsi fournir de nouvelles pistes pour le traitement du cancer. Au cours des dix dernières années, notre analyse du développement tumoral chez la souris a montré que la phosphatase Wip1 joue des rôles clés dans la suppression des tumeurs. Ce projet de recherche porte donc sur l'analyse du rôle de Wip1 dans les voies de régulation de la tumorigenèse, en mettant l'accent sur le comportement des cellules souches adultes durant et après leur transformation en CSC. Pour ce projet, nous utiliserons 2 modèles murins de développement tumoral: le modèle Eμ-Myc, lignée disponible commercialement (JAXMice 02728.) et qui développe des lymphomes spontanément (procédures 1-3); et un modèle de greffes de cellules tumorales humaine sur des souris immunodéprimées nommées NOD scid gamma ou NSG (procédures 4-7). Grâce à ces modèles, nous analyserons le rôle de Wip1 dans le comportement des CSC lors de deux grands processus: le développement/progression tumoral et la résistance à la chimiothérapie. Ce travail consistera surtout à mesurer la vitesse de croissance/régression tumorale. Pour cela nous marquerons les cellules souches normales et cancéreuses en utilisant des lignées de souris reportrices, c'est-à-dire des lignées de souris transgéniques produisant des protéines luminescentes ou fluorescentes spécifiquement dans les cellules d'intérêts (nous utiliserons 5 différentes lignées: Rosa26-LacZ reporter KI, Rosa26-YFP reporter KI, Rosa26-Luc reporter KI, Rosa26-Confetti reporter KI, Rosa26-DTT KI, chacune apportant une spécificité technique, cf description du projet). Ceci sera possible parce que l'expression des gènes reporters sera induit par des promoteurs de gènes (promoteurs: éléments qui contrôlent l'expression d'un gène) participants au comportement des cellules souches normales et/ou cancéreuses (Oct4-Cre, Wip1-Cre, p16-Cre, et potentiellement Lgr5-Cre, Bmi1-Cre).

L'objectif sera d'améliorer notre compréhension des mécanismes impliqués dans le comportement des CSC afin de mieux comprendre le traitement du cancer. Nous avons choisi d'utiliser des modèles murins car les souris transgéniques sont facilement disponibles et sont les plus couramment utilisés en laboratoire. Mais, en accord avec le concept de "remplacement", les expériences seront réalisées *in vitro* sur des cellules en culture aussi souvent que possible. Néanmoins, la complexité du développement tumoral, de part la présence de nombreux types cellulaires d'origine embryonnaire différente, rend la reconstitution d'un environnement complet très difficile. Il est donc essentiel de réaliser des expériences sur les souris. Nous appliquerons aussi le concept de "raffinement": En effet, s'agissant de modèle de tumeurs se développant spontanément, nous utiliseront une feuille de score pour évaluer la souffrance des souris et une analgésie au paracétamol pourra être utilisée si nécessaire. Enfin le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été déterminé afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs tout en limitant au maximum le nombre d'animaux. Pour l'ensemble du projet, nous utiliserons un maximum de 9019 animaux, dont un total de 705 souris pour le modèle de greffe en souris NSG (procédures 4-7). En ce qui concerne le modèle de lymphome Eμ-c-myc, toujours afin de réduire au maximum le nombre de souris nécessaire, nous procéderons par étape pour la réalisation de nos expérimentations, en ciblant plus spécifiquement certaines lignées par rapport à d'autres (les plus pertinentes en premier, Le Wip1KO vs WT avec Cre p16, Wip1, Oct4 et reporters LacZ, YFP et DTT).

Ainsi, l'ensemble des expérimentations avec ce modèle nécessitera un maximum de 8334 souris qui pourra être réduit à un minima de 2772 souris (l'étape 1 des procédures 1-2 et procédure 3 du tableau récapitulatif détaillé en Annexe 3).

Notre projet concerne les mécanismes régulant le développement tumoral, et nécessite l'utilisation de modèles animaux récapitulant la complexité de cette pathologie. Ce projet a été construit en respectant la règle des 3R.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été choisi afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs avec le nombre de souris minimum. Nos groupes expérimentaux sont présentés dans chaque procédure et le nombre d'individus dépend de la pénétrance du modèle.

Remplacer : De nombreuses publications ont décrit la culture des "tumorsphères" comme une méthode de remplacement pour l'étude des cellules souches cancéreuses. Elle sera envisagée aussi souvent que possible. Cependant, ces cultures ne récapitulant pas toute la complexité de l'organe, nous devons avoir recours à des animaux dans certains cas précis.

Raffiner : Toutes les expériences et manipulations des animaux seront effectuées dans le respect de la réglementation européenne en cours afin de préserver le bien être de l'animal et de réduire au minimum leur niveau de stress.

3858. L'objectif du projet est d'analyser le phénotype d'une lignée de souris Knock In nouvellement générée, porteuses d'une mutation HSP47. Nous avons caractérisé une mutation HSP47 p.R194S chez une patiente atteinte d'une PKAD (polykystose rénale autosomique dominante) avec mutation du gène PKD1. Cette mutation est responsable chez l'homme de kystes rénaux anormalement volumineux, mais des signes extrarénaux suggèrent des anomalies de maturation des collagènes I et IV. Après avoir regardé les différents tests statistiques à

effectuer et tout en limitant le nombre d'animaux, nous comptons utiliser au sein de ce projet 900 animaux pour toutes les procédures expérimentales durant 5 ans. Afin d'éviter toutes souffrances nous administrerons un analgésique afin de soulager les animaux. Ce modèle sera utilisé car il n'y a pas d'autres modèles cellulaires pour remplacer l'usage d'animaux. Nous souhaitons corrélérer les observations phénotypiques murines et la symptomatologie humaine afin de mieux comprendre la physiopathologie des différentes atteintes d'organes observées dans cette pathologie, et éventuellement de tester des pistes thérapeutiques.

3859. La très grande majorité des actions motrices sont très intimement influencées par notre perception des informations sensorielles qui parviennent continuellement à notre cerveau. Le fait de saisir un objet avec une main par exemple implique un ensemble complexe d'aller-retour entre nos fonctions motrices et nos perceptions tactiles: nous refermons nos doigts lorsque le contact à l'objet est réalisé, mais nous ajustons aussi en permanence notre force de serrage pour ne pas endommager l'objet tout en surveillant toute sensation de glissement pour éviter de le laisser s'échapper. Les structures cérébrales qui pilotent nos commandes motrices ainsi que celles qui traitent les informations tactiles sont donc obligées de communiquer intensément même pour ces tâches du quotidien extrêmement simples. Comment s'effectue cette communication, comment sont encodées les informations et quels sont les calculs élémentaires d'ajustement qui sont implémentés dans ces processus sont encore aujourd'hui des questions qui demeurent largement ouvertes. Les récents développements dans le domaine des prothèses mécaniques pilotées directement par une interface cerveau-machine ont relancé l'intérêt d'avancer dans notre compréhension des mécanismes fins d'interaction sensori-motrices afin d'en améliorer les performances.

Les projets réalisés dans notre équipe visent à étudier le fonctionnement des structures du cerveau impliquées dans le traitement des informations motrices et sensorielles et situées dans la partie la plus externe du cerveau appelée cortex. Le cortex joue à la fois un rôle principal dans nos processus cognitifs élaborés et est relativement accessible expérimentalement puisque situé immédiatement sous l'os du crâne. Cette accessibilité nous permet de mettre en œuvre des approches expérimentales de microscopie. Nos études cherchent ainsi à disséquer les mécanismes de communications entre les différentes régions du cortex à une échelle qui va des neurones individuels (échelle du langage individuel, les 'bit' du cerveau) jusqu'aux larges assemblées de cellules (échelle des fonctions élémentaires, structure du 'logiciel'). Bien que modérément invasives, ces approches ne peuvent cependant pas être appliquées sur l'homme directement, et nous devons utiliser des modèles animaux. Nous avons choisi dans notre équipe le modèle des rongeurs car il permet à la fois de réaliser des expérimentations sur animal vivant, impératif pour étudier les aspects moteurs, tout en présentant un exemple d'interaction sensori-motrice modèle grâce au système des vibrisses, longues moustaches utilisées par ces animaux pour explorer activement leur environnement tactile. De plus, les rongeurs nous permettent de bénéficier des nombreux développements récents dans le domaine de l'opto-génétique pour déterminer le rôle spécifique de certaines catégories de cellules dans l'orchestration de l'activité des différentes structures du cortex. Dans ce projet, nous nous efforçons de respecter au mieux la « règle des 3R ».

- Réduire. Nos projets allient des développements technologiques en optique, avec leur application pour l'exploration des traitements des informations par le cortex. L'emploi des animaux dans nos expériences suit deux logiques différentes. La mise au point de nouvelles microscopies implique dans la phase finale de développement l'utilisation d'animaux pour démontrer leur principe et leur potentiel. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum permettant de converger vers une solution microscopique convenable. L'exploration des fonctions du cortex fait appel à des animaux engagés dans des protocoles bien établis et maîtrisés par les membres de l'équipe. Dans ce cas, le nombre d'animaux utilisé est choisi comme le minimum permettant d'établir la significativité statistique des mécanismes étudiés.

- Raffiner. Dans tous les cas, un suivi précis du stress ou de l'inconfort ressenti par les animaux est effectué afin de les supprimer au maximum. Des tests systématiques et des critères objectifs sont mis en place pour évaluer l'état des animaux et détecter toute souffrance. Seules des personnes entraînées réalisent les manipulations d'animaux afin de suivre les règles de bonnes pratiques.

- Remplacer. Nos projets sont menés dans la plupart des cas en collaboration avec des équipes de théoriciens, ce qui permet d'utiliser les données expérimentales pour modéliser certains phénomènes de codage et d'apprentissage. Ce couplage entre expérience et théorie permet ainsi de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Ce projet utilisera 240 rats Wistar, 450 souris C57BL6/J, 110 Souris CBA/J, 20 souris PV-Cre ; 20 souris SOM-Cre

3860. La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie caractérisée par la perte des motoneurones (MNs), conduisant à une faiblesse musculaire progressive, une paralysie et au décès, 3 à 5 ans après le diagnostic. Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif et le développement d'une thérapie efficace pour cette maladie représente un enjeu majeur.

Parmi les formes génétiques de SLA, 20% sont causées par des mutations du gène codant la superoxyde dismutase 1 (SOD1), qui induisent une forte toxicité, en particulier pour les MNs. Notre stratégie consiste à diminuer son expression avec l'emploi d'un oligonucléotide inhibiteur de la SOD1 (ASOSOD1), qui sera véhiculé par un vecteur de thérapie génique de type AAV (Adeno-Associated Virus). Cette étude nécessite l'emploi de souris transgéniques SOD1G93A, qui présentent un phénotype proche de la SLA (perte de poids, faiblesse musculaire, paralysie). En comparaison avec des vecteurs contrôles, dépourvus d'ASO (AAV-CTR), les vecteurs thérapeutiques AAV-ASOSOD1 seront injectés à la naissance ou à 50 jours, par voies intracérébroventriculaires (ICV) et intraveineuses (IV). Des résultats préliminaires ont montré que cette stratégie d'injection d'AAV est la plus efficace pour transférer un gène à la fois dans les organes périphériques et dans le système nerveux central. L'état général des souris sera évalué par un suivi quotidien (survie/poids) et par une analyse régulière de leur activité locomotrice (rotarod et grip test). Ces analyses nécessitent un nombre minimum de 12 animaux/condition pour obtenir des résultats interprétables. Ces données seront complétées par des analyses qualitatives et quantitatives (10 souris/condition). Ainsi, pour l'ensemble de ces expériences, 96 souris SOD1G93A seront injectées (ASO et contrôle), auxquelles s'ajoutent 24 souris SOD1G93A et 24 sauvages non-injectées, qui serviront de contrôles.

Récemment, des mutations du gène de l'ubiquiline-2 ont été identifiées chez des patients atteints de SLA. Afin d'étudier son rôle dans la maladie, nous souhaitons générer le premier modèle murin de cette forme de SLA, en faisant exprimer l'ubiquiline-2 mutée par l'intermédiaire d'un AAV (AAV-UBQLN2mut). Cette méthode alternative est plus intéressante pour modéliser une pathologie chez l'animal, puisque, comparée aux techniques classiques de transgénèse, l'injection de vecteurs demeure plus rapide, moins onéreuse, et permet d'utiliser un nombre extraordinairement plus réduit d'animaux. En comparaison avec des vecteurs contrôles, renfermant la forme sauvage (AAV-UBQLN2WT), les vecteurs AAV-UBQLN2mut seront injectés par voie intracérébroventriculaire chez des souris FVB nouveau-nées. Dans un premier temps, l'état général des souris sera évalué par un suivi quotidien (survie/poids) et par une analyse régulière de leur activité locomotrice (n=12/condition). Puis, des analyses qualitatives et quantitatives seront menées à 30 jours et à 90 jours (n=10/condition), afin de pouvoir évaluer la progression de la maladie. Ainsi, pour l'ensemble de ces expériences, 141 souris FVB sont nécessaires pour permettre de caractériser cette forme de SLA chez la souris.

Ces projets, qui nécessitent un nombre total de 284 animaux, respectent pleinement les règles de réduction, de remplacement et de raffinement. En effet, un même animal servira pour différentes expériences (PCR quantitative et western blot, par exemple) et, pour chacune d'entre elles, le nombre d'animaux utilisés a été choisi pour permettre d'obtenir des résultats statistiquement interprétables. De plus, des tests *in vitro* ont précédemment permis de valider les vecteurs utilisés (ASO ou UBQLN2), ce qui a permis de diminuer le nombre d'animaux utilisés. Cependant, dans le but d'atteindre nos objectifs, les vecteurs AAV-ASOs doivent être à présent testés sur des souris modèles de la SLA, avant d'entrer en phase clinique. Ces animaux ont une durée de vie courte (120 jours) et étant donné la sévérité de leurs symptômes, ceux-ci seront systématiquement euthanasiés dès qu'ils auront atteint le point limite. Outre le fait que ces animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne (suivi de poids, activité motrice, évaluation du bien-être général, vérification de l'absence de nécroses ou escarres), toutes les précautions seront prises pour optimiser leurs conditions de vie (nourriture disposée dans la cage, environnement enrichi avec de la wood wool, etc.). Ces dispositions seront également valables pour les modèles murins de SLA liée à l'ubiquitine 2, qui seront sacrifiés, si les symptômes deviennent trop graves et irréversibles.

