



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

Résumés non techniques des projets autorisés (50)

5001 La production d'anticorps polyclonaux est un projet d'immunisation consistant à la production d'un nouvel anticorps grâce à l'utilisation de peptides innovants. Les anticorps produits seront utilisés notamment en recherche, en médecine, pour la réalisation de test de diagnostic...

La production d'anticorps polyclonaux consiste à produire des anticorps par injection à un animal d'un antigène cible, associé le plus souvent à un adjuvant dans le but d'amplifier la réponse immunitaire. Des injections de rappels de l'antigène peuvent avoir lieu pour obtenir une réponse humorale plus importante.

Suite aux administrations, des réactions locales (gonflement, abcès...) et générales (augmentation de la température corporelle, perte de poids, diminution d'activité...) peuvent être observées. De plus, des prélèvements de sang réguliers sont effectués pour évaluer le titre d'anticorps. Lorsque celui-ci est jugé suffisant, un prélèvement sanguin plus conséquent est réalisé afin d'obtenir les anticorps polyclonaux recherchés. Dans certains cas, les animaux peuvent être euthanasiés afin de récupérer la quasi-totalité du volume sanguin circulant. Dans ce cas-là, une anesthésie pourra être réalisée.

La production d'anticorps polyclonaux nécessite l'utilisation d'animaux puisqu'il n'existe aucune méthode substitutive pour cette production. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum. En effet, un seul ovin ou un seul caprin sera immunisé par étude. Dix études par an pourront être réalisées soit l'utilisation de 50 ovins ou 50 caprins sur 5 ans.

Dans le cadre de ces études, afin de permettre aux animaux inclus de s'adapter à leur environnement et de s'assurer de leur bon état de santé, une période d'acclimatation d'au minimum 7 jours sera dispensée avant traitement. De plus, tout au long de leur hébergement, les animaux disposeront de conditions d'hébergement adaptées et vérifiées quotidiennement. Ainsi, ils bénéficieront d'un logement, d'un environnement, d'une alimentation, d'un apport en eau et en soins appropriés à leur santé et à leur bien-être. Dans cette optique, bien qu'un seul animal soit inclus par étude, il sera hébergé avec au minimum un autre de ses congénères et/ou avec d'autres espèces compatibles, dans un environnement enrichi

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

5002. Les recherches menées au sein du laboratoire ont pour but de développer des molécules bifonctionnelles associant chimiquement une partie HBP (hydroxybisphosphonate) à un principe actif. De par la forte affinité de l'HBP pour le tissu osseux, celui-ci permettrait de vectoriser différents types de molécules au niveau osseux dans le but d'augmenter les concentrations au niveau de l'os (pour les applications ciblées) et en diminuant les concentrations circulantes (pouvant être responsable d'effets secondaires). Cette vectorisation peut s'appliquer pour des anti-cancéreux (dans le cadre des tumeurs osseuses telle que l'ostéosarcome), mais également pour des anti-inflammatoires, antalgiques ou des agents utilisés pour l'imagerie par exemple.

La molécule retenue pour cette étude associe un agent anti-cancéreux à une partie HBP. Ce composé a démontré son efficacité anti-tumorale dans différents modèles murins d'ostéosarcome. Le développement préclinique d'une molécule inclut la recherche d'effets toxiques avant tout essai chez l'homme. Ainsi, une étude de toxicité par administration unique chez le rat a été réalisée pour ce composé afin de déterminer la dose maximale tolérée (MTD : Maximum Tolerated Dose) en injection unique. Il est à présent nécessaire d'affiner au mieux le schéma d'administration et la dose de molécule à injecter afin de choisir la méthode présentant le moins d'effets toxiques possible. Ce projet consiste donc à déterminer la MTD de la molécule en administration répétée. Aucune méthode alternative (étude in-vitro par exemple) ne permet de reproduire l'ensemble des paramètres toxicologiques liés à un individu dans sa globalité. L'utilisation d'animaux est donc indispensable pour atteindre les objectifs de ce projet. Le protocole inclura 6 groupes de 10 rats (soit 60 rats) comprenant le groupe contrôle et 5 autres groupes traités avec la molécule cible à des concentrations différentes. Au total, 60 rats seront utilisés au maximum. Les 5 doses seront testées en même temps afin de limiter le nombre de groupes contrôle et ainsi respecter la règle des 3R. Le traitement sera injecté en 3 cures par voie intraveineuse. Afin d'évaluer la toxicité, différentes analyses et suivis seront réalisés pendant et à la fin du protocole comprenant l'évaluation des signes cliniques, du poids des rats ainsi que des paramètres hémato-biochimiques et histologiques.

Ce projet constitue la dernière étape préliminaire aux études de toxicologie réglementaire répondant aux guidelines ICH (International Council for Harmonisation). Ce projet permettra, en effet, de déterminer la méthode d'administration répétée la mieux tolérée et d'affiner le choix des doses pour la future étude de toxicologie réglementaire. L'objectif final étant de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques aux patients atteints de tumeur osseuse.

5003. Bien que certaines fonctions cognitives soient altérées dans les populations âgées ne souffrant pas de pathologies neurodégénératives avérées, des études longitudinales ont montré que ces fonctions ne déclinaient que peu ou pas au cours du vieillissement chez certains sujets. L'identification de facteurs associés à cette variabilité ainsi que de leurs corrélats neurobiologiques constitue une facette importante des recherches actuelles dans le domaine du vieillissement en neurosciences cognitives. Parmi ces facteurs, ceux liés aux expériences de la vie (niveau d'étude, activités professionnelles et de loisir) auraient un impact profond sur le vieillissement cognitif. Ce sont ces facteurs, modélisés par des conditions d'hébergement différenciées, dont nous étudions depuis plusieurs années l'impact sur le vieillissement neurocognitif chez le Rat. Nous avons en particulier montré que l'hébergement des animaux dans un milieu riche en stimulations cognitives, physiques et sociales (milieu enrichi) pendant toute leur vie adulte avait un effet bénéfique sur la mémoire spatiale à long terme, une capacité cognitive dont le déclin est bien établi chez l'Homme. On ignore cependant si un tel hébergement a également un impact sur un autre type de mémoire, la mémoire de travail. Celle-ci permet d'encoder, de maintenir en mémoire pendant quelques secondes et d'utiliser de manière flexible des informations qui ne sont plus présentes dans l'environnement. De fait, elle contribue à de nombreuses fonctions ou processus cognitifs comme la mémoire à long terme ou la prise de décision et son déclin contribue de manière significative à l'altération de la vie quotidienne du sujet âgé. Ce projet a pour objectifs 1) d'évaluer si l'hébergement en milieu enrichi permet de préserver la mémoire de travail des animaux âgés, 2) d'évaluer si le maintien de cette capacité peut contribuer à celui de la mémoire spatiale à long terme, et 3) d'étudier dans quelle mesure les effets bénéfiques de l'hébergement en milieu enrichi seraient corrélés à son impact sur certaines populations de cellules gliales, pour lesquelles un nombre croissant de travaux souligne l'importance dans le maintien de l'intégrité fonctionnelle des neurones de l'animal âgé. Pour ce faire, nous évaluerons la mémoire de travail de rats âgés (24 mois) hébergés pendant toute leur vie adulte en milieu enrichi (groupe âgé enrichi) ou en milieu standard (groupe âgé standard). Un groupe de rats âgés de 3 mois (groupe jeune adulte) permettra d'évaluer si l'hébergement en milieu enrichi permet d'atténuer ou de prévenir les effets délétères du vieillissement attendu chez les rats âgés hébergés en milieu standard. Avant de tester la mémoire de travail de ces trois groupes de rats, nous évaluerons leur mémoire à long terme. A l'issue des tests comportementaux, les animaux seront mis à mort par injection d'une dose létale d'anesthésique et leur cerveau traité en vue des analyses immunohistologiques. Les animaux nécessaires à ce projet seront successivement exposés à deux procédures comportementales : 1) une tâche de mémoire spatiale à long terme et 2) une tâche de mémoire de travail. Dans la mesure où ce projet porte sur l'identification de corrélats neurobiologiques aux performances cognitives, nous ne pourrons appliquer l'une des recommandations de la règle des 3 Rs, à savoir celle de Remplacer, et recourir à un modèle autre que celui de l'animal. En ce qui concerne la recommandation de Réduire, le nombre d'animaux nécessaires (40 rats âgés et 14 rats jeunes adultes, soit 54 rats au total) a été établi 1) compte-tenu de la mortalité anticipée et des pathologies cérébrales ne pouvant être déterminées qu'après la mise à mort (p.e. tumeur hypophysaire) dans les deux groupes d'animaux âgés, 2) de la variabilité des performances comportementales dans l'ensemble des groupes et 3) de l'approche statistique qui sera utilisée pour répondre aux questions auxquelles vise à répondre ce projet. Les effectifs terminaux escomptés garantiront ainsi la validité des conclusions qui pourront être tirées de ce projet. La recommandation de Réduire sera également suivie dans la mesure où l'encéphale des animaux de ce projet sera entièrement débité en coupes et que celles qui ne seront pas nécessaires à ce projet seront conservées de manière à pouvoir mener d'autres investigations neurobiologiques sans mettre à mort d'autres animaux. En ce qui concerne la recommandation de Raffiner, les animaux seront hébergés au laboratoire en binôme pendant toute la durée du projet et ne seront exposés à aucune procédure douloureuse. L'évaluation de la mémoire de travail des animaux nécessitera cependant de limiter leur accès à la nourriture, la tâche utilisée étant motivée par la délivrance d'un renforçateur alimentaire. Aucune limitation du bien-être des animaux n'est nécessaire à l'évaluation de leur mémoire à long terme.

5004. La capacité de garder en mémoire une expérience est essentielle pour la survie des organismes supérieurs. Cette capacité est en partie assurée par une structure cérébrale appelée hippocampe. Cette structure est composée de cellules appelées "neurones". Ces derniers sont connectés entre eux, et sont capables de modifier leurs connexions en fonction des informations qu'ils reçoivent, autrement dit, ils sont capables de « plasticité synaptique ». Les informations qu'ils reçoivent peuvent les activer ou les rendre silencieux. Toutes les informations reçues sont précisément intégrées de manière à coder et transmettre au mieux les messages nerveux. Ces mécanismes sont connus pour être importants pour le stockage de la mémoire. Une des sous-régions de l'hippocampe (CA3) est impliquée dans la mémoire des événements vécus dans leurs contextes, appelée « mémoire épisodique ». Des modélisations par ordinateur ont permis d'émettre l'hypothèse que cette sous-région serait particulièrement importante pour développer la représentation instantanée d'un contexte.

Pour pouvoir confirmer ces hypothèses, il est nécessaire de revenir à l'animal pour étudier le fonctionnement des circuits de neurones du CA3 intacts, ainsi que le rôle joué par la plasticité synaptique dans ses circuits. Le projet propose d'étudier le fonctionnement des circuits du CA3 "in vivo" (chez l'animal vivant), à l'aide d'enregistrements de l'activité électrique des neurones chez la souris anesthésiée. Grâce à une technique appelée « optogénétique », il sera possible d'activer ou de rendre silencieuse une population de neurones en les stimulant avec de la lumière. Ces outils d'optogénétique seront introduits au niveau de la région de l'hippocampe par injection stéréotaxique de virus combinant non réplicatifs. Ces manipulations permettront d'enregistrer la réponse de certains neurones après activation et/ou inhibition d'autres neurones, et donc de mieux comprendre le fonctionnement des circuits du CA3 intact.

Les données sont difficiles à obtenir, 600 souris seront donc nécessaires pour ce projet. Pour être en mesure de réduire le plus possible ce nombre, tout au long du projet, les données électrophysiologiques seront analysées au fur et à mesure. Pour la chirurgie stéréotaxique faite sous anesthésie gazeuse pour un meilleur réveil, les douleurs seront soulagées par des molécules adaptées (morphinique et anti inflammatoire non stéroïdiens), le raffinement sera recherché par des mesures prophylactiques d'asepsie du champ opératoire, une régulation thermique et de suivi spécifique des animaux. Pour les expériences

d'électrophysiologie, leur bien-être sera pris en compte tout au long des enregistrements afin qu'ils ne ressentent aucune douleur (utilisation d'anesthésie générale, d'analgésiques locaux, régulation thermique, contrôle de la fonction respiratoire...).