3861. Les Ultrasons Focalisés de Haute Intensité (HI FU) peuvent pénétrer en profondeur dans les tissus et créer d'importantes lésions thermiques sans pour autant nécessiter un contact direct entre la sonde et le tissu à traiter. Ce projet a pour but de développer un nouveau dispositif médical HIFU pour le traitement des foyers cardiaques impliqués dans la survenue d'arythmie cardiaque. Les deux pathologies spécifiquement ciblées sont la fibrillation atriale et la tachycardie ventriculaire. A l'aide de ce dispositif, une nouvelle stratégie de traitement mini-invasive est expérimentée. Elle consiste à réaliser des lésions thermiques cardiaques au sein de l'oreillette gauche ou du ventricule gauche grâce à une énergie ultrasonore délivrée au travers de l'œsophage. Après avoir validé cette nouvelle technique de traitement à l'aide de simulations numériques, d'expérimentations *ex vivo* et *in vivo* sur modèle porcin, le projet d'expérimentation animale présenté consiste à réaliser un traitement sur le modèle primate. Cette étude sera effectuée sur 3 primates de type babouin.

3862. Le projet a pour objectif d'évaluer la biodisponibilité d'acides aminés et d'acides gras libres dans le sang après consommation de 4 aliments destinés à l'espèce cible, le chat. Un plan expérimental croisé a été développé pour réduire au minimum le nombre d'animaux pour cette étude. Ainsi, un total de 12 chats sera utilisé. Des prises de sang seront réalisées à intervalles réguliers afin de pouvoir quantifier les acides aminés et les acides gras sanguins, après consommation des différents aliments évalués. D'après une étude réalisée précédemment, le nombre de prises de sang a été réduit tout en gardant une évolution précise des taux sanguins des paramètres mesurés. Ce projet contribue à mieux connaître la biodisponibilité de certains nutriments contenus dans les aliments destinés aux chats.

3863. Le projet a pour objectif d'évaluer l'impact mécanique d'un aliment sur l'amélioration de la santé bucco-dentaire (tartre, plaque) de l'espèce cible, le chien. Dans les conditions d'étude standards, il a été calculé qu'il était nécessaire d'utiliser un minimum de 16 chiens par aliment évalué afin de mettre en évidence des différences statistiques significatives. Dans le cadre de cette étude, les animaux seront soumis à une anesthésie afin de pouvoir pratiquer une évaluation du niveau de formation de la plaque et du tartre après consommation des différents aliments, ainsi qu'un détartrage tel que prévu dans le protocole. La mise en place des 3R a consisté en 1) la réduction du nombre d'individus requis pour l'étude par la mise en place d'un plan expérimental spécifique (plan expérimental croisé), et 2) l'utilisation d'une méthode d'anesthésie gazeuse permettant un réveil et une récupération plus rapide de l'individu. Le détartrage réalisé dans le cadre de cette étude permettra de supprimer le détartrage habituellement réalisé chez ces individus, dans leur programme de soins bucco-dentaires annuels. Ce projet contribue au développement d'aliments destinés à améliorer la santé bucco-dentaire des chiens.

3864. Ce projet a pour objectif d'évaluer l'immunogénicité de nouveaux candidats vaccins développés en traitements préventifs et/ou thérapeutiques de maladies infectieuses. L'évaluation de l'immunogénicité sur animaux est l'une des méthodes décrites pour démontrer l'efficacité préclinique des candidats vaccins avant d'envisager des études cliniques chez l'homme. Les essais d'immunogénicité permettent d'évaluer le bénéfice de différentes préparations vaccinales, d'identifier les composés nécessaires à la formulation vaccinale, d'évaluer les nouvelles voies d'administration ou les nouvelles formes pharmaceutiques qui permettent d'améliorer la performance du vaccin. Enfin, les mécanismes d'action et la caractérisation de la réponse immunitaire doivent être évalués pour comprendre la réponse immunitaire, voire, l'améliorer. Un test d'immunogénicité consiste à administrer à des animaux un candidat vaccin, à les héberger pendant la période nécessaire à l'obtention d'une réponse immunitaire, puis à recueillir du sang, des fluides corporels et/ou des organes afin d'analyser par des méthodes *in vitro* la réponse immune humorale (recherche d'anticorps) et/ou cellulaire (recherche de sécrétions de cytokines). Ces différentes données précliniques sont un préalable aux essais cliniques et à l'enregistrement du candidat vaccin et seront incluses dans les différents dossiers réglementaires.

Les espèces utilisées pour ce projet sont la souris, le rat, le cobaye, le hamster, le lapin, le furet et le miniporc. Le modèle animal utilisé est sélectionné en fonction de la maladie infectieuse ciblée, du type de réponse immune analysée et des données de la littérature ou des connaissances scientifiques. Il est estimé qu'au cours de ce projet d'une durée de 5 ans, 40 000 souris, 6 000 hamsters, 3 000 rats, 3 000 cobayes, 1 500 lapins, 100 miniporcs et 100 furets seront nécessaires.

Mise en œuvre des 3R

Remplacement :

Des essais *in vitro* sur cellules animales ou humaines sont également utilisés pour évaluer l'immunogénicité, ils apportent des données complémentaires mais, à ce jour, ne peuvent substituer les essais *in vivo*.

Réduction :

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

Raffinement :

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

L'anesthésie gazeuse à l'isoflurane est recommandée et est appliquée dès que le type de manipulation et l'espèce animale le permettent.

Lorsque cela est possible, le mécanisme d'action et la bio-distribution des composés du candidat vaccin pourront être suivis en cinétique par des techniques de bio-imagerie non invasives.

3865. Les maladies dégénératives de la rétine, incluant la dégénération maculaire liée à l'âge (DMLA) et les rétinopathies pigmentaires sont la cause prédominante de la cécité dans les pays industrialisés. Ces rétinopathies regroupent un ensemble de maladies héréditaires caractérisées par une perte progressive des photorécepteurs, menant à la cécité. En France, environ 1,5 millions de personnes seraient atteintes de DMLA et 200000 de RP. Si les techniques de diagnostic concernant les pathologies rétinienne ont permis d'améliorer considérablement la classification génétique de ces maladies, les techniques thérapeutiques sont toujours très insuffisantes et limitées. De nouvelles thérapies biologiques telles que la de thérapie cellulaire, sont aujourd'hui envisagées. Dans ce contexte, les précurseurs des photorécepteurs et seulement ce type cellulaire, sont capables après transplantation sous rétinienne dans un modèle de souris aveugle, de s'intégrer dans la rétine et de se différencier en photorécepteurs fonctionnels. Chez l'homme, l'obtention d'un nombre suffisant d'une population équivalente à ces précurseurs présents dans un fœtus (second trimestre de gestation), ne sera bien entendu possible qu'à partir de cellules souches pluripotentes de type ES ou iPS.

Ayant développé dans notre équipe, un processus de différenciation des cellules iPS humaines en précurseurs des photorécepteurs, le protocole proposé ici concerne l'évaluation du bénéfice fonctionnel et de la sécurité d'une greffe de ces précurseurs de photorécepteurs humains dans l'espace sous-rétinien d'un modèle de rétinopathie pigmentaire chez le rat (rats P23H). Le bénéfice fonctionnel sera évalué par deux tests : électrorétinogramme (ERG), et tomographie par cohérence optique (OCT).

De même, après greffe dans l'espace sous-rétinien des cellules (précurseurs des photorécepteurs purifiés ou non), l'innocuité des cellules greffées sera évaluée sur des rats immunodéficients (rats Nude). Les critères de sécurité évalués concernent la formation de tissu ectopique ou de tératomes dans l'œil.

Cette étude préclinique sur un modèle animal de la pathologie ainsi que l'utilisation d'animaux immunodéprimés supplémentaires pour les essais de sécurité, sont requis pour une demande d'essai clinique chez l'homme.

Au total 160 animaux sont prévus pour cette étude sur 4 ans:

120 rats P23H, qui développent une dégénérescence de la rétine (perte des photorécepteurs), seront utilisés pour l'évaluation de l'efficacité de la greffe au cours du temps.

10 rats de la même lignée mais non porteurs de la mutation serviront de contrôles.

30 rats immunodéficients (Nude) seront utilisés pour évaluer l'innocuité des cellules greffées.

En tenant compte de la règle des 3R, les animaux sont stabulés dans les conditions conformes

à la réglementation (portoirs ventilés dans des cages avec enrichissement, alimentation et abreuvement à volonté) et le nombre d'animaux utilisés a été réduit au minimum. En effet, l'utilisation in vivo de l'imagerie rétinienne et d'une approche d'analyse de la fonction rétinienne (électrorétinogramme) permettra de suivre, par différentes mesures répétées, l'évolution de la dégénérescence rétinienne au cours du temps sur un même animal (réduisant ainsi le nombre total d'animaux). De même, chaque animal n'est greffé que sur un œil, l'autre servant de contrôle, ce qui réduit d'autant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. L'administration d'analgésiques opioïdes en pré et postopératoire permet de prévenir la douleur éventuelle due aux actes chirurgicaux. Une observation régulière des animaux est effectuée pour détecter tout mal-être de l'animal avant le sacrifice en fin d'étude pour un suivi histologique.

3866. La formation des étudiants en biologie ne peut se faire uniquement par la théorie : comme tout apprentissage, une part de pratique est nécessaire. Cependant, le nombre pléthorique d'étudiants à l'inscription dans les filières de Biologie à l'Université, et les nombreuses spécialisations possibles de nos étudiants à la fin de leur parcours, font qu'il ne serait ni éthique ni efficient d'un point de vue pédagogique de faire trop de TP, à trop d'étudiants. Le public est donc ciblé.

Des TP sur souris et rats sont destinés à des étudiants de Licence professionnelle, de Master international ou des stagiaires en formation continue à l'expérimentation animale. Leur métier comprendra la conception, la réalisation ou la supervision de recherche mettant en jeu de l'expérimentation animale. C'est pourquoi ces enseignements ont été conçus dans le but de leur enseigner les bonnes pratiques en expérimentation animale, l'éthique, mais aussi les limites des modèles animaux dans la recherche et le développement dans les domaines de la santé.

Le TP sur carpes destinés à des étudiants de Master en écologie, va permettre de faire leur démontrer concrètement comment que des marqueurs de pollution dans les écosystèmes peuvent être mis en évidence par une simple prise de sang et sans avoir à euthanasier les animaux.

Le TP d'éthologie sur poissons électriques est destiné à des étudiants en Psychologie, ou en Ethologie. Il permet de prendre conscience de la subtilité du comportement d'un animal éloigné phylogénétiquement de l'homme.

Raffinement : Seules des contraintes légères sont faites lors de ces travaux pratiques. Dans certains cas, ces contraintes résultent uniquement du stress de la contention des animaux par des personnes en cours de formation (sous supervision). S'il s'agissait de personnes formées, il n'y aurait aucun stress des animaux et pas de procédures expérimentales. Les TP comprenant uniquement une euthanasie par des personnes compétentes feront l'objet d'une autre demande, informelle, auprès du comité d'éthique dont nous dépendons, pour l'évaluation éthique du nombre d'animaux impliqués.

Remplacer : L'immense majorité de l'enseignement se fait par des cours, des TD, des démonstrations. Ne sont présentés ici que les enseignements qui requièrent le recours à l'animal. Nous montrerons pour chaque procédure, en quoi le recours à l'animal est indispensable pour la pédagogie.

Réduire: Le nombre d'animaux a été réduit au minimum et surtout les TP interviennent dans les cursus aux moments opportuns, quand les effectifs des étudiants sont réduits à ceux susceptibles d'être intéressés. Afin de minimiser le nombre d'animaux et dans la mesure où les procédures mises en œuvre sont de classe « légère », les rongeurs sont réutilisés d'une séance de TP à l'autre, au sein de ce projet. De plus tous les rats et une partie des souris sont d'ancien reproducteurs ou des souris réformées à la suite d'autres enseignements.

Ces TP permettent également de former les étudiants aux règles d'éthique en expérimentation animale. Nous les sensibilisons au bien-être animal et aux conditions d'hébergement et de manipulation des animaux.

Cela représente, pour l'ensemble des TP : 1175 rats *Rattus rattus*, 285 souris *Mus musculus*, 80 carpes *Cyprinus carpio*, 20 poissons électriques *Gnathonemus petersii* pour 5 ans.