5005. L'objectif de ce projet est d'identifier des composés chimiques ou biologiques qui pourraient être développés comme nouveaux médicaments dans le traitement de la bronchiolite et de l'asthme, ainsi que les complications respiratoires inflammatoires et infectieuses qui en découlent. En effet, l'arsenal thérapeutique actuellement disponible ne permet pas de soigner correctement ces pathologies pulmonaires. Le traitement chez le jeune enfant de la bronchiolite, maladie très contagieuse, se résume pour l'essentiel à des mesures symptomatiques pour diminuer la fièvre et lutter contre l'encombrement bronchique. Le traitement de l'asthme fait appel à des bronchodilatateurs en cas de crise, et à des corticoïdes inhalés en traitement de fond, mais ces deux classes de médicaments ont des effets indésirables bien documentés. De plus, la composante allergique de l'asthme rend difficile la mise en place de mesures de prévention et de contrôle de l'environnement.

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

Afin de déclencher les symptômes de la bronchiolite, le virus respiratoire syncytial humain (RSV) est administré à des souris afin de se rapprocher au plus près des conditions d'infection avec ce même virus chez l'homme. La plupart des animaux utilisés dans ce projet seront exposés à une ou deux administrations intra-nasales du virus RSV, le choix du nombre d'expositions au virus étant dicté par le degré d'inflammation recherché dans les poumons et le mécanisme d'action des composés à tester. Les signes cliniques attendus sont modérés (perte de poids transitoire consécutive à l'inflammation pulmonaire après l'infection au RSV).

L'asthme sera induit par des administrations intranasales répétées de poussière d'acariens, qui est un des allergènes domestiques majeurs responsable de l'asthme chez l'enfant et l'adulte. Il n'est attendu aucun signe clinique sur les animaux exposés.

L'administration combinée du RSV et de la poussière d'acariens permettra d'établir un modèle d'asthme exacerbé qui présente chez l'homme une résistance aux médicaments existants, et pour lequel de nouvelles approches thérapeutiques sont donc nécessaires (perte de poids transitoire consécutive à l'inflammation pulmonaire après l'infection au RSV).

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

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

Une analyse bio-statistique des données générées dans ce modèle rongeur est réalisée, afin d'inclure le minimum requis d'animaux par groupe pour obtenir une réduction significative de l'inflammation pulmonaire ou de la charge virale dans les poumons.

Ce projet nécessitera une utilisation moyenne de 1600 souris par an, soit 8000 animaux au total pour la durée totale du projet sur 5 ans.

5006. Le projet a pour but de développer et caractériser un modèle de cellules de lymphome humain greffé en intrafémoral chez des souris immunodéficientes, les souris NOD SCID GAMMA (NSG). Le choix de la souris NSG repose sur le fait que ce type de xéno greffe requiert une souche immunodéficiente dépourvue de lymphocytes T et B et de cellules Natural Killer afin de potentialiser la prise de greffe.

Le lymphome non hodgkinien est au 6ème rang des cancers les plus fréquents avec une incidence qui a énormément augmentée ces 2 dernières décennies, sans que les raisons en soient parfaitement connues. Malgré des avancées thérapeutiques notables cette pathologie reste à l'heure actuelle incurable. Les lymphomes sont caractérisés par la prolifération maligne de lymphocytes dans une partie du système lymphatique de l'organisme, comme les ganglions lymphatiques, le sang ou la moelle osseuse.

Ce projet permettra de maîtriser et caractériser un nouveau modèle animal pour mieux comprendre cette pathologie et valider de nouvelles molécules thérapeutiques.

Le respect de la règle des 3R dans ce projet se traduit par :-le Remplacement: le développement du lymphome est étroitement lié à la présence d'un microenvironnement de soutien (cellules stromales de différents phénotypes, facteurs de croissance,...). Ce microenvironnement n'est pas reproductible *in vitro* et c'est pourquoi le recours à des animaux est indispensable pour le développement de ce type de tumeur.

-la Réduction: le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet sera de 190 souris, il permettra d'appréhender différents paramètres indispensables. Les procédures expérimentales sont rigoureusement planifiées afin de n'utiliser que le nombre d'animaux strictement nécessaire afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables. Les paramètres ainsi appréhendés seront:

- les cellules tumorales implantées :

cellules de lymphome B humain (lignée cellulaire DOHH2) en culture ou prélevées chez une souris préalablement greffée avec des cellules tumorales (lignée cellulaire DOHH2)

- le type d'implantation :

Cellules tumorales seules ou co-implantées avec des cellules stromales humaines

- L'origine des cellules stromales utilisées :

Tissu adipeux ou organe lymphoïde secondaire (amygdale)

Aux 160 souris nécessaires pour tester ces paramètres, il s'ajoute 30 animaux producteurs. Ainsi le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet sera de 190 souris.

-le Raffinement: les animaux sont élevés dans des conditions adaptées: locaux confinés, portoirs ventilés, eau et nourriture ad libitum, maximum 5 animaux/cage et aucun animal ne sera maintenu seul dans sa cage. L'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques permettra d'éviter toute souffrance aux animaux. De plus, l'évaluation régulière du score de grimace des animaux et le suivi de leur poids et de leur comportement permettra d'avoir un contrôle continu sur leur état de santé.

5007. Les plaquettes sanguines jouent un rôle clef en thrombose artérielle. Leur accumulation suite à la rupture d'une plaque d'athérosclérose peut mener à l'occlusion du vaisseau, responsable de maladies ischémiques graves comme l'accident vasculaire cérébral ou l'infarctus du myocarde, qui représentent la première cause de mortalité dans le monde. La GPVI est une cible antithrombotique particulièrement intéressante car elle pourrait prévenir les accidents thrombotiques sans faire saigner. Une meilleure compréhension de son rôle est nécessaire pour comprendre les risques associés à l'utilisation d'agents dirigés contre la GPVI comme antiplaquettaire.

L'objectif de cette étude est de mieux caractériser le rôle de la GPVI et de déterminer si certaines protéines plasmatiques représentent un ligand potentiel. Des données préliminaires réalisées avec des plaquettes humaines nous ont permis d'identifier un nouveau ligand et cette étude aura pour but de caractériser l'importance de l'interaction de ce nouveau ligand avec la GPVI. Mieux comprendre le rôle de la GPVI est essentiel dans le cadre d'une approche anti-thrombotique qui vise à cibler ce récepteur. Ceci est d'autant plus important que le laboratoire collabore avec une spin-off de l'Inserm pour amener un agent anti-GPVI en phase clinique chez l'homme.

Alors que la majorité des études in vitro qui portent sur le rôle de la GPVI sont réalisées avec du sang humain, seul un minimum sera réalisé avec du sang de souris. La raison pour laquelle on utilisera du sang de souris est lié au fait que l'on dispose d'outils uniques comme des souris transgéniques qui permettront d'obtenir des réponses biologiques, grâce à la réalisation de thromboses expérimentales chez l'animal au cours du temps, que ne pourront pas fournir les expériences avec le sang humain. Enfin, la réussite de ce projet est liée à une démonstration in vivo de l'efficacité du blocage ou de l'absence de la GPVI qui nécessite l'utilisation d'animaux.

Remplacer

L'étude du rôle et de la fonction de la GPVI plaquettaire dans les mécanismes de thrombose ont déjà été réalisées in vitro, dans des chambres microfluidiques, en utilisant du sang humain provenant de donneur sain. Seul un minimum d'expérience sera réalisé avec du sang d'animal pour mettre en perspective les résultats obtenus in vivo avec les résultats déjà obtenus ex vivo.

Réduire

Le laboratoire a une longue expérience dans l'utilisation des modèles de thrombose in vivo ainsi que dans l'étude des fonctions plaquettaires, permettant d'utiliser le nombre minimum d'animaux pour espérer observer un effet biologique.

Seul un rat sera utilisé lors de ces expériences afin de vérifier la capacité de la GPVI plaquettaire à s'activer au contact de protéines plasmatiques de rongeur, différent de la souris. Cette observation ne nécessite pas de test statistique.

Le travail en système de perfusion consistera principalement à prélever le sang de souris qui sera perfusé dans des chambres microfluidiques de très petite taille. Le volume de sang utilisé est nettement inférieur à celui utilisé dans des systèmes de perfusion classique, permettant de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires.

Le nombre d'animaux utilisés pour chaque condition est fixé à 10, ce qui est suffisant pour appliquer à l'étude un test d'analyse de variance ANOVA. Les résultats obtenus de l'analyse par ce test statistique permettront de ne pas répéter l'expérimentation, par conséquent réduire le nombre d'animaux.

Raffiner

Le modèle animal est choisi dans le but de reproduire le plus fidèlement possible, la pathologie étudiée et d'en tirer le maximum d'informations. Les conditions du travail décrits ci-dessous et pour lesquels nous avons une forte expertise sont optimisées afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés aux procédures expérimentales. Tout au long des expériences, les animaux anesthésiés seront surveillés en permanence par l'expérimentateur. De plus, les expériences seront réalisées sans réveil, ce qui permet de fortement limiter la souffrance des animaux.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 313 animaux.

5008. L'acéruoplasminémie héréditaire (AH) est une pathologie génétique rare, liée à des mutations du gène céruloplasmine sur les deux chromosomes. Elle entraîne une surcharge en fer générale touchant en particulier le foie et le cerveau. Elle est responsable d'une chute de la qualité de vie et entraîne une mort prématurée.

Certaines caractéristiques des patients ne sont pas pleinement expliquées par le rôle biologique aujourd'hui attribué à la céruloplasmine.

Par ailleurs, certains patients, ayant une surcharge en fer inexplicée présente une mutation de ce gène sur un seul chromosome. La responsabilité de cette simple mutation dans le développement du tableau est discutée. Elle pourrait toutefois représenter un facteur de susceptibilité pour le développement de maladies liées au fer ou au cours desquels le fer serait un facteur aggravant comme au cours des maladies neurodégénératives.

Nous voulons préciser l'impact de mutations, sur un seul chromosome, du gène de la céruloplasmine sur le métabolisme du fer général et cérébral et les mécanismes en explorant dans un modèle de rat acéruoplasminémique les animaux qui présentent une simple mutation par rapport à des animaux normaux et à des animaux présentant une double mutation.

Ce protocole est prévu pour répondre à la règle des 3R.

-Réduire le nombre de rats en réalisant le protocole sur le nombre d'animaux strictement nécessaire pour réaliser une analyse pertinente sur les deux sexes. Le nombre total d'animaux prévu est de 100.

-Raffiner : le protocole ne devrait pas entraîner de douleur significative, les animaux ne présentant pas de phénotype douloureux, les prélèvements étant réalisés sur l'animal anesthésié.

-Remplacer : L'étude de l'impact des mutations du gène de la céruloplasmine sur le métabolisme général et cérébral du fer nécessite d'avoir recours à l'animal entier.

Les résultats permettront d'avoir une meilleure compréhension de la maladie dans le but d'améliorer sa prise en charge.

5009. Dans le cadre d'un cours d'enseignement supérieur consacré à la génétique de la souris, nous organisons des travaux pratiques permettant aux étudiants d'acquérir des compétences théoriques et expérimentales en particulier sur le développement embryonnaire de la souris et la biologie des cellules souches. Ce projet concerne l'étude d'anomalies squelettiques et l'expression de gènes dans des embryons porteurs de diverses mutations, la production d'embryons de souris par fécondation in vitro et la production de structures cellulaires structurées en organoïdes. Ces expériences ne peuvent éviter de recourir à l'utilisation d'animaux car il s'agit d'étudier des organismes entiers ou de récolter des tissus.

Sur une période de 5 ans, ce projet utilisera au total 1850 souris dans 3 procédures de classe légère. Certains animaux recevront une ou deux injections de substances n'ayant aucun impact sur le bien-être des animaux. Les animaux seront tous mis à mort dans les jours suivants, sans que les procédures n'aient altéré leur état général ou leur bien-être.

Ce cours permet aux étudiants d'acquérir des connaissances de haut niveau en biologie et en génétique de la souris, indispensables dans de nombreux domaines de la recherche biomédicale.

5010. L'acide rétinoïque (ATRA) est essentiel car c'est une vitamine. Notre recherche consiste à comprendre les mécanismes que l'ATRA contrôle pour exercer ses effets. Le testicule est notre modèle d'étude car son fonctionnement est altéré en cas de carence en ATRA, et il intègre de nombreuses problématiques (cellules souches ; identité, destin, prolifération et morphogenèse cellulaire ; divisions mitotique et méiotique, mort cellulaire).

La spermatogenèse est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs types cellulaires du testicule. Notre étude vise à comprendre les effets de l'ATRA dans un système physiologique. Seule une approche expérimentale avec des animaux permet de répondre à ces questions. Le remplacement par un système in vitro (1er R de la règle des 3R) est impossible.