3867. Notre unité est constituée de deux équipes dédiées à l'évaluation des interactions existant entre le système immunitaire des patients et les cancers ou organes transplantés et le développement d'outils de thérapie cellulaire (et génique ex-vivo) afin de moduler ces interactions et accroître ainsi l'efficacité des immuno-interventions. L'équipe étudiant le cancer s'est constituée avec pour objectif principal le développement de nouvelles stratégies d'immunothérapie anti-tumorales ciblant les cellules cancéreuses qui résistent aux thérapeutiques conventionnelles. Ainsi, en se fondant sur les expertises scientifiques complémentaires des investigateurs et sur l'expérience de l'unité dans

l'identification de nouvelles cibles nous souhaitons promouvoir un programme de recherche qui, en se focalisant sur l'identification de nouvelles thérapies immunologiques anti-tumorales, aura pour objectifs i) de mieux comprendre l'influence des mécanismes mis en oeuvre lors de la progression des cancers sur l'immunité, ii) de développer des stratégies de ciblage immunologique des cancers résistants aux traitements conventionnels, iii) évaluer des nouvelles combinaisons thérapeutiques avec l'immunothérapie. Enfin les modèles expérimentaux de cancérogénèse sont des modèles de tumeurs leucémiques, et différents modèles de cancer du côlon, sein, mélanomes, poumon. Ces différents modèles sont réalisés avec des animaux (Souris) sauvages, transgéniques (Auto OGM), immunodéficients, voire humanisés (Nombre total d'animaux prévu pour les 5 ans : Environ 600 souris/an). Ces modèles sont utilisés depuis plusieurs années au sein du laboratoire, à l'origine validés par le comité d'éthique locale et ont bénéficiés au cours des années passées de nombreuses améliorations notamment en termes de technicité, visant à diminuer au maximum le nombre d'animaux et à remplacer par des méthodes alternatives (In vitro) certaines expérimentations. De même, la prise en compte et la limitation de la douleur sont des objectifs majeurs pour le bien-être de l'Animal (Respect des 3R).

3868. L'insuffisance rénale chronique (IRC) induit précocement des troubles du métabolisme phosphocalcique, qui sont responsables à long terme d'atteintes osseuses et de calcifications vasculaires, source d'une morbi-mortalité importante. La calcification vasculaire médiale dans l'urémie et son effet sur la fonction musculaire lisse ou endothéliale est mal connue. Il est donc nécessaire de développer des études expérimentales sur modèle animal, pour mieux comprendre ces mécanismes physiopathologiques chez les patients IRC.

Au cours de ce travail expérimental, nous voulons développer un modèle de rat rendu insuffisant rénal chronique avec des calcifications vasculaires médiales, par induction d'un régime alimentaire enrichi en adénine et phosphore. Nous nous baserons sur des modèles publiés et reconnus par les sociétés savantes.

Le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum tout en conservant un nombre suffisant pour pouvoir déterminer les meilleures conditions expérimentales. Ainsi 18 rats seront utilisés au total dont 8 animaux pour le groupe contrôle présentant une fonction rénale normale seront nourris avec un régime alimentaire standard et 10 animaux pour le modèle IRC induit par voie alimentaire enrichie en adénine (0,75%) et en phosphore (1,03%).

Un enrichissement de la cage d'hébergement sera effectué par l'ajout de frisettes de papier et/ou de nids végétaux. Les animaux seront sacrifiés après 8 semaines de régime alimentaire, par une injection intra-péritonéale d'une surdose de barbiturique afin de prélever des anneaux vasculaires aortiques et mettre en évidence une calcification médiale.

3869. La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la leucémie la plus commune dans le monde occidental et affecte principalement des patients âgés. La LLC est encore incurable sans la transplantation allogénique de cellules souches. Le développement de nouveaux traitements est donc nécessaire. Parmi ceux-ci, les peptides pénétrants (CPP) sont des molécules qui peuvent entrer dans les cellules sans causer de dommages de la membrane, ce qui conduit à leur utilisation proposée comme vecteurs de délivrance des produits thérapeutiques. L'utilisation de ces CPP est devenue l'une des techniques les plus efficaces pour parvenir à l'accès intracellulaire et compte tenu de leur faible taille, il présente une faible toxicité et un faible effet immunogène. Plusieurs peptides pénétrants qui atteignent le cytoplasme et le noyau ont déjà été identifiés. Parmi ceux-ci, deux CPP ont démontré une activité in vitro sur cellules tumorales de cancer du sein et de LLC et ont fait l'objet d'un dépôt de brevet. L'objectif de ce projet est donc d'évaluer in vivo l'activité de deux CPP thérapeutiques bi-fonctionnels qui ciblent spécifiquement les cellules tumorales dans un modèle de leucémie lymphoïde chronique humaine xénotreffée chez la souris SCID. Le nombre d'animaux utilisés sera de 48 souris SCID, réparties en 8 groupes de 6 souris afin d'avoir tous les contrôles nécessaires pour valider l'activité thérapeutique de ces CPP. L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, de réduction et de raffinement. En effet, les molécules ont été évaluées in vitro dans un premier temps, (principe de remplacement), le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction) et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux (principe de raffinement).

3870. La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est la plus fréquente des pathologies parmi les syndromes myéloprolifératifs. Elle affecte les cellules souches hématopoïétiques, ce qui induit une augmentation du nombre de monocytes sanguins (monocytose) et du nombre de blastes (cellules indifférenciées) dans le sang et la moelle osseuse hématopoïétique. Aujourd'hui, il est mis en évidence que les voies d'efflux du cholestérol dépendant de transporteurs de type ATP-Binding-Cassettes (ABC) sont diminuées dans des cellules tumorales hématopoïétiques posant la question de la pertinence physiologique de ces observations.

Dans ce contexte, nous avons identifié cinq nouvelles mutations somatiques au niveau de transporteurs ABC dans des tumeurs humaines de patients atteints de LMMC. C'est pourquoi nous souhaitons tester la relevance fonctionnelle de ces nouvelles mutations et comprendre les mécanismes moléculaires sous jacents en utilisant des modèles précliniques murins, dans le but d'apporter des outils diagnostiques et/ou thérapeutiques à cette maladie.

Pour cela, l'étude in vivo des mutations est nécessaire. Des souris sauvages ainsi que des modèles murins de LMMC à développement tardif (souris Mx1-Cre/Tet2fl/fl) ou précoce (souris Mx1-Cre/LSLKrasG12D) seront utilisés pour déterminer l'impact seul ou additif de ces nouvelles mutations identifiées (approche diagnostique).

Nous utiliserons également un modèle murin sur-exprimant l'apolipoprotéine A1 (ApoA1Tg), principale protéine constitutive de l'HDL-cholestérol qui permet d'étudier l'augmentation du HDL-cholestérol dans un contexte de LMMC (approche thérapeutique). Nous avons choisi le modèle murin car c'est un modèle standard, validé par la communauté scientifique pour l'investigation de manipulation génétique liée aux maladies cancéreuses. Les maladies cancéreuses sont des pathologies complexes impliquant de multiples voies métaboliques et physiologiques, qui ne peuvent donc pas être étudiées uniquement en utilisant une approche de culture cellulaire. L'utilisation de l'animal est incontournable pour rendre compte de cette complexité. En termes de réduction, nous avons calculé au plus juste le nombre d'animaux nécessaires pour chaque procédure expérimentale et choisi des méthodes statistiques adaptées afin de garantir la robustesse des résultats obtenus. Pour satisfaire au raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique, les personnes réalisant les différentes procédures respecteront les règles d'éthiques. De plus, l'induction du phénotype leucémique se fera durant une période bien définie permettant de contrôler finement l'évolution du phénotype par simple prise de sang afin de prévenir tout effet indésirable. Au total, dans ce projet, 504 souris seront nécessaires.

3871. Les lipopolysaccharides (LPS) représentent le composé principal de la membrane des bactéries gram négatives. Une augmentation de la concentration sérique de LPS a été démontrée chez les animaux obèses et diabétiques. Cette augmentation modérée de LPS contribue au développement de l'inflammation et des désordres métaboliques dans les tissus métaboliques comme le tissu adipeux. L'injection de LPS à des souris pendant une courte période entraîne le développement d'une inflammation au sein du tissu adipeux et des dysfonctionnements métaboliques. Grâce à des études réalisées en système cellulaire, nous avons identifié une protéine qui pourrait participer au développement de cette inflammation et des désordres métaboliques. Nous disposons des souris dépourvues de cette protéine et nous étudierons l'effet de l'injection de LPS sur le développement de l'inflammation et des désordres métaboliques dans le tissu adipeux des souris sauvages et des souris invalidées pour cette protéine. Pour satisfaire au remplacement, nous avons réalisé des études préliminaires sur des cellules cultivées in vitro. Pour comprendre l'implication de cette protéine chez l'Homme, il nous est maintenant nécessaire de l'étudier sur l'animal car il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de tenir compte de toute la complexité et de toutes les interactions existantes entre cellules et organes dans un organisme. Pour satisfaire à la réduction, les animaux contrôles Redd1+/- pourront être communs à différentes procédures et une gestion éthique de l'élevage nous permettra de ne pas générer trop d'animaux en excès. D'autre part, chaque procédure utilise un nombre d'animaux minimum mais nécessaire à des études statistiques pertinentes. Pour satisfaire au raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique, les personnes réalisant les différentes procédures respecteront les règles d'éthiques. Ce projet est constitué de 3 procédures qui découlent des résultats obtenus dans la première procédure et utilisera au total 339 souris mâles adultes.

3872. Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE), il est obligatoire de prouver l'efficacité de ces produits avant de proposer un produit sur le marché. Notre établissement est fortement engagé dans le développement de méthodes alternatives in vitro : tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent pas de tester intégralement l'efficacité des produits de santé, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'assurer des performances des produits de santé sur des modèles animaux, les rongeurs, les lagomorphes, les petits ruminants ou les porcins sont des modèles privilégiés étant données les similitudes reconnues avec l'organisme humain.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). Par an, jusqu'à 70 animaux peuvent être utilisés dans le cadre de ce projet.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les ruminants sont hébergés en groupes sociaux harmonieux et le plus souvent en extérieur (en dehors des périodes d'intervention et des périodes post-opératoires). Concernant les rongeurs, lagomorphes et porcins, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments. Des jouets sont disponibles pour les lagomorphes et porcins. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement. Un comité d'éthique et plusieurs vétérinaires sont intégrés aux équipes à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

3873. Les autorités de santé préconisent la démonstration de l'efficacité d'un vaccin ou d'une préparation d'anticorps dans des études précliniques d'infection post-chirurgie ou via un cathéter implanté, mimant des infections nosocomiales. La protection induite par de nouveaux candidats vaccins ou des anticorps doit être évaluée in vivo dans des modèles animaux naïfs ou pré-infectés, en particulier lorsque les corrélats de protection ne sont pas identifiés.

Le but de ce projet est d'évaluer le potentiel infectieux de germes pathogènes dans le modèle animal approprié afin d'évaluer la protection induite par des candidats vaccins ou des anticorps contre des infections post-chirurgie non létales induites par des virus, bactéries parasites ou mycoses. Les antigènes peuvent être des protéines, des polysaccharides, des acides nucléiques, des pathogènes (vivants atténués, inactivés) ou des antigènes de type " Virus Like Particles " .

Des critères de pathogénicité de l'agent infectieux tels que les symptômes cliniques généraux (fièvre, perte de poids ...) ou symptômes spécifiques du pathogène (lésions cutanées, lésions des muqueuses ...) et l'établissement des doses létales sont déterminés. Les objectifs sont multiples et permettent l'évaluation de:

r::>La protection induite par les candidats vaccins ou des anticorps

r::>La réponse immune induite post-infection par les antigènes vaccinaux

Si des animaux présentent une dégradation de leur état général ou des symptômes nécessitant l'euthanasie, celle-ci sera effectuée selon les méthodes réglementaires recommandées. Le degré de sévérité est considéré comme modéré. En fin de test, les animaux sont euthanasiés selon les méthodes recommandées par la réglementation, la structure chargée du bien-être animal et approuvées par le comité d'éthique. L'ensemble de ce projet peut nécessiter l'utilisation de 5 000 souris, 1 500 rats, 500 cobayes, 500 hamsters, 500 lapins et 200 mini-porcins sur une période de 5 ans (basée sur une évaluation des besoins actuels).

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement : A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives in vitro pour évaluer les capacités d'un vaccin, d'un anticorps à induire une protection contre une infection post-chirurgie à un pathogène ou pour évaluer les réponses immunitaires post-infection. Le recours à l'animal de laboratoire s'avère donc nécessaire.

Réduction: Chaque étude est revue par les biostatisticiens afin de définir le nombre minimum et suffisant d'animaux requis permettant une analyse statistique des résultats.

Raffinement : Lors d'une intervention chirurgicale, un analgésique (injectable ou voie orale) est administré aux animaux afin de diminuer la douleur post-opératoire. Des tapis chauffants pendant toute la chirurgie et des cages chauffantes (30°C) post-chirurgie peuvent être utilisées afin d'éviter l'hypothermie.

Une grille d'évaluation des signes cliniques post- chirurgie et post-infection est mise en place entre le responsable d'étude, les statisticiens et les vétérinaires. Cette grille permet d'évaluer le niveau de souffrance des animaux selon des critères cliniques spécifiques par un personnel dûment formé. Dès que le score atteint un seuil jugé critique, les animaux sont euthanasiés pour abrégier leur souffrance. Les animaux sont hébergés en groupe dans des locaux appropriés et dans des cages contenant des enrichissements conformément aux standards réglementaires.

3874. Le but de ce projet est d'évaluer dans le modèle animal approprié la protection induite par des candidats vaccins ou des anticorps contre des agents infectieux pathogènes (bactéries, virus ou parasites). Comme préconisé par les autorités de santé, la protection induite par de nouveaux candidats vaccins ou des anticorps doit être évaluée in vivo dans des modèles animaux naïfs ou pré-infectés, en particulier lorsque les corrélats de protection ne sont pas complètement identifiés, ce qui est souvent le cas pour de nouvelles cibles vaccinales. Des critères de pathogénicité de l'agent infectieux tels que les symptômes cliniques généraux (fièvre, perte de poids ...) ou symptômes spécifiques du pathogène (lésions cutanées, lésions des muqueuses ...) sont déterminés.

Les objectifs sont multiples et permettent l'évaluation de:

c:>La protection induite par les candidats vaccins ou des anticorps contre une infection.

c:>La réponse immunitaire induite post-infection par les antigènes vaccinaux.

Si des animaux présentent une dégradation de l'état général, des lésions ou des symptômes nécessitant l'euthanasie, celle-ci sera effectuée selon les méthodes réglementaires recommandées. Le degré de sévérité est considéré comme modéré à sévère.

En fin de test, les animaux sont euthanasiés selon les méthodes recommandées par la réglementation, la Structure Chargée du Bien-Etre Animal et approuvées par le Comité d'Ethique. L'ensemble de ce projet peut nécessiter l'utilisation de 35 000 souris, 1 500 rats, 1 500 cobayes, 3 000 hamsters, 500 lapins, 1000 furets et 200 mini-porcs sur une période de 5 ans (basée sur une évaluation des besoins actuels).

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement: A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives in vitro pour évaluer les capacités d'un vaccin, d'un anticorps à induire une protection contre une infection à un pathogène ou pour évaluer les réponses immunitaires post-infection. Le recours à l'animal de laboratoire s'avère donc nécessaire.

Réduction: Chaque étude est revue par les biostatisticiens afin de définir le nombre minimum et suffisant d'animaux requis permettant une analyse statistique des résultats.

Raffinement: En fonction des pathogènes, une grille d'évaluation des signes cliniques post-infection sera mise en place entre le responsable d'étude, les biostatisticiens et les vétérinaires cliniciens. Cette grille permet d'évaluer le niveau de souffrance des animaux selon des critères cliniques spécifiques du pathogène, par un personnel spécifiquement formé.

Dès que le score atteint un seuil jugé critique, les animaux sont euthanasiés avant la fin de l'étude pour abrégier leur souffrance. Les animaux sont hébergés en groupe dans des locaux appropriés et dans des cages contenant des enrichissements conformément aux standards réglementaires.

3875. Ce projet a pour objectif l'évaluation sur animaux de la toxicité non spécifique des vaccins, dérivés sanguins et sérums destinés à l'homme et de leurs composants. Ces tests de contrôle qualité sont requis pour la mise sur le marché de lots de vaccins conformes aux normes de sécurité suivant les critères définis par les exigences réglementaires. Les tests de toxicité non spécifique consistent à administrer un vaccin ou un de ses composants à des animaux et à les surveiller pendant la période nécessaire à la vérification de l'absence de toxicité. Les tests de toxicité non spécifique visent à détecter une réaction anormale, une erreur de dosage ou des traces d'une substance indésirable. Ces tests incluent également les essais de vérification d'absence d'activité biologique anormale et l'évaluation de la tolérance des composants. Ce projet représente l'ensemble des essais menés systématiquement sur les lots de produits fabriqués et composants. Les espèces employées sont la souris, le cobaye et le lapin.

Aucun signe clinique n'est attendu dans ces tests, toutefois, dans le cas où les animaux présenteraient une dégradation de l'état général, des lésions ou symptômes nécessitant l'euthanasie, celle-ci sera effectuée selon la méthode réglementaire recommandée. La prise en charge d'un animal ayant des signes cliniques de maladie est réalisée sous la responsabilité d'un vétérinaire. Le degré de sévérité est considéré comme léger à modéré pour les cobayes, léger à modéré pour les souris et modéré pour les lapins. Ce projet peut nécessiter l'utilisation de 22100 souris, 14500 cobayes et 30 lapins pour une durée de 5 ans.

Les bénéfices attendus de ce projet sont d'une part de contribuer à la libération de lots de produits fiables et conformes aux spécifications et aux textes de référence en vigueur et d'autre part, d'assurer le niveau de formation / qualification du personnel pour chacun de ces tests conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication.

En fin de test, l'ensemble des animaux utilisés est euthanasié selon les méthodes recommandées par la réglementation, par la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux et approuvées par le Comité d'Ethique.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement: Il n'existe pas de méthode de remplacement des tests de toxicité sur animaux.

Réduction: Le nombre d'animaux utilisés est calculé au plus juste de façon à répondre aux exigences réglementaires et aux besoins de tests sur la période. Le nombre d'animaux par groupe est défini par la réglementation et ne permet pas de réduire au-delà. Pour les pays européens ces tests ne sont réalisés que sur un nombre de lots définis et ne sont plus réalisés ensuite. Le même type de démarche est proposé aux autres pays.

Raffinement: Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des enrichissements dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé. En cas de signes cliniques, dans les meilleurs délais, les animaux bénéficient des soins vétérinaires ou sont euthanasiés selon des méthodes recommandées.

3876. Le but du projet est de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans un nouveau phénomène de régulation de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Ce phénomène concerne la mise en évidence d'une activité ARN polymérase-ARN dépendante (RdRp) cellulaire permettant d'amplifier des molécules d'ARN présentes dans l'œuf, au début du développement. Le phénomène sous-jacent pourrait être lié aux mécanismes d'ARN par l'interférence (RNAi) récemment identifiés dans certains modèles biologiques et correspondre à un processus très général, conservé au cours de l'évolution. Malgré la dimension apparemment universelle de

ce processus biologique, l'identité de l'enzyme à l'œuvre s'avère énigmatique. En particulier, l'utilisation de modèles et d'approches génétiques restent sans succès jusqu'à présent. Notre équipe fut la première à documenter la description de cette activité in vivo dans des œufs fécondés ou non d'amphibien (xénope et axolotl). Nos travaux les plus récents montrent qu'il est possible d'étudier cette activité in vitro à partir d'extraits d'œufs fécondés ou non d'amphibiens, et constitue la seule voie de recherche possible pour envisager une purification biochimique de l'activité (1) ; c'est l'une des raisons pour laquelle nous avons récemment mis au point un système in vitro afin de poursuivre l'étude de cette nouvelle activité enzymatique cellulaire. Cette approche biochimique nécessite de disposer d'extraits frais en volume relativement important, préparés à partir de pontes naturelles ou provoquées impliquant l'utilisation de 150 femelles et 50 mâles. Notre projet est tributaire d'un modèle amphibien (1). Nous avons fait le choix, pour les approches biochimique et biologique, d'utiliser uniquement le modèle axolotl (2). L'objectif principal de ce projet est de caractériser in vitro cette activité observée chez l'amphibien axolotl, au cours du développement embryonnaire précoce. Au-delà de l'enjeu pour notre compréhension des régulations post-transcriptionnelles, une meilleure compréhension de cette activité cellulaire d'amplification d'ARN (RdRp) pourrait déboucher sur des applications biotechnologiques et thérapeutiques.

Justification de l'application des 3R :

- 1) Actuellement pour ce projet, aucune solution alternative à l'utilisation d'amphibien n'est envisageable.
- 2) En utilisant uniquement l'axolotl en tant que modèle expérimental, notre projet réduit le nombre d'espèces animales impliquées dans la thématique à ce stade.
- 3) Durant les procédures de ce projet, un enrichissement de l'environnement des femelles est prévu, consistant à déposer des coupelles de verre au fond des bacs.

3877. Les formules des laits maternisés pour les nourrissons sont réalisées à partir de lait de vache pauvre en fibres, or le lait maternel humain est riche en fibres naturelles. Afin de proposer de nouvelles formules de lait maternisé proches de la composition du lait humain, un rajout de fibres naturelles est pertinent. Ces fibres procurent une santé digestive au nourrisson.

Ainsi, ce projet vise à tester un nouveau mélange de fibres naturelles qui sera introduit dans les laits de remplacement des nourrissons. Une première phase de test in vitro a démontré l'innocuité du produit testé. Afin de mettre en marché ce produit, il faut démontrer l'innocuité de ces fibres alimentaires naturelles sur un modèle animal proche de l'homme.

Lors de cette étude, nous alimenterons de jeunes porcelets pendant 24 à 27 jours en fonction des animaux avec une alimentation lactée supplémentée ou non avec le produit à tester. Le choix de ces animaux se justifie car ils présentent des similitudes avec le nourrisson: alimentation lactée, digestion, croissance.

Compte tenu des objectifs de l'étude et des contraintes expérimentales, nous avons pris toutes les mesures nécessaires pour respecter la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement). Le nombre d'animaux, le dispositif expérimental et bien sûr le nombre de paramètres évalués sont réfléchis dans l'objectif de réduire au minimum requis la douleur et surtout le nombre d'animaux tout en respectant les besoins statistiques de l'étude. Le nombre de porcelets incorporés dans cet essai sera de 48 (24 mâles et 24 femelles) répartis en quatre groupes intra sexe de 6 porcelets. Les 2 sexes se justifient par l'évaluation de l'innocuité sur les organes sexuels. Les 4 groupes sont justifiés par la comparaison d'un régime témoin à trois régimes supplémentés couvrant la plage d'utilisation du produit dans les formules infantiles. L'évaluation des effets du produit sera réalisée, après une période d'alimentation continue de 24 à 27 jours suivie par une mise à mort des animaux, par des paramètres sanguins, des prélèvements et des analyses d'organes et une mesure de la croissance et de la consommation de lait.

3878. Dans les cellules eucaryotes, l'ADN, support de l'information génétique au sein du noyau, est présent sous une forme structurée, la chromatine. C'est la chromatine, et non l'ADN seul, qui est impliquée dans tous les événements moléculaires faisant intervenir le matériel génétique, à savoir la réplication, la transcription, la réparation et la recombinaison. L'organisation de l'ADN en chromatine est donc essentielle et doit être préservée tout particulièrement au cours des divisions cellulaires. Essayer de comprendre la nature et la dynamique de cette organisation a amené à caractériser des facteurs essentiels à sa formation et à son maintien. Les premières "briques" de cette architecture particulière sont des petites protéines compactrices, les histones. Elles forment un cœur protéique autour duquel la molécule d'ADN s'enroule. Ce motif se répète pour former une structure qui ressemble à un collier de perles, la chromatine. Lors de chaque division cellulaire, la cellule fabrique une grande quantité d'histones pour reproduire la chromatine. Une question primordiale est de savoir comment ces histones sont choisies et prises en charge après leur production pour être escortées et délivrées au bon endroit, au bon moment pour construire une architecture spécifique et la reproduire. Des protéines spécialisées, appelées chaperons d'histones, protègent, surveillent et accompagnent les histones tout au long de leur vie. Un des rôles les mieux connus des chaperons d'histones est leur fonction dans l'assemblage de la chromatine.

Notre projet a pour objectif d'évaluer comment les réseaux des chaperons d'histones s'adaptent aux changements physiologique et développemental, entre plasticité et stabilité afin de maintenir l'intégrité de la chromatine. Nous étudierons l'impact de ces changements à l'échelle d'un organisme entier, la souris. Ces expériences nécessitent la génération de souris génétiquement modifiées pour certains chaperons d'histones, afin de comprendre l'importance de ces protéines dans un organisme vivant, dans un tissu donné et à un stade développemental spécifique. L'analyse de l'importance de ces chaperons d'histones est essentielle pour notre compréhension de leur rôle actuel dans un contexte physiologique.

Ce projet est en accord avec la règle des 3Rs:

- Remplacer: toutes les études pour comprendre la fonction des chaperons d'histones ont été basées sur des modèles in vitro ou cellulaires. L'étape suivante nécessite des expériences in vivo pour évaluer la pertinence physiologique de nos découvertes à l'échelle d'un organisme entier, ce qui ne peut pas être obtenu par des méthodes alternatives. La souris a été choisie pour son génome bien caractérisé et sa capacité à générer des souris génétiquement modifiées.
- Réduire: le nombre d'animaux est défini d'après les travaux de consortiums internationaux (IMPreSS), et s'élèvera à 254 animaux.
- Raffiner: les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux.

3879. La Métabolomique est l'étude de l'ensemble des métabolites (petites molécules) présent dans un organe, une cellule, un tissu, un organe ou un organisme, à un temps donné et dans des conditions données.

La Métabolomique permet d'identifier, voire de quantifier, des métabolites qui présentent un intérêt intrinsèque ou qui sont le reflet d'une activité biologique d'intérêt. Elle permet en outre une meilleure compréhension de la biologie des systèmes en mettant en évidence des interactions métaboliques qui n'auraient pu être détectées avec des approches biochimiques traditionnelles.

Ce projet a pour but d'utiliser cette approche analytique dans le cadre d'études pharmacologiques du fait de son application parfaitement adaptée à la compréhension de processus pathologiques et des modes d'actions de candidat-médicaments.

Ainsi, ce projet regroupe plusieurs procédures expérimentales permettant la collecte et l'identification de métabolites d'intérêt, dans le système nerveux central, les tissus et les fluides biologiques, associés à une pathologie et/ou à un traitement.

Les choix des techniques mises en oeuvre dans ce projet illustrent pleinement la prise en compte du principe des 3R :

-Les expérimentations par microdialyse décrites procèdent en la mise en place de cinétiques de collecte de métabolites sur un même animal. Celui-ci représentant son propre témoin, ces expérimentations permettent l'utilisation d'un seul lot d'animaux et donc la réduction de leur nombre.

-Les modèles expérimentaux utilisés permettent de refléter une activité biologique et de mimer les libérations de métabolites induites par un traitement dans un modèle d'interaction dynamique unique. Préalablement, parallèlement ou en substitution des investigations par des méthodes alternatives in vitro sont menées au laboratoire telles que la détection de métabolites produits dans les milieux de culture ou des cellules isolées ainsi que sur des prélèvements de fluides d'origine humaine.

-Toutes les étapes critiques susceptibles de générer de la douleur ont été considérées entraînant la mise en place de phases d'anesthésie et/ou d'analgésie ainsi que l'intégration à chaque procédure de critères d'arrêts anticipés. C'est pourquoi ce projet regroupe des procédures utilisant des modèles expérimentaux sous anesthésie continue et d'autres éveillés et totalement libres de leur mouvements.

Le projet permettra de recourir à environ 3500 rongeurs (souris, rats) sur 5 ans. Ce projet utilisera des modèles rongeurs génétiquement altérés ou pas qui développent des pathologies d'intérêt similaires à celles développées par l'Homme.

Le projet est mis en oeuvre par du personnel qualifié et habilité conformément à la réglementation en vigueur.