La souris est le modèle de choix car sa spermatogenèse dépend de l'ATRA, comme chez l'homme. Nous combinons des approches génétiques et pharmacologiques pour comprendre comment l'ATRA exerce ses effets. Nous créons des souris transgéniques ou des souris porteuses d'une ou plusieurs mutations. Les protocoles mis en œuvre permettent de synchroniser la spermatogenèse pour en faciliter la compréhension, et d'induire ou corriger la stérilité des mâles pour étudier le mécanisme moléculaire impliqué.

Le nombre d'animaux requis est de 8676 souris au maximum. Ces nombres sont calculés au plus juste pour satisfaire aux exigences en matière de réduction du nombre d'animaux utilisés tout en assurant la qualité des résultats obtenus et la robustesse de leur validité statistique. La réduction du nombre d'animaux (2e R de la règle des 3R) est donc appliquée dans notre projet.

Les animaux ne souffrent pas car le phénotype se limite à la stérilité des mâles. Nous tentons d'induire ou de corriger cette stérilité. Aucune des étapes expérimentales mises en œuvre n'engendre de la douleur aux animaux (autre que celle de l'injection des produits). Le bien-être est surveillé en permanence et toute altération du comportement des animaux (souffrance, angoisse) sera immédiatement discutée avec les responsables de la structure du bien-être animal (SBEA) pour prendre les mesures correctives nécessaires. Nous respectons ainsi le raffinement (3e R de la règle des 3R) dans ce projet.

5011. L'acide rétinoïque (ATRA) est essentiel car c'est une vitamine. Notre recherche consiste à comprendre les mécanismes que l'ATRA contrôle pour exercer ses effets. Le testicule est notre modèle d'étude car son fonctionnement est altéré en cas de carence en ATRA, et il intègre de nombreuses problématiques (cellules souches ; identité, destin, prolifération et morphogenèse cellulaire ; divisions mitotique et méiotique, mort cellulaire).

La spermatogenèse est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs types cellulaires du testicule. Notre étude vise à comprendre les effets de l'ATRA dans un système physiologique. Seule une approche expérimentale avec des animaux permet de répondre à ces questions. Le remplacement par un système in vitro (1er R de la règle des 3R) est impossible.

La souris est le modèle de choix car sa spermatogenèse dépend de l'ATRA, comme chez l'homme. Nous combinons des approches génétiques et pharmacologiques pour comprendre comment l'ATRA exerce ses effets. Les protocoles mis en œuvre permettent d'induire une ou plusieurs mutations chez la souris, uniquement dans un type cellulaire choisi.

Le nombre d'animaux requis est de 3900 souris au maximum. Ces nombres sont calculés au plus juste pour satisfaire aux exigences en matière de réduction du nombre d'animaux utilisés tout en assurant la qualité des résultats obtenus et la robustesse de leur validité statistique. La réduction du nombre d'animaux (2e R de la règle des 3R) est donc appliquée dans notre projet.

Les animaux ne souffrent pas car le phénotype se limite à la stérilité des mâles. Nous tentons d'induire ou de corriger cette stérilité. Aucune des étapes expérimentales mises en œuvre n'engendre de la douleur aux animaux (autre que celle de l'injection des produits). Le bien-être est surveillé en permanence et toute altération du comportement des animaux (souffrance, angoisse) sera immédiatement discutée avec les responsables de la structure du bien-être animal (SBEA) pour prendre les mesures correctives nécessaires. Nous respectons ainsi le raffinement (3e R de la règle des 3R) dans ce projet.

5012. L'ulcère de Buruli ou infection à *M. ulcerans* est une mycobactériose cutanée émergente qui sévit principalement en Afrique de l'Ouest. Le diagnostic clinique de l'ulcère de Buruli est relativement aisé à établir sur la base des signes cliniques (œdème, ulcération aux bords décollés) pour des lésions qui évoluent depuis longtemps. Mais il reste souvent délicat pour les formes précoces (nodules, plaques) et il doit être aisément distinguable des autres lésions cutanées chroniques (leishmaniose cutanée, nodules tumoraux). La confirmation du diagnostic repose donc essentiellement sur la détection et la culture des bactéries à partir des prélèvements réalisés au niveau de la lésion. Compte tenu de la croissance lente de *M. ulcerans*, la PCR est la méthode de diagnostic la plus sensible et la plus rapide. Les structures spécialisées où sont acheminés les prélèvements pour établir le diagnostic par PCR restent éloignées des centres de prise en charge et de dépistage clinique de l'ulcère de Buruli. Dans ce cadre, notre laboratoire effectue le diagnostic de l'infection à *M. ulcerans* pour un hôpital du Bénin. En plus de la PCR, nous procédons à la mise en culture des prélèvements afin d'obtenir les bacilles en quantité suffisantes afin d'évaluer la résistance des souches aux antibiotiques (utilisés pour traiter cette infection), mais aussi pour réaliser des études épidémiologiques. Malheureusement, les milieux de culture synthétiques de laboratoire ne sont pas adaptés, et ne permettent pas une croissance optimale du bacille de toutes les souches. Après primo-culture, il est parfois nécessaire d'inoculer le bacille à des souris afin d'obtenir une quantité suffisante de bactéries pour l'obtention des informations demandées par le clinicien. En effet, nos études précédentes ont montré que la souris était très sensible à cette bactérie et que le tissu cutané murin permettait une croissance importante du bacille.

La bactérie produit une toxine (mycolactone) qui a la particularité de rendre les lésions indolores (hypoesthésie). Les manipulations (inoculation, prélèvement, euthanasie) de ces animaux sont réalisés par du personnel formé. De plus, une surveillance quotidienne de ces souris est réalisée et si un animal présentait des signes cliniques notables (tableau en annexe), la mise à mort de celui-ci serait immédiatement réalisée, afin de respecter au mieux la règle des 3R. Notre laboratoire reçoit une quantité moyenne de 500 prélèvements par an en provenance du Bénin, dont une centaine sont positifs. Nous estimons donc à 500 le nombre d'animaux maximum (5 souris par prélèvement positif) utilisés chaque année, soit un total de 2500 souris.