3880. L'objectif de la présente demande est d'obtenir des anticorps polyclonaux (AcP) et/ou monoclonaux (AcM) de haute affinité capables de lier une grande diversité d'épitopes de nature différente. Ces anticorps sont très majoritairement obtenus par l'immunisation d'un animal avec un antigène spécifique contre lequel le système immunitaire de l'animal va réagir comme moyen de défense.

Il a été observé que les anticorps produits par les lapins présentent généralement de hautes affinités pour l'antigène cible, grâce notamment à la mise en place de mécanismes propres à l'espèce, plus efficaces que chez les rongeurs. Ils présentent également une capacité de lier une très grande diversité d'épitopes. Ils constituent ainsi une classe de réactifs à très haute valeur ajoutée pour des applications en recherche et dans le domaine du diagnostic telles que la détection de petites molécules (haptènes) et molécules non protéiques ou la détection de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, etc.), par exemple.

Alors que le lapin reste l'espèce la plus couramment utilisée en laboratoire pour la production d'AcP, les demandes d'isolement d'AcM de lapins sont de plus en plus fréquentes. Cependant l'obtention de tels AcM s'est longtemps heurtée à un frein technologique, la technologie des hybridomes étant difficilement applicable à cette espèce. Nous avons développé une approche alternative passant par la construction et le criblage de banques de fragments d'anticorps présentés à la surface de phages (Phage display), qui sont dérivées de lapins immunisés. Aussi, nous souhaitons poursuivre le développement de notre plateforme d'immunisation de lapins à des fins de production d'AcP et d'AcM, selon les demandes de nos clients.

Ces expérimentations seront réalisées (1) de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, sans compromettre les projets, et (2) de s'assurer du bien être de ces animaux au sein de nos locaux. La capacité de notre zone d'accueil est de 24 animaux par tranche de 6 mois donc, compte tenu de ces paramètres, un total de 144 lapins au maximum pourra être utilisé sur une période de 59 mois.

3881. Problème majeur de santé publique avec 357 768 nouveaux cas estimés en 2010, les cancers sont devenus la première cause de mortalité en France et dans le monde (13% des décès). Pour comprendre le fonctionnement complexe de la cellule cancéreuse et faire ainsi progresser la prévention, le diagnostic et le traitement des cancers, il est indispensable de disposer de modèles intégrés animaux proche de l'Homme, permettant d'évaluer in vivo l'interaction de ces cellules avec leur environnement. Les souris représentent ainsi un modèle de choix pour les études menées en cancérologie.

Les cancers sont caractérisés par des altérations portant sur de nombreux gènes. Après une première étape d'analyse in vitro, le recours à la souris génétiquement modifiée permet de comprendre le rôle de ces gènes au niveau d'un organisme entier. Notre projet consiste à développer de nouvelles lignées murines pour permettre aux chercheurs d'avoir les outils les plus adaptés à leurs études. Bien évidemment, les lignées ne sont créées que si elles présentent un intérêt biologique potentiel et si elles n'existent pas par ailleurs dans d'autres établissements de recherche. Notre expertise nous permet d'avoir d'excellents résultats et donc de minimiser le nombre d'animaux nécessaires.

Nous prévoyons pour l'année à venir d'utiliser 2407 souris. Dans un souci de raffinement, toutes les mesures seront prises pour éviter le stress et la douleur des animaux. Ainsi, les gestes techniques sont assurés par du personnel qualifié, avec un recours à l'analgésie lors des procédures chirurgicales.

3882. La mise en oeuvre de pratiques expérimentales relevant de l'expérimentation animale fait partie intégrante de la formation de la spécialité Génie Biologique du Diplôme Universitaire de Technologie (DUT) dont le contenu est fixé au niveau national par le Programme Pédagogique National (PPN), publié par arrêté ministériel (arrêté du 3 août 2005). Ce programme a été entièrement revu en 2013 et mis en application en 2014. Dans ce contexte, le présent projet vise à pouvoir assurer dans son intégralité la formation de technicien supérieur en génie biologie. L'établissement demandeur propose cette formation depuis plus de 15 ans et les personnels impliqués se sont efforcés de le faire dans le respect des règles d'éthique relatives aux pratiques d'expérimentation animale. Les modèles rongeurs, rats et souris, sont utilisés dans le cadre des enseignements pratiques. Sur 5 années d'activité, nous utiliserons (en considérant un effectif maximal de 14 étudiants par groupe) 1300 rats et 240 souris. Ces effectifs pourront être revus à la baisse si le nombre d'étudiants devait être réduit. La prolongation de ces activités se fera dans le respect de la nouvelle réglementation liée à la transposition de la directive 2010/63/UE. L'équipe pédagogique propose ici des protocoles de travaux pratiques strictement conformes aux attentes liées à la formation et souligne son engagement dans la poursuite de l'amélioration de ses pratiques. Ainsi, différentes méthodes alternatives sont déjà développées en toxicologie et pharmacologie afin de Remplacer autant que possible l'utilisation des animaux par des cultures in vitro. Dans le même esprit, plusieurs séances d'apprentissage sont basées sur des méthodes in silico réalisées sur l'étudiant lui-même (EMG, ECG, pneumotachographie, ...) à partir d'un système numérique de traitement de données expérimentales (Système SIOPAC).

En complément, l'organisation en groupes ou binômes permettra de Réduire le nombre d'animaux nécessaires au travail d'apprentissage. Enfin, dans tous les cas, les protocoles d'anesthésie et d'euthanasie seront mis à jour et les plus performants seront appliqués (Raffiner).

3883. L'atrésie intestinale est une malformation congénitale du tube digestif qui se définit par une interruption de sa continuité. Elle concerne 4 naissances sur 10000 en France. Une intervention chirurgicale précoce est indispensable mais les suites opératoires sont grevées par des troubles digestifs pouvant nécessiter une longue hospitalisation ainsi qu'une morbidité élevée. Des anomalies de développement sur le segment digestif d'amont et d'aval sont à l'origine de ces troubles. Parmi elles, le retard de maturation du système nerveux digestif est fortement suspecté mais peu compris.

Actuellement, il n'existe aucune certitude concernant la physiopathologie de ces troubles. Les voies de recherche s'appuient sur des modèles expérimentaux animaux dont celui du rat. C'est sur ce dernier modèle que le projet actuel va étudier les différences d'expression des gènes par le dosage des ARN messagers sur les segments sains et pathologiques. Il s'agit d'une première étape qui permettra de cibler les anomalies du développement. Les étapes ultérieures consisteront à confirmer ces données par des études moléculaires afin de développer des outils diagnostiques et de proposer des thérapeutiques complémentaires chez l'homme.

Phase préliminaire: remise au point du modèle chirurgical chez le rat, déjà réalisé dans notre équipe il y'a quelques années. Cette première étape consiste à reproduire le modèle d'atrésie digestive par chirurgie sur la rate gestante. La ligature digestive fœtale au 17ème jour de gestation doit aboutir à une atrésie complète et isolée chez un fœtus vivant extrait par césarienne au 19ème ou 21ème jour.

Première étape : étude de la cinétique des marqueurs du développement du système nerveux entérique (SNE). Cette cinétique de référence consiste à définir préalablement l'évolution des marqueurs du SNE prélevés sur des intestins de fœtus témoins à 4 stades de développement différents : E15-E17-E19-E21, avec 3 échantillons pour chaque stade soit 12 échantillons au total.

Deuxième étape : mise à profit du modèle chirurgical pour l'étude. Réalisation d'une ligature digestive fœtale à E17 par une procédure chirurgicale. La deuxième étape consiste à prélever l'intestin fœtal à E19 ou E21. Pour chaque fœtus ligaturé, il y'aura un prélèvement de l'amont et un prélèvement de l'aval, avec un total de 12 échantillons intestinaux fœtaux.

Le nombre total de rates gestantes pour obtenir ces résultats sera réduit au maximum par des expérimentations séquentielles adaptées au besoin. Le nombre de fœtus disponible par rate gestante étant compris entre 4 et 12, le nombre de rates gestantes est de 8 pour la première étape et de 12 pour la deuxième, soit 20 rates gestantes pour la totalité de l'étude.

Finalité : extraction des ARN sur l'ensemble des échantillons. Extraction des ARN et vérification systématique de la qualité d'extraction.

Analyse quantitative des ARN messagers. Identification des ARN messagers spécifiques du SNE par une plateforme partenaire, analyse statistique pour obtenir des profils de maturation. Réalisation d'un profil type chez le fœtus normal entre E15 et E21. Comparaison des profils entre l'amont et l'aval de l'atrésie. Comparaison des profils de maturation entre l'intestin normal et l'intestin pathologique.

3884. Le foie joue un rôle majeur dans la prise en charge et l'élimination des médicaments et des contaminants environnementaux grâce en particuliers aux récepteurs nucléaires de classe II. Des données récentes montrent que deux récepteurs nucléaires en particuliers sont aussi impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique (stockage des lipides, du glucose). En effet, la fixation de xénobiotiques (molécules étrangère à l'organisme) sur ces récepteurs induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans les processus de détoxification et des modulations d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique. Ces récepteurs sont donc des cibles d'études intéressantes pour expliquer les perturbations métaboliques induites par les médicaments et les contaminants environnementaux. Dans le cadre de cette saisine, nous souhaitons étudier l'impact sur le métabolisme énergétique d'une activation de ces récepteurs nucléaires. Au cours des 5 prochaines années, nous prévoyons ainsi de mesurer les modulations au niveau du métabolisme énergétique induites par des ligands synthétiques et/ou naturels (pesticides, plastifiants...) de ces récepteurs sur 1040 souris dont des modèles transgéniques invalidés pour 2 récepteurs nucléaires particuliers. Pour être en accord avec la règle des 3Rs, les animaux ne sont utilisés que pour évaluer le rôle physiologique global de ces récepteurs nucléaires. Les études mécanistiques sont abordées in vitro sur modèles hépatocytaires. De plus le nombre d'animaux par lot est réduit au minimum requis pour des analyses statistiques fiables. Nous mesurerons l'impact toxicologique de ces ligands à des doses réglementaires, sub-réglementaire ou retrouver classiquement dans l'alimentation et toutes les mesures sont prises pour limiter l'inconfort des animaux au cours des expérimentations. Des analyses transcriptomiques, lipidomiques, biochimiques et métabolomiques seront réalisées sur des prélèvements post-mortem de différents tissus.

3885. La plasmaphérèse est une technique permettant de prélever du plasma de façon élective. C'est une technique actuellement utilisée lors des séances classiques de don du sang chez l'humain. Mieux tolérée chez le donneur que le prélèvement de sang total, elle évite d'avoir à séparer les éléments du sang (globules rouges, plaquettes et plasma) après la collecte.

Grace à la réalisation de plasmaphérèses chez le porc, ce projet vise la constitution d'une « banque de sang », sous forme de plasma lyophilisé dont la conservation s'étend sur plusieurs mois. Elle permettra d'initier des études sur le traitement du choc hémorragique et des troubles de la coagulation, pathologies mortelles courantes en traumatologie. De plus, cette préparation (plasmaphérèse, lyophilisation du plasma) étant identique à celle utilisée chez l'homme, elle permet de se rapprocher au mieux des conditions réelles rencontrées sur le terrain pour la réanimation des blessés.

Ce projet s'appuie sur une technique non invasive - prise de sang - réalisée sur le porc sédaté afin de lui éviter tout stress lors du prélèvement (raffinement). Afin de réduire le nombre d'animaux impliqués, les 50 sujets concernés par ce prélèvement sur 5 ans, seront réutilisés dans des procédures sans réveil.

3886. Au laboratoire nous étudions la formation des vaisseaux sanguins pathologiques dans les rétinopathies et la croissance tumorale afin de développer de nouvelles thérapies permettant de normaliser les vaisseaux pathologiques.

Dans ce projet nous allons analyser l'importance de la protéine vWF dans la formation des vaisseaux sanguins pathologiques à cours de deux modèles de pathologies humaines: 1) un modèle imitant la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA); et 2) la croissance des tumeurs de type mélanome. Le vWF est impliqué dans la régulation des molécules qui pourraient participer à chroniciser la DMLA et à la formation des métastases des nombreux cancers, en particulier du mélanome.

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une maladie de la rétine provoquée par une dégénérescence progressive de la macula, elle se caractérise, dans sa forme humide, par un remodelage vasculaire et l'apparition de néovaisseaux choroïdiens qui envahissent l'espace

sous-rétinien provoquant une baisse brutale de l'acuité visuelle. Le mélanome représente une minorité des cancers de la peau, mais c'est le plus grave d'entre eux. La croissance de mélanome et la formation des métastases nécessitent la formation des vaisseaux sanguins. L'étude du rôle de la protéine vWF et des mécanismes de la formation des vaisseaux pathologiques dans ces deux modèles de pathologie, permet de faire évoluer les connaissances et trouver des nouvelles thérapies plus adaptées. La formation des vaisseaux sanguins implique des phénomènes dynamiques qui ne peuvent être modélisés in vitro. Le nombre d'animaux utilisé dans ce projet sera réduit au minimum permettant d'avoir un (n) statistiquement significatif. Les souris seront hébergées dans un environnement enrichi (nids en cellulose, des bâtons à ronger, maisonnettes en carton). Dans ce projet nous avons prévu d'utiliser 156 souris.

3887. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie médicale très largement utilisée, qui permet sans effet secondaire connu de détecter avec une grande précision de nombreuses anomalies, notamment cérébrales. Pour que plus de détails soient visibles au niveau des vaisseaux perfusant une lésion, un produit augmentant le signal dans le sang (agent de contraste) est injecté. Actuellement, il s'agit de molécules à base de gadolinium (Gd), dont la toxicité chez certains patients a été récemment démontrée. Des chimistes ont conçu une structure (polymère) englobant un grand nombre de molécules de Gd, qui devrait permettre de réduire les quantités de Gd à injecter et la toxicité potentielle par rapport aux molécules de Gd utilisées actuellement. D'autre part, en couplant à ces structures une molécule biologique reconnaissant spécifiquement les cellules tumorales ou les foyers infectieux (ciblage), les polymères-Gd (PGd), pourraient permettre d'améliorer la précision diagnostique de l'IRM. Le Gd est également connu pour ses propriétés d'augmentation de l'effet de la radiothérapie (effet radiosensibilisant). Ainsi, en accumulant, grâce au ciblage, les PGd dans les lésions tumorales au moment de la radiothérapie, nous pourrions augmenter l'effet de la radiothérapie sur les tumeurs. Ceci nous permettrait d'améliorer le pronostic encore mauvais de certains cancers diffus ou agressifs, comme les cancers digestifs diffus à la cavité péritonéale ou au foie, de cancer de la peau (mélanome) ou de cancer cérébral (glioblastome). Pour pouvoir proposer ces nouvelles molécules comme agents de contraste chez l'homme et améliorer la prise en charge des maladies, des études in vivo, en utilisant des animaux sains ou présentant des pathologies proches de celles où ces nouveaux médicaments apparaissent particulièrement prometteurs sont indispensables (pas de remplacement possible par des études cellulaires). L'objectif général de ce projet est de démontrer que les polymères complexant le Gd (PGd) permettraient : i) de remplacer avantageusement les agents de contraste à base de Gd utilisés actuellement (risques toxiques diminués, informations plus précises et spécifiques pour l'identification des tumeurs ou des foyers infectieux) ; ii) d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie dans des cancers invasifs et/ou agressifs.

Pour les applications comme agent de contraste en IRM, qui ne seront injectés qu'une fois, cette preuve de concept peut être faite sur une seule espèce, murine.

Même en utilisant des appareils d'imagerie dédiés aux petits animaux, les souris sont trop petites pour donner une information analysable pour étudier la cinétique dans l'organisme des PGd, ce qui nécessite l'utilisation de rats. Les modèles de pathologies de dissémination de cancers digestifs et du cerveau (glioblastome) utilisés pour étudier l'efficacité diagnostique et thérapeutique, sont développés chez des rats. Des mesures de raffinement seront appliquées. Les animaux seront hébergés dans un milieu enrichi. Ils seront observés et surveillés quotidiennement afin de détecter rapidement tous signes de souffrance ou de douleur, qui, s'ils apparaissaient, enclencherait une prescription d'antalgiques. La persistance de douleurs malgré les antalgiques conduira à l'arrêt des protocoles. Pour se rapprocher au mieux de la pathologie humaine, cible de ces nouveaux médicaments diagnostiques, des lignées de tumeurs humaines pourront être utilisées, nécessitant d'utiliser des souris et rats immunodéprimés afin d'éviter un rejet des cellules humaines injectées et favoriser la croissance tumorale. Ces animaux seront hébergés dans un milieu protégé (armoire ventilée à filtre HEPA et dans des cages à couvercle filtrant), pour limiter le risque d'infection. Si les animaux présentaient une infection ou des signes de maladie sévère, le protocole serait arrêté en respectant des règles « humaines ». Les doses injectées de PGd seront calculées pour n'engendrer aucun effet toxique tout en permettant d'atteindre les objectifs scientifiques.

Ce projet nécessitera l'utilisation au maximum de 1669 souris et 2888 rats sur une période de 5 ans.

Le nombre estimé de souris ou rats est basé sur notre expérience et expertise dans l'élaboration de ce type d'étude. Le porteur de ce projet, diplômé en statistiques appliquées à la recherche médicale, a consulté un biostatisticien, avant et au cours de chaque procédure expérimentale pour s'assurer que le nombre d'animaux utilisés, est réduit au minimum nécessaire pour l'obtention des résultats.

3888. Nous avons montré que le stress de séparation maternelle (SSM) dans un modèle murin induit chez la descendance adulte âgée de 45 jours une réponse immunitaire exacerbée contre le microbiote intestinal. L'immunité et le métabolisme sont deux fonctions étroitement liées qui ont donné naissance à la notion d'«immuno-métabolisme» domaine de fort intérêt scientifique actuellement. Plusieurs désordres métaboliques tels que l'obésité et le diabète de type 2 sont non seulement associés à une inflammation systémique de bas grade mais aussi à une dysbiose du microbiote intestinal. Les troubles métaboliques sont un vrai problème de santé publique qui affecte un quart des adultes et plus d'un million d'enfants aux Etats Unis.

Chez les animaux âgés de 45 jours nous n'avons pas observé de troubles du métabolisme du glucose. Les défauts métaboliques apparaissent classiquement avec l'âge c'est pourquoi nous avons décidé de faire vieillir des animaux ayant ou non subi un SSM et d'étudier leur métabolisme du glucose afin de mettre en évidence un éventuel lien de cause à effet entre une inflammation de bas grade dirigée contre le microbiote intestinal chez le jeune adulte, la possibilité de développement des troubles du métabolisme du glucose et d'une dysbiose tardive. Le but de ce projet qui utilisera 1080 souris est d'analyser les conséquences à long terme d'un stress chronique en période périnatale sur l'«immuno-métabolisme» et la composition du microbiote de la souris adulte. Le nombre d'animaux prévus a été calculé au plus juste afin de permettre l'obtention de résultats statistiquement fiables et exploitables avec le moins d'animaux possibles et en leur assurant les meilleures conditions d'hébergement dans le respect de la règle des 3R.

3889. L'implant cochléaire est un dispositif implanté chez le sujet humain atteint de surdité profonde lorsque les aides auditives classiques (dites « contours d'oreilles ») ne peuvent plus améliorer l'audition. Initialement, l'implant cochléaire a été préconisé pour des sujets non-âgés devenant sourds à l'âge adulte. Actuellement, de plus en plus d'implantation se font chez le sujet âgé (<70ans) mais aussi chez le jeune enfant atteint de surdité congénitale. La population de sujets porteurs d'implants est donc en croissance exponentielle; on l'estime actuellement à plus de 324 000 dans le monde et le million sera atteint d'ici 1-2 ans.

La première étape du fonctionnement d'un implant cochléaire consiste à découper les sons en bandes de fréquences depuis les basses fréquences (1-100Hz) jusqu'aux hautes fréquences (15-20kHz). Cette opération est appelée « vocoding ». L'énergie dans ces différentes bandes de fréquences va ensuite activer des électrodes afin de stimuler différentes fibres du nerf auditif codant pour des fréquences basses ou élevées. De nombreux travaux de psychoacoustique et d'imagerie cérébrale tentent de déterminer le nombre de bandes de fréquences, et donc d'électrodes, optimum pour reconnaître les stimuli sonores de l'environnement mais aucun travail d'électrophysiologie n'a cherché à comprendre comment les neurones du cortex auditif réagissent à des stimuli naturels découpés en bandes de fréquences. C'est l'objectif de ce projet : sur la base d'enregistrements de neurones dans le cortex auditif, nous chercherons à déterminer le nombre optimum de canaux fréquentiels permettant d'observer des réponses le plus similaires possible à celles obtenues sans « vocoding ». Nous présentons des vocalisations conspécifiques émises par différents animaux (8 versions d'un cri d'alerte, le « Whistle ») et comparerons la capacité de discrimination des neurones à des versions normales ou « vocodées » de ces vocalisations. 90 cobayes seront utilisés répartis en 3 groupes d'âge (30/age) qui sont hébergés dans une animalerie dédiée où l'environnement est particulièrement enrichi. Les animaux sont 4 par cage, disposent de huttes et de boules à foin et, en plus de leur nourriture habituelle, ils reçoivent des légumes frais au moins une fois par semaine. Le projet a été conçu pour obtenir des statistiques fiables à partir du nombre le plus faible possible d'animaux. L'étude sera menée sous anesthésie profonde afin d'éviter tout stress des animaux. Des analgésiques locaux et un antalgique systémique seront donnés pour réduire au maximum les douleurs potentielles lors des enregistrements électrophysiologiques.

3890. Il est couramment admis que l'exposition prolongée à des environnements bruyants (transports, bruits d'usine, discothèques) provoque des effets délétères sur l'audition. Cependant, les études épidémiologiques n'ont pas confirmé cette hypothèse. Est-il possible que des altérations soient déjà visibles chez de jeunes adultes et conduisent à des pertes auditives aggravées au cours du vieillissement ? Il est nécessaire d'approfondir ce problème de santé publique à l'aide de modèles animaux, puisque des études sur le système auditif ne peuvent pas être conduites « in vitro ».

Nous proposons d'élever de jeunes animaux adultes (100 rats Sprague Dawley) dans un environnement soumis à des bruits 8h/jours aux seuils réglementaires (80 dB(A) en milieu professionnel). Les animaux seront hébergés à raison de 4 par cage dans des conditions enrichies par l'ajout de coton et papier pour réaliser des nids et de petits morceaux de bois à ronger. Après différentes durées d'exposition (3/6/12/18 mois), des seuils auditifs seront estimés à partir de l'activité du tronc cérébral auditif et des enregistrements électrophysiologiques dans le cortex auditif permettront de suivre l'évolution des réponses neuronales à des vocalisations conspécifiques et hétérospécifiques. Les enregistrements électrophysiologiques seront faites sous anesthésie profonde. Des analgésiques locaux et un antalgique systémique seront donnés pour réduire au maximum les douleurs potentielles des animaux. Des études comportementales évalueront aussi la sensibilité des animaux à l'enveloppe temporelle des vocalisations. Le stress éventuel des animaux sera mesuré par le taux de corticostérone détecté dans les fèces. Enfin, des études histologiques permettront de confirmer les bases physiologiques des hypothèses avancées dans la littérature. Ce programme pluridisciplinaire ambitieux propose pour la première fois de suivre sur toute une vie d'adulte les dégradations et modifications éventuelles du traitement auditif, après exposition prolongée à un environnement bruyant non traumatique et légal, au niveau du tronc cérébral et du cortex et de recueillir des indices comportementaux. Grâce à la maîtrise technique des expérimentateurs, toutes les analyses peuvent être réalisées chez un même animal, ce qui réduit considérablement la quantité d'animaux (100) nécessaire au projet. Tout ce projet a été conçu pour obtenir des statistiques fiables à partir du nombre le plus faible possible d'animaux. En matière de santé publique, tout effet délétère de l'exposition prolongée à un environnement bruyant sera susceptible de remettre en cause les seuils légaux Européens en matière d'exposition au bruit en milieu professionnel et urbain.

3891. La surdité est un handicap sensoriel encore insuffisamment corrigé en France, avec un retentissement social non négligeable. Plus de 5% de la population mondiale, soit 360 millions de personnes, souffre de surdité. Dans ce projet, nous nous intéresserons au traitement de la surdité de perception due à une atteinte de la cochlée (oreille 1 interne). à travers une approche thérapeutique consistant à administrer un anti-inflammatoire (corticoïde) par voie locale, grâce à un gel innovant.

Le développement de traitements locaux, pour soigner les maladies de l'oreille interne, est en plein essor, en alternative aux traitements par voie générale responsables d'effets secondaires du fait de la nécessité d'administrer de fortes doses de principe actif pour avoir une efficacité. Cette voie locale consiste à déposer le médicament dans l'oreille moyenne au contact de la fenêtre ronde qui est l'interface avec l'oreille interne. La molécule active peut alors diffuser dans l'oreille interne. A ce jour, peu de formes pharmaceutiques ont été développées spécifiquement pour cette voie d'administration. Dans ce travail, nous proposons un médicament innovant constitué d'un gel d'acide hyaluronique contenant des vésicules lipidiques appelées liposomes renfermant un anti-inflammatoire (corticoïde). L'acide hyaluronique devrait assurer une adhérence prolongée dans l'oreille moyenne grâce à son pouvoir adhésif ; les liposomes devraient agir comme un réservoir de corticoïde pour une libération prolongée dans le temps, ce qui devrait limiter le nombre d'administrations et améliorer ainsi le confort du patient. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'efficacité thérapeutique de ce médicament pour le traitement de la perte auditive liée au bruit chez le cobaye. Ainsi, nous avons retenu 14 cobayes pour garantir la validité statistique de l'étude. Un modèle animal est utilisé car une étude de l'audition est nécessaire pour tester ces deux approches thérapeutiques. A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour l'étude de l'audition. Les procédures expérimentales ont été conçues de sorte à supprimer toute souffrance psychique et/ou physique des cobayes.

3892. La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie due à une délétion dans le gène DMD codant la dystrophine. L'absence de dystrophine engendre une fragilité/instabilité membranaire aboutissant à la dégénérescence puis à une nécrose des fibres. Cette maladie touche 1 garçon/3500. Elle se manifeste par une dégénérescence musculaire progressive et sévère ce qui entraîne la perte de la marche ainsi que des symptômes cardiaques aboutissant à un décès vers l'âge de trente ans. Une des stratégies de thérapie génique utilise des constructions codant des micro-dystrophines (dystrophine de taille réduite). Ces micro-dystrophines ont été créées pour coder une protéine tronquée fonctionnelle. Des études ont montré le fort pouvoir de régénérescence de ces microdystrophines (cMd1 et cMd2 différant de leur domaine C-Terminal) dans le modèle dmd murin. Notre projet consiste à étudier de nouvelles microdystrophines optimisées contenant des régions supplémentaires afin d'apporter certaines fonctions nécessaires de la dystrophine.

Dans cette étude 8 nouvelles constructions ont été réalisées à partir de cMd1 et cMd2 afin d'optimiser leur efficacité. Dans notre projet, nous utiliserons un virus associé à l'adénovirus recombinant (rAAV) comme vecteur pour ces molécules. Les rAAV sont non répliquatifs et n'ont pas la capacité de s'intégrer dans le génome de l'organisme hôte. Mais ils peuvent persister une longue période dans

les souris hôtes. Nous avons dans un premier temps testé in vitro ces microdystrophines dans des myoblastes humains différenciés afin de vérifier l'expression de celles-ci. L'ensemble des microdystrophines s'expriment dans ces cellules (présence d'ARN et de protéines). Cependant, il est important de tester les molécules dans un contexte plus naturel. Une cellule étudiée in vitro ne réagira pas au traitement de la même façon que dans son environnement naturel, c'est-à-dire dans un organisme entier, in vivo.