5013. Régulièrement des maladies nouvelles apparaissent dans les élevages ou dans la faune sauvage. Ces maladies dites « émergentes » sont dues à l'introduction de pathogènes nouveaux (comme par exemple le Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin au début des années 90) ou à l'apparition de nouvelles formes d'agents pathogènes existants déjà sur le terrain (la grippe et un nouveau virus influenza réassortant par exemple). Si ces maladies présentent des caractères épizootique, zoonotique ou économique, elles deviennent un enjeu de santé publique vétérinaire. Les autorités sanitaires doivent alors proposer des mesures pour les éradiquer ou au moins stopper leur progression. Ces mesures ne peuvent être proposées que si l'agent pathogène est caractérisé sur le plan de sa transmission, de son pouvoir pathogène (aspects cliniques et lésionnels) et de son pouvoir immunogène.

L'objectif de ce projet est de caractériser, en cas de besoin urgent, un agent pathogène responsable de maladie émergente en élevage de porcs ou chez les sangliers, pouvant représenter un risque pour les élevages porcins. Ce projet devrait également permettre la mise au point de méthodes de laboratoire destinées au diagnostic. Pour cela, l'agent pathogène incriminé ou des prélèvements réalisés sur des animaux malades seront inoculés à des porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiques ou à des porcs conventionnels. Le suivi clinique des animaux et l'analyse de prélèvements réguliers permettront de définir les caractéristiques de l'agent responsable.

Des procédures seront conduites sur 10 ou 24 porcs selon l'objectif poursuivi et pourraient être reconduite à chaque nouvelle émergence. La probabilité qu'il y ait plus d'une nouvelle émergence par an en moyenne sur une période de cinq ans étant quasi nulle, cette procédure concernera 170 porcs au maximum sur une période de cinq ans (si on prend en compte tous les cas de figure : « amplification d'un agent pathogène » et « caractérisation du pouvoir pathogène et infectieux d'un agent pathogène »). La procédure précèdera l'identification *in vitro* de l'agent pathogène suspecté d'être responsable de la maladie si celui-ci ne peut être isolé, son identification par des méthodes de laboratoire (moléculaires, virologiques, bactériologiques...) ou fera suite à son isolement *in vitro* si celui-ci est possible. Dans les deux cas, le remplacement du modèle animal n'est donc pas possible car soit l'isolement sera impossible en laboratoire, soit cette dernière phase de caractérisation *in vivo* du pouvoir pathogène et infectieux de l'agent pathogène sur l'espèce cible sera indispensable pour la compréhension de la maladie. Le nombre de porcs a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de données fiables et exploitables. Les porcs seront élevés en groupe et bénéficieront d'un enrichissement social, ils auront à leur disposition des objets manipulables. Ils seront nourris et abreuvés à volonté. Ils feront l'objet d'un suivi clinique quotidien. En cas d'atteinte de points limite préalablement définis, les porcs seront euthanasiés afin qu'ils ne souffrent pas.

5014. Ce projet vise à étudier et valider 3 nouvelles molécules multi-compétentes, dites théranostiques. Ces molécules agissent d'une part, comme agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM), permettant ainsi d'optimiser la détection et le diagnostic de tumeurs et d'autre part, comme agent de traitement par thérapie photodynamique (PDT). La PDT est un traitement médical localisé qui consiste à administrer un agent de traitement, lequel va s'accumuler dans la zone tumorale puis sera irradié (avec une lumière rouge ou infra-rouge) pour conduire à la destruction de la tumeur. L'IRM est une technique d'imagerie biomédicale, qui permettra d'établir l'efficacité du traitement par un suivi des animaux dans le temps. Ce domaine de la thérapie guidée par l'image peut avoir un impact sociétal important dans l'amélioration du diagnostic et de la prise en charge du patient.

Pour l'une des 3 molécules, des études préliminaires sur cultures cellulaires cancéreuses nous ont permis de démontrer :

- sa supériorité par rapport aux agents de contraste commerciaux utilisés dans les services cliniques,
- son innocuité pour les cellules en absence d'irradiation lumineuse,

- son efficacité pour un traitement par PDT

Les deux autres molécules seront testées à leur tour sur des cultures cellulaires cancéreuses avant tout essai in-vivo.

Malheureusement, les cultures cellulaires ne reproduisent pas la complexité du vivant, ne donnent pas d'information quant à la biodistribution et la pharmacocinétique des agents et ne permettent pas le suivi du traitement par l'imagerie. Pour cette raison, l'étude se fera en deux étapes:

- Etape 1 : détermination de la biodistribution et de l'accumulation de nos molécules dans une tumeur induite chez des souris par IRM à court terme.

- Etape 2 : traitement de la tumeur par PDT et évaluation de son efficacité à l'aide d'un suivi par IRM dans le temps.

Afin d'établir au mieux les capacités de nos molécules pour le traitement de différents types de tumeurs, nous utiliserons lors de cette étude, 6 lignées tumorales. Elles seront implantées en sous-cutanées au niveau du flanc.

Lors de la première étape, nous suivrons par IRM différents groupes d'animaux portant des tumeurs, ils seront injectés soit avec une molécule bifonctionnelle synthétisée par un des collaborateurs, soit avec un agent de contraste commercial. Deux doses d'injection par molécule synthétisée seront testées. Une seule dose par molécule commerciale sera testée. A noter que la dose testée est dix fois plus faible que celle appliquée en milieu clinique avec des agents de contraste commerciaux. Les produits seront injectés en intraveineuse (par la queue), nous permettant ainsi de suivre par IRM la biodistribution et l'accumulation dans la tumeur durant les premières heures après l'injection. Lors de cette étude, une injection en intra-péritonéale pourra aussi être envisagée pour les facilités de mise en œuvre de cette dernière.

Une fois le temps d'accumulation optimal déterminé, 3 groupes d'animaux correspondant à différentes conditions expérimentales (molécule injectée ou non, traité ou non par PDT) seront observés. L'évolution volumique de la tumeur au sein de ces groupes d'animaux sera suivie en la mesurant à l'aide d'un pied à coulisse deux fois par semaine pendant 1 mois. Un suivi par IRM une fois par semaine avant et jusqu'à un mois post-traitement, permettra de suivre l'évolution tissulaire (développement de nécrose...) et volumique de la tumeur.

Chaque groupe d'animaux sera composé de 8 souris. Au total, 768 animaux seront utilisés sur les 5 ans.