Il existe un modèle murin mutant naturellement dystrophique, appelé souris mdx. Ce modèle permettra d'étudier in vivo et ex vivo, l'expression et les fonctions de nos molécules d'intérêt. Pour cela nous utiliserons 9 souris mâles non mutantes C57BL/10 et 97 souris mâles mdx âgées de 1 à 2 mois dans lesquelles nous injecterons ou non une microdystrophine.

Pour l'étude in vivo, nous analyserons l'effet des microdystrophines à court terme (4 semaines après traitement) et à long terme (15 semaines après traitement) après injection intramusculaire dans les tibialis anterior. Pour chacune des analyses nous utiliserons : 4 souris sauvages C57BL/10 comme contrôles positifs, 4 souris mutantes mdx comme contrôles négatifs, 4 souris mutantes mdx par microdystrophines soit 40 souris (4 souris x 10 microdystrophines testées). Un lot de 4 souris par condition est le minimum requis pour tester statistiquement nos résultats.

Pour l'étude des microdystrophines possédant le site de fixation de Par1b, il est préférable d'ajouter une étude ex vivo sur les fibres des flexor digitorum brevis, afin de visualiser l'effet bénéfique de Par1b sur le réseau de microtubules. Nous utiliserons, pour cela, 1 souris sauvage C57BL/10 comme contrôle positif, 1 souris mutante mdx comme contrôle négatif et 1 souris/microdystrophines testées (1 souris x 8 microdystrophines testées) soit 8 souris mdx traitées. Afin de réduire le nombre de souris nécessaire tout en obtenant le nombre suffisant de fibres pour cette expérience, nous utiliserons des souris âgées de 4 semaines.

Dans ce projet nous avons pris en compte l'application des 3R (Remplacer, réduire et raffiner). En effet, nous avons d'abord analysé l'efficacité de l'expression des microdystrophines sur des cellules musculaires immortalisées humaines. Nos molécules ont été exprimées dans ces cellules. Nous souhaitons donc les analyser dans un organisme entier, un modèle murin naturellement mutant pour le gène dmd, appelé mdx (phénotype non dommageable). Dans le but d'obtenir des résultats statistiques tout en limitant le nombre de souris, nous utiliserons en tout 4 souris par lots. De même afin de limiter les souffrances de l'animal, les injections seront effectuées sous anesthésie générale et toutes manifestations de souffrances (difficulté de déplacement, recroquevillement, perte de poids, etc...) conduiront à une euthanasie par dislocation cervicale.

Les conditions d'hébergement et l'enrichissement du milieu sont gérés par l'animalerie. Elles consistent en un contrôle quotidien des cages, un changement régulier, une gestion pour un nombre réduit d'animaux par cage (5 maximum). Le changement des cages se fait sous hotte aspirante et les cages possèdent des filtres. L'enrichissement du milieu peut consister en l'ajout de laine de bois afin que les souris puissent faire un nid.

3893. L'équipe cherche à connaître les mécanismes de contrôle des fonctions intestinales qui se trouvent dérégulées lors de pathologies métaboliques comme l'obésité et le diabète.

Ce projet porte sur l'absorption intestinale des sucres alimentaires. Il s'agit d'une fonction vitale. GLUT2, l'un des transporteurs de sucres qui transporte le glucose, le fructose et le galactose dans les cellules intestinales puis dans le sang circulant pour nourrir les autres organes, possède des propriétés particulières par rapport aux autres transporteurs. Grâce à deux modèles de souris génétiquement dépourvues de GLUT2 dans l'intestin, nous cherchons le rôle de GLUT2 dans l'absorption intestinale des sucres, dans le contrôle de la glycémie et la production d'hormones intestinales. Pour cela, nous voulons établir des modèles de souris n'exprimant plus le transporteur de glucose GLUT2 soit dans l'ensemble de l'épithélium intestinal soit spécifiquement dans les cellules entéroendocrines.

Les protocoles mis en œuvre utiliseront 360 souris au total. Il s'agit de souris C57BL/6 issus de modèles transgéniques. Les expériences sont conçues de façon à comparer le plus possible les conditions entre elles afin de limiter le nombre d'animaux contrôles à utiliser. Le bien-être des animaux est suivi quotidiennement par les expérimentateurs. Des points limites ont été définis. Le raffinement réside dans le fait de concevoir les expériences en limitant au maximum l'utilisation de groupes contrôles sur-numéraires. Les animaux sont élevés dans notre centre d'explorations fonctionnelles. Le nombre d'animaux par cage est limité et chaque cage contient des objets d'enrichissements (coton et objet permettant l'escalade et la cache). L'ensemble de ce projet nous permettra d'évaluer le rôle de GLUT2 dans l'intestin dans un contexte de régime alimentaire maintenant une bonne santé métabolique versus un régime générant une obésité et/ou un diabète. Il permettra de mieux comprendre le rôle de GLUT2 dans l'apparition des maladies métaboliques et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

3894. *Toxoplasma gondii* est un parasite protozoaire ubiquitaire capable d'infecter un large éventail d'hôtes à sang chaud, y compris l'Homme. Les oocystes de *T. gondii* peuvent persister et rester infectieux dans l'environnement pendant des années. Malgré l'importance des oocystes de *T. gondii* comme une source majeure d'infection, les études qui se concentrent sur la transmission, la distribution dans l'environnement, et la résistance à l'inactivation sont extrêmement limitées.

Un obstacle majeur à la réalisation d'études avec des oocystes de *T. gondii* est la difficulté de produire un grand nombre d'oocystes. De plus, le stade oocyste de *T. gondii* ne peut pas être reproduit in vitro par culture cellulaire, il y a donc obligation d'utiliser l'hôte définitif : les félinés. La production d'oocystes nécessite l'infection orale de l'hôte définitif (féliné) avec un nombre suffisant d'organismes de *T. gondii*, afin d'obtenir une excrétion d'oocystes dans les selles pendant 3 à 15 jours après l'infection.

Nous réalisons ainsi expérimentalement ce qui se passe naturellement : c'est le cycle naturel de la toxoplasmose reproduit en animalerie.

Cette méthode permet d'obtenir un grand nombre d'oocystes (plusieurs millions d'oocystes par chat). *T. gondii* est un parasite commun du chat. Le chat ne ressent aucune douleur, innocuité de l'infestation par *Toxoplasma* pour le chat.

La contamination du chat ayant eu lieu en animalerie, l'excrétion des oocystes se fait pendant la stabulation entre J4 et J15. A la fin de l'expérimentation, le chat est séropositif pour la toxoplasmose et il n'y a aucun risque de contamination humaine puisqu'il ne ré-excrète pas ensuite d'oocystes.

Avant la sortie du chat, on s'assure qu'il n'y a plus d'excrétion d'oocystes dans ses fèces (analyses parasitologiques directes), le chat bénéficie d'une visite vétérinaire de sortie avec une sérologie de contrôle chez le chat, s'assurant de son statut immunisé. Une visite quotidienne de l'animal par le personnel du laboratoire et/ou des animaliers est prévue.

Un nombre de 5 chats maximum est prévu sur les 5 ans de durée du projet.

3895. L'objectif de notre projet est de pouvoir explorer, chez une même espèce animale, de façon non invasive, le vieillissement, normal ou pathologique des fonctions corticales. Nous réaliserons, chez les mêmes animaux, au cours de leur vie deux approches méthodologiques : 1) l'imagerie cérébrale pour appréhender la présence et l'évolution de la distribution de marqueurs du métabolisme, de l'inflammation et

de pathologies neurodégénératives (en particulier la maladie d'Alzheimer) et 2) la mesure des aptitudes cognitives. En parallèle des prélèvements sanguins et de fèces permettront d'évaluer des paramètres biochimiques et hématologiques du sang et du microbiote intestinal, respectivement. L'ensemble de ces données sera analysé selon une méthode conjointe, non supervisée (fusion multimodale), afin de modéliser l'âge d'apparition et la durée du vieillissement pathologique.

Le marmouset représente un bon modèle pour de telles études, pour les avantages suivants : durée de vie compatible avec des analyses longitudinales, accès à un nombre d'animaux raisonnable tous élevés dans les mêmes conditions environnementales, sociales et de régime alimentaires, possibilité d'interaction avec des écrans d'ordinateurs pour réaliser des tâches cognitives.

Le singe macaque est le modèle de primate non-humain le plus courant pour les études associant approches cognitives et imagerie cérébrale. Leur durée de vie (> 30 ans) peut limiter la disponibilité en nombre d'animaux âgés. La durée de vie du marmouset *Callithrix jacchus* est bien plus courte (~10 ans), ce qui le rend susceptible de présenter des déficits cognitifs à un âge plus jeune (environ 7 ans). Parmi ces déficits, nous nous attacherons au déclin cognitif précoce qui peut simuler le 'mild cognitive impairment' qui décrit chez l'humain l'état transitoire entre un vieillissement normal et la maladie d'Alzheimer. Il est révélé par une batterie de tâches diagnostiques testant l'attention, les fonctions visuo-spatiales, la mémoire de travail et les fonctions exécutives, et est enregistré chez des patients présentant un risque statistique élevé de développer la maladie.

Nous analyserons donc les performances dans les tâches destinées à révéler les déficits dans les fonctions exécutives liés à l'âge et chercherons la relation de ces déficits avec les altérations anatomo-fonctionnelles révélées par imagerie cérébrale (moléculaire et structurale). Les études comportementales seront réalisées en conditions semi-naturelles (animaux libres dans leur cage d'élevage) offrant l'opportunité de tester l'influence des interactions sociales sur les fonctions exécutives. Chez l'humain, des modèles de l'évolution de biomarqueurs en fonction de la progression de la maladie ont été proposés mais nécessitent une validation expérimentale longitudinale. Nous testerons une large gamme de biomarqueurs et de paramètres anatomiques utilisés en clinique ou en phase de développement : (1) présence et quantification du peptide amyloïde, (2) présence et quantification de tauopathies, (3) métabolisme du glucose (4) neuroinflammation (5) neurotoxicité (6) perfusion cérébrale (7) morphométrie de structures et vascularisation cérébrales et cartes de myéline. L'ensemble du projet sera conduit avec 50 animaux.

Application de la Règle des 3R au projet :

1. Le nombre nécessaire et suffisant d'animaux a été établi lors de la conception du protocole expérimental par une approche méthodologique/statistique. Les mêmes animaux contribuent à plusieurs approches (comportement, imagerie, prélèvements biologiques).
2. Les interventions sur l'animal sont réduites au minimum (anesthésie par injection intramusculaire), toutes les approches étant non invasives (sauf une approche post mortem). Les procédures sont réalisées avec des animaux qui restent en contact (au moins visuel et auditif) avec leurs congénères. Les durées de séparation (contact physique) sont limitées. Les procédures ne génèrent pas de frustration par des renforcements négatifs (comportement) ni de douleur (imagerie).

Les privations alimentaires ne sont appliquées qu'en prévision d'une anesthésie (mise à jeun).

Les anesthésies sont surveillées (monitoring)

Le bien-être des animaux est suivi : courbe de poids, suivi de comportement de base, surveillance des interactions entre les animaux et de leur état physique par le personnel zootechnique.

3. Les résultats obtenus à partir des différentes procédures seront analysés séparément mais également fusionnés. Des corrélations seront recherchées entre des anomalies anatomo-fonctionnelles et des déficits cognitifs au sein des différents groupes d'âge afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques et neurodégénératifs liés à l'âge. Afin de considérer tous les âges possibles, et non seulement les groupes d'âge, la méthode sera étendue à un modèle linéaire généralisé, ce qui permettra une interpolation des résultats à une large gamme d'âges. Il sera ainsi possible de détecter des âges auxquels des modifications liées au vieillissement normal ou pathologique sont attendues, sans nécessiter une approche expérimentale supplémentaire.

3896. La maladie de Parkinson (MP) est due à la perte progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire (SN), qui résulte d'une cascade multifactorielle d'événements pathogéniques encore partiellement élucidés. Les acteurs majeurs impliqués dans ces processus sont supposés être le dysfonctionnement des mitochondries et le stress oxydatif. Un dysfonctionnement des transporteurs des acides-aminés excitateurs (EAATs), qui jouent un rôle crucial dans la prévention de l'excitotoxicité et le maintien des taux de glutathion (le majeur antioxydant dans le cerveau), semble aussi être impliqué. Dans ce contexte, nous avons montré que le blocage aigu des EAATs par le L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC, injecté dans la SN chez le rat), un inhibiteur-substrat des EAATs, déclenche une perte progressive des neurones dopaminergiques de la SN ainsi que plusieurs processus neuropathologiques relevant à la MP.

Il reste cependant plusieurs aspects à caractériser dans modèle, en particulier :

1. Des données préliminaires semblent indiquer qu'une hyperactivité du noyau subthalamique (NST) serait impliquée dans le processus neurodégénératif et/ou dans la bilatéralisation de la perte neuronale. Il serait donc intéressant de mieux caractériser le rôle du NST dans ce contexte, en vue aussi de son implication à la fois dans les symptômes de la MP et des thérapies antiparkinsoniennes.
2. Il semble nécessaire de mettre en évidence d'autres mécanismes qui pourraient être impliqués dans la neuropathologie de ce modèle de MP, notamment ceux qui sont à l'origine de la perte neuronale initiale. Par exemple, quel est le rôle du glutamate ? Pourquoi les neurones GABAergiques ne sont pas affectés par le PDC ? Est-ce que d'autres modulateurs des EAATs exercent les mêmes effets ?