Afin de respecter au mieux la règle des 3R, nous allons:

- Réduire: Nous n'utiliserons que 8 animaux par groupe, 8 étant le minimum pour pouvoir faire des études statistiques dans ce type d'étude qui présente une grande variabilité interindividuelle. De plus, l'imagerie nous permet de suivre un même animal plusieurs fois et de l'utiliser comme son propre contrôle, ce qui réduit le nombre d'animaux à inclure.

- Raffiner: Enrichir l'environnement des animaux, former des groupes sociaux. Le contrôle et le suivi de la douleur des animaux seront effectués tous les jours, et seront minimisés grâce aux anesthésies

- Remplacement : Nous sommes obligés d'utiliser des souris car l'objectif du travail est de visualiser la biodistribution et l'accumulation de l'agent de contraste dans une tumeur et ensuite d'estimer l'efficacité du traitement par thérapie photodynamique.

Enfin, nous utiliserons un test statistique non paramétrique, adéquat pour les petits effectifs.

5015. Le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) est une affection virale caractérisée par des problèmes de reproduction chez les truies et des troubles respiratoires chez les animaux en croissance. Cette maladie, apparue en Europe de l'Ouest au début des années 90, présente aujourd'hui une prévalence très élevée dans certaines régions (plus de 60% en Bretagne). Cette infection conduit à des pertes économiques considérables ainsi qu'à une utilisation importante d'antibiotiques en élevage en raison des complications bactériennes secondaires. La lutte contre le virus du SDRP (SDRPV) fait appel en particulier à des vaccins vivants atténués (Modified Live Vaccine : MLV) de génotype 1 (Européen) ou 2 (Américain). Ces vaccins MLV posent des problèmes d'innocuité. Ainsi pour les vaccins MLV2, des phénomènes de retour à la virulence ont été décrits suite à des mutations ou des recombinaisons des souches vaccinales. Dans le cadre de co-infection (notamment par le circovirus porcin : PCV2), ces vaccins MLV2 pourraient également montrer des problèmes de sécurité. Malgré une utilisation de plus en plus importante sur le terrain, les données quant à l'innocuité des vaccins MLV1 sont encore très rares. Dans ce contexte l'objectif de ce projet est d'apporter de nouveaux éléments sur l'innocuité des vaccins MLV1. Les données préliminaires collectées au laboratoire vont nous permettre de développer cet objectif à travers 3 procédures in vivo sur porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS).

1/ la première procédure visera à évaluer la virulence d'une souche vaccinale MLV1 révertante isolée au laboratoire en comparaison de la souche vaccinale parentale. Cette procédure nécessitera 30 porcs.

2/ la seconde procédure visera à évaluer la virulence d'une souche recombinante (isolée en élevage) entre 2 vaccins MLV1 en comparaison des 2 souches vaccinales parentales, elle nécessitera 42 animaux.

3/ la troisième procédure visera à évaluer l'impact d'une co-infection PCV2 chez des animaux vaccinés à l'aide d'un MLV1 ou bien inoculés à l'aide d'une souche SDRP d'origine vaccinale isolée sur le terrain. Cette procédure nécessitera 66 porcs.

Pour chacune de ces 3 procédures, la virulence des souches vaccinales sera évaluée à travers la mesure des paramètres zootechniques, cliniques, virologiques et de transmission. Au total, pour l'ensemble du projet, 138 porcs seront nécessaires. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de données fiables et exploitables. Les porcs seront élevés en groupe et bénéficieront d'un enrichissement social, ils auront à leur disposition des objets manipulables. Ils seront nourris et abreuvés à volonté. Ils feront l'objet d'un suivi clinique quotidien. En cas d'atteinte de points limite préalablement définis, les porcs seront euthanasiés afin qu'ils ne souffrent pas.

Ce travail, outre une meilleure compréhension des facteurs de virulence des souches vaccinales MLV1, permettra aux acteurs de la vaccination SDRP (producteurs de vaccin, Agence Nationale du Médicament Vétérinaire, vétérinaires) de connaître les

éventuels problèmes d'innocuité inhérents aux vaccins MLV1. Ces données permettront ainsi une mise en œuvre raisonnée des vaccins SDRP MLV1 en tenant compte de la balance risques/ bénéfiques.

5016 L'infection à *M. ulcerans*, ou ulcère de Buruli, est une maladie négligée émergente. Cette infection, qui touche principalement les enfants, est diagnostiquée principalement dans les zones humides de l'Afrique de l'Ouest et Centrale. Les lésions débute généralement par un nodule qui évolue en une ulcération que s'étend dramatiquement. La destruction tissulaire est due à l'action d'une toxine, la mycolactone. Malgré leur étendue, les lésions ne sont pas douloureuses. Actuellement, le traitement est limité, il fait appel à l'antibiothérapie (rifampicine/streptomycine (injectable)) et à la chirurgie. Ce traitement est efficace mais reste long et coûteux en raison de son délai (de 3 à 6 mois). Malgré son efficacité, ce traitement reste peu adapté aux zones endémiques. Actuellement, plusieurs molécules à activité anti-mycobactéries (contre l'agent responsable de la tuberculose ou de la lèpre) microbiennes sont en développement. Dans ce contexte, nous nous proposons d'évaluer ces molécules en développement dans notre modèle animal d'infection à *M. ulcerans*. Si les résultats (accélération de la guérison) sont satisfaisants, alors une étude chez l'homme pourra être envisagée dans des délais brefs.

Nous estimons à 10 molécules à évaluer, et le nombre nécessaire d'animaux pour cette étude est estimé à 240. Ce nombre est suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs tout en respectant la règle des 3R, à savoir la réduction au minimum du nombre d'animaux, le raffinement des résultats, sans pouvoir nous affranchir de l'utilisation d'animaux vivants. De plus toutes les mesures nécessaires seront prise afin de limiter au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux car l'infection à *M. ulcerans*, ou ulcère de Buruli n'est pas douloureuse nous effectuerons d'autre part une visite quotidienne de ces animaux afin de déceler tous signes cliniques qui justifieraient une euthanasie des souris. Toutes les cages d'hébergement respectent la législation en vigueur et sont équipées de matériel d'enrichissement de l'environnement afin de satisfaire au mieux au bien être de l'animal.