Ce modèle est le seul à produire la plupart des processus neuropathologiques de la MP et à montrer une perte des neurones dopaminergiques progressive. En plus, il est efficace et facilement réalisable chez le rat, et des données préliminaires montrent la faisabilité chez la souris. Tout cela le rend extrêmement intéressant et avantageux pour étudier des possibles traitements neuroprotecteurs qui pourraient réduire, voir inverser, la neurodégénérescence et les phénomènes pathologiques associés.

Ce modèle est aussi adapté à tester l'effet de traitements classiques de la MP, comme la stimulation cérébrale profonde (DBS), afin d'évaluer, par exemple, leur potentiel disease-modifying qui est suggéré par la littérature récente.

Dans le respect de la règle des « 3Rs » (Réduction, Raffinement, Remplacement), les expériences seront effectuées afin d'optimiser le nombre d'échantillons et donc de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés. Entre les groupes contrôle, PDC, et PDC ayant subi d'autres traitements tels que la DBS, et considérant que pour obtenir des données statistiquement valides il nous faudra 6 à 10 individus par groupe, nous utiliserons un total de 90-100 rats et 80-90 souris.

3897. L'apparition de métastases dans un cancer constitue un facteur fort de l'aggravation du pronostic pouvant conduire au décès du patient. La complexité de ce processus laisse penser que de multiples altérations génétiques sont nécessaires à son accomplissement. Si jusqu'à présent, le modèle 'Darwinien' reposant sur l'acquisition progressive de mutations génétiques prédominait pour expliquer

l'évolution tumorale, sa totale adéquation avec la biologie des métastases est aujourd'hui remise en question. De nouvelles théories ont donc émergé, parmi lesquelles la possibilité que les cellules cancéreuses puissent soudainement évoluer par transfert de matériel génétique suite à des évènements de fusion cellulaire.

L'idée selon laquelle la fusion cellulaire puisse être impliquée en cancérologie a été avancée il y a plus d'un siècle par Otto Aichel. Cette théorie qui proposait que la malignité puisse provenir de l'union entre deux cellules n'est pas encore formellement démontrée mais reste cependant toujours d'actualité. Il n'est pas rare en effet d'observer, dans les cancers et en particulier au sein de lésions pré-cancéreuses, des cellules anormales contenant deux jeux de chromosomes, qui pourraient d'une part être issues d'un tel processus, et d'autre part, favoriser l'instauration d'une instabilité génétique, reconnue comme caractéristique fondamentale de la cellule cancéreuse.

Les sarcomes à génétique complexe sont des tumeurs rares et agressives affectant le tissu extra-squelettique non-épithélial de l'organisme. Le rationnel qui nous a amené à proposer que la fusion cellulaire puisse participer à la progression tumorale des sarcomes à génétique complexe repose sur les propriétés biologiques de ces tumeurs que nous avons pu recueillir *in vitro* et sur nos données anatomopathologiques.

Ce projet est envisagé ici car il n'existe pas de modèles alternatifs *in vitro* ou *in silico*, qui nous permettraient de montrer dans des conditions les plus physiologiques possibles que la fusion de deux cellules puisse générer la formation de tumeurs et / ou favoriser la croissance tumorale. Nous prévoyons de réaliser à chaque point expérimental des analyses histologiques et moléculaires pour raffiner nos expériences. Afin de restreindre notre nombre d'animaux, chaque lot a été calculé au plus juste : 10 animaux mâles NGS (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) seront utilisés par lot. Les expérimentations seront répétées deux fois (N=2), de façon à pouvoir obtenir une différence de taille de 50% significative (écart-type de 50% / lot). Au total nous utiliserons donc 480 souris sur 5 ans.

3898. Ce projet vise à caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires qui contrôlent le développement des LAL/LL-T (Leucémie Aigüe Lymphoblastique/Lymphome Lymphoblastique T) et à évaluer l'efficacité de nouvelles thérapies anticancéreuses.

Les LAL/LL-T sont des cancers très agressifs dont les rechutes sont habituellement fatales justifiant la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. Les LAL/LL-T ne présentent pas d'anomalies génétiques spécifiques, mais sont caractérisées dans 85% des cas par une sur-activation de la voie de prolifération PI3K/Akt. Cette voie est régulée négativement par la protéine PTEN, un suppresseur de tumeurs. Les LAL/LL-T sont des pathologies très rares (125 nouveaux cas par an en France) de fréquences plus élevées chez les enfants de 2-5 ans. Il est donc très difficile d'obtenir du matériel humain. Une alternative est le modèle murin de lymphome T tPTEN^{-/-} (invalidation du gène PTEN dans les lymphocytes T). Ces souris déclarent un lymphome T, détectable dès 10 semaines et fatal après 15 semaines. La tumeur localisée au niveau du thymus, se traduit par un isolement de l'animal, un manque de soins et une gêne respiratoire due au développement de la tumeur dans la cage thoracique. Les mêmes signes cliniques se retrouvent chez les patients atteints de LAL/LL-T.

Les souris tPTEN^{-/-} nous permettent d'obtenir des tumeurs pour analyser *in vitro* les mécanismes moléculaires qui contrôlent la maladie mais également de réaliser des expériences précliniques *in vivo*. Nous avons identifié plusieurs gènes dont l'expression est augmentée dans les tumeurs tPTEN^{-/-} et nous retiendrons pour cette étude les gènes qui codent pour des protéines dont l'activité est pharmacologiquement bloquée.

Ainsi nous sélectionnerons d'abord *in vitro* sur des cultures cellulaires les inhibiteurs présentant la meilleure activité anti-proliférative. Puis nous effectuerons les tests précliniques *in vivo*. Nous testerons leur efficacité anti-tumorale dans des expériences de xéno-greffes sous-cutanées de cellules de tumeurs tPTEN^{-/-} exprimant la luciférase chez la souris immunodéficiente (Nude). Une sélection des molécules les plus efficaces dans ce modèle de xéno-greffes sera ensuite analysée dans des expériences de xéno-greffes de lignées leucémiques aigües humaines afin de vérifier que les effets anticancéreux se retrouvent sur des cellules humaines. Enfin l'efficacité de ces molécules sera évaluée *in vivo* dans des expériences de transfert de lymphome T murin dans des souris immunocompétentes C57BL6, système qui permet le développement de la tumeur en présence d'un système immunitaire fonctionnel. In fine, les molécules les plus efficaces dans les 3 systèmes *in vivo* seront testées *in vitro* sur quelques rares échantillons primaires issus de patients atteints de LAL-LL/T.

Il n'existe malheureusement aucun moyen de Remplacement pour la validation préclinique de nouvelles chimiothérapies, nous veillerons cependant à n'utiliser sur les souris que des molécules dont nous aurons validé l'effet anti-tumoral *in vitro*.

Réduction : pour les procédures 2 et 3, nous réaliserons les xéno-greffes sur les deux flancs soit deux prises tumorales par souris et une diminution du nombre de souris. Pour les souris tPTEN^{-/-} à phénotype dommageable, nous ne produirons que la quantité minimale de souris nécessaires à réaliser nos analyses moléculaire et cellulaire *in vitro* et à effectuer les expériences de transfert de pathologie.

3899. Le cerveau est un organe extraordinairement complexe qui se développe au début de la vie embryonnaire. Le développement du cerveau résulte de l'exécution de programmes génétiques et cellulaires finement régulés et est fortement influencé par des facteurs environnementaux. Des mutations génétiques ou des agressions de l'environnement telles que les infections, provoquent des modifications de ces programmes et peut conduire à des maladies mentales. L'inflammation dans le cerveau (appelée neuroinflammation) est l'une des caractéristiques partagées par différents troubles neurologiques du développement comme l'autisme ou qui se déclarent plus tardivement comme la dépression. Des études récentes montrent l'existence d'un axe de communication entre le cerveau et le système digestif à travers lequel la flore intestinale est capable de moduler l'inflammation et d'influencer le comportement. Ce projet explore l'hypothèse que nos bactéries intestinales peuvent déclencher la neuroinflammation, qui à son tour modifie le métabolisme et le comportement, et contribue finalement à la progression de maladies mentales. En utilisant des modèles animaux d'autisme (environnemental et génétique) et de dépression développés chez la souris, nous allons étudier les bactéries intestinales et identifier les métabolites microbiens dérégulés. Ceux-ci sont absorbés dans l'intestin et circulent dans le sang pour atteindre le cerveau. Pour réduire le nombre de composés testés *in vivo* chez la souris et donc le nombre d'animaux, le rôle pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire potentiel de ces métabolites sera étudié *in vitro* par criblage de leurs cibles pharmacologiques dans des lignées cellulaires. Cependant, l'absence de lignées cellulaires permettant d'approcher la complexité neuronale rendra l'utilisation d'animaux de laboratoire inévitable pour évaluer les capacités de ces molécules à moduler le métabolisme et l'inflammation au niveau de la barrière intestinale et du cerveau *in vivo*.

Nous testerons également les effets psychomodulateurs de certains métabolites bactériens en traitant des souris sauvages avec ces composés. Enfin, nous évaluerons les effets du régime alimentaire sur la composition de la flore intestinale.

Nous appliquerons la règle des 3 R :

Remplacer : Un pré-criblage des métabolites bactériens sera effectué dans des lignées cellulaires de manière à minimiser le nombre de métabolites à tester chez l'animal.

Raffiner : Nos conditions d'élevage impliquent : stabulation par 4-6 animaux, enrichissement du milieu, température et hygrométrie contrôlée et suivi quotidien des animaux. La majorité des procédures pourront générer un inconfort faible et de courte durée mais non

dommageable pour l'animal. Pour les procédures compromettant le bien-être de l'animal, un suivi sous forme de grille de score permettra de décider de l'euthanasie de l'animal avant que la souffrance soit trop intense.
Réduire : Nous utiliserons des tailles d'échantillon garantissant une puissance statistique suffisante. Nous utiliserons ainsi un total de 1363 animaux.

3900. Ce projet vise à caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires qui contrôlent le développement des LAL/LL-T (Leucémie Aigüe Lymphoblastique/Lymphome Lymphoblastique T) et à évaluer l'efficacité de nouvelles thérapies anticancéreuses.

Les LAL/LL-T sont des cancers très agressifs dont les rechutes sont habituellement fatales justifiant la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. Les LAL/LL-T ne présentent pas d'anomalies génétiques spécifiques, mais sont caractérisées dans 85% des cas par une sur-activation de la voie de prolifération PI3K/Akt. Cette voie est régulée négativement par la protéine PTEN, un suppresseur de tumeurs.

Les LAL/LL-T sont des pathologies très rares (125 nouveaux cas par an en France) de fréquences plus élevées chez les enfants de 2-5 ans. Il est donc très difficile d'obtenir du matériel humain. Une alternative est le modèle murin de lymphome T tPTEN^{-/-} (inactivation du gène PTEN dans les lymphocytes T). Ces souris déclarent un lymphome T, détectable dès 10 semaines et fatal après 15 semaines. La tumeur localisée au niveau du thymus, se traduit par un isolement de l'animal, un manque de soins et une gêne respiratoire due au développement de la tumeur dans la cage thoracique. Les mêmes signes cliniques se retrouvent chez les patients atteints de LAL/LL-T.

Les souris tPTEN^{-/-} nous permettent d'obtenir des tumeurs pour analyser in vitro les mécanismes moléculaires qui contrôlent la maladie mais également de réaliser des expériences précliniques in vivo. Nous avons identifié plusieurs gènes dont l'expression est augmentée dans les tumeurs tPTEN^{-/-} et nous retiendrons pour cette étude les gènes qui codent pour des protéines dont l'activité est pharmacologiquement blocable.

Ainsi nous sélectionnerons d'abord in vitro sur des cultures cellulaires les inhibiteurs présentant la meilleure activité anti-proliférative. Puis nous effectuerons les tests précliniques in vivo. Nous testerons leur efficacité anti-tumorale dans des expériences de xéno greffes sous-cutanées de cellules de tumeurs tPTEN^{-/-} exprimant la luciférase chez la souris immunodéficiente (Nude). Une sélection des molécules les plus efficaces dans ce modèle de xéno greffes sera ensuite analysée dans des expériences de xéno greffes de lignées leucémiques aigües humaines afin de vérifier que les effets anticancéreux se retrouvent sur des cellules humaines. Enfin l'efficacité de ces molécules sera évaluée in vivo dans des expériences de transfert de lymphome T murin dans des souris immunocompétentes C57BL6, système qui permet le développement de la tumeur en présence d'un système immunitaire fonctionnel. In fine, les molécules les plus efficaces dans les 3 systèmes in vivo seront testées in vitro sur quelques rares échantillons primaires issus de patients atteints de LAL-LL/T.

Il n'existe malheureusement aucun moyen de Remplacement pour la validation préclinique de nouvelles chimiothérapies, nous veillerons cependant à n'utiliser sur les souris que des molécules dont nous aurons validé l'effet anti-tumoral in vitro.

Réduction : pour les procédures 2 et 3, nous réaliserons les xéno greffes sur les deux flancs soit deux prises tumorales par souris et une diminution du nombre de souris.

Pour les souris tPTEN^{-/-} à phénotype dommageable, nous ne produirons que la quantité minimale de souris nécessaires à réaliser nos analyses moléculaire et cellulaire in vitro et à effectuer les expériences de transfert de pathologie.

Raffinement : les animaux sont hébergés en groupe dans des cages ventilées dans un milieu enrichi. Un suivi journalier permet de détecter tout signe de souffrance et la prise immédiate de mesures adaptées.

Ce projet prévoit d'utiliser au maximum* 1850 souris commerciales (1050 souris Nude et 800 souris C57BL6) et la production de 75 souris tPTEN^{-/-}.

*en fonction de nos résultats certaines molécules pourront être abandonnées et donc le nombre de souris utilisé sera diminué.