5017 En cas d'émergence d'une maladie nouvelle dans l'espèce porcine, les mesures de protection pourraient faire appel à une vaccination d'urgence. Dans ce cas, les vaccins pourraient être utilisés hors Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). Il pourrait s'agir de vaccins déjà existants contre l'agent infectieux identifié, mais n'ayant pas d'AMM pour l'espèce porcine ou n'ayant pas d'AMM en France. Il pourrait également s'agir d'une souche de l'agent pathogène possédée par un laboratoire qui serait également utilisée comme vaccin hors AMM. Dans tous ces cas, un contrôle d'innocuité et d'efficacité pour l'espèce porcine devrait être réalisé en urgence avant l'utilisation sur le terrain.

Le contrôle d'innocuité vise à détecter des problèmes cliniques pouvant survenir suite à la vaccination et à vérifier que le vaccin testé n'induit pas des anticorps vis-vis d'autres agents infectieux connus chez le porc. Le contrôle d'efficacité vise à contrôler si le vaccin confère une protection clinique aux porcs vis-à-vis d'une épreuve infectieuse.

L'objectif de ce projet est la mise en œuvre d'un contrôle d'innocuité et d'efficacité de vaccin sur porcs exempts d'organisme pathogènes spécifiés (EOPS) ou sur des porcs conventionnels. La procédure expérimentale suivra un protocole de multiples vaccinations décrit dans les monographies de la pharmacopée, par vaccinations répétées de dose vaccinales ou par administration unique de plusieurs doses, tout en respectant, autant que faire se peut, l'application du schéma vaccinal décrit dans le Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP) de l'AMM si celle-ci existe pour une autre espèce ou dans un autre pays.

La procédure sera conduite sur 22 porcs au maximum et pourrait être reconduite si besoin. La probabilité qu'il y ait plus d'une nouvelle émergence par an en moyenne sur une période de 5 ans étant quasi nulle, cette procédure concernera 110 porcs au maximum sur une période de cinq ans. La procédure fera suite aux contrôles in vitro de laboratoires qui seront utilisés au maximum pour vérifier l'innocuité du vaccin et limiter le recours à l'expérimentation animale. L'utilisation du modèle animal pour la dernière phase sera cependant indispensable avant la diffusion sur le terrain pour détecter d'éventuels effets inconnus pour l'espèce cible. Le nombre de porcs a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de données fiables et exploitables. Les porcs seront élevés en groupe et bénéficieront d'un enrichissement social, ils auront à leur disposition des objets manipulables. Ils seront nourris et abreuvés à volonté. Ils feront l'objet d'un suivi clinique quotidien. En cas d'atteinte de points limites préalablement définis, les porcs seront euthanasiés afin qu'ils ne souffrent pas.

5018. Ce projet a pour but de caractériser par imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) la fibrose interstitielle dans le muscle squelettique au cours des maladies neuromusculaires.

Le processus fibrotique fait partie de la physiopathologie dans un certain nombre de myopathies, dont la dystrophie de Duchenne. Les souris mdx sont le modèle murin de la dystrophie de Duchenne (DMD), l'une des formes les plus graves et les plus courantes de myopathies d'origine génétique.

Les souris mdx, comme les patients atteints de la DMD, sont porteuses de mutations dans le gène de la dystrophine qui conduisent à l'absence de la protéine en particulier dans les muscles squelettiques. Cette absence est responsable de la dégénérescence primitive du tissu musculaire. Le tissu musculaire dégénéré est progressivement remplacé par de la graisse et/ou du tissu conjonctif dont les dépôts excessifs de collagène forment la fibrose.

La fibrose musculaire est un aspect particulièrement important des dystrophies musculaires dans la mesure où elle conditionne largement les capacités contractiles des muscles. Par ailleurs, elle est le seul paramètre pathologique à avoir une corrélation significative avec le pronostic des patients, comme l'âge de perte de la marche.

Les souris mdx présentent une meilleure régénérescence musculaire et un niveau moins élevé de fibrose musculaire comparé aux patients atteints de DMD. Cependant, la fibrose musculaire peut être accentuée chez la souris mdx de façon contrôlée par injections locales de cytokines pro-fibrotiques, comme le TGF- β 1 (Transforming Growth Factor beta-1).

A ce jour, l'évaluation de la fibrose musculaire est faite à partir de l'analyse histologique de biopsies musculaires. Le développement d'outils pour l'évaluation non-invasive et atraumatique de la fibrose musculaire est d'une importance majeure, tant pour le suivi des patients que pour les études précliniques sur des modèles animaux. Ces outils permettront des études longitudinales sur les effets de possibles thérapies pour contrôler le développement de la fibrose musculaire.

L'objectif principal de ce projet est de développer des outils de RMN pour une évaluation atraumatique de la fibrose musculaire in vivo. Pour disposer d'un modèle cliniquement pertinent, avec des niveaux de fibrose musculaire chez les souris mdx similaires à ceux observés dans les patients DMD, les souris seront traitées par TGF- β 1.

Un total de 620 souris (entre mdx et contrôles normaux) est prévu pour ce projet, à être développé pendant 5 ans. Ce nombre de souris a été défini en appliquant la règle des 3R : réduire, raffiner, et remplacer.

La réduction du nombre d'animaux est assurée par la minimalisation de la variabilité entre les individus des groupes, pour ce qui concerne l'âge, les variations hormonales (souris males) et les variations sanitaires (un seul fournisseur pour chaque lignée).

Le raffinement avant l'expérimentation sera fait par l'enrichissement de l'environnement et par l'élevage des souris en groupes, selon les portées. En plus, le projet a comme méthode principale la RMN in vivo, une méthode non invasive et atraumatique. Le remplacement des modèles animaux n'est pas encore possible pour les études dans le domaine de l'imagerie par résonance magnétique.

5019. Il est maintenant établi qu'il existe un lien entre l'inflammation chronique, la survie cellulaire et les cancers, avec un rôle central du facteur de transcription NF- κ B. Les récepteurs « Toll-Like » (TLR) jouent un rôle clé dans l'inflammation, en reconnaissant des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) ou aux dommages cellulaires (DAMP), et en induisant l'activation de la voie NF- κ B et des MAPK. L'activation de ces voies de transduction entraîne la sécrétion de molécules inflammatoires et une prolifération cellulaire. La stimulation chronique des TLR pourrait ainsi permettre l'initiation ou la progression tumorale. Des études récentes chez l'homme et dans des modèles murins, ont impliqué certains TLR dans le développement tumoral, sur la base de leur capacité à stimuler la croissance et la survie des cellules tumorales. Ainsi les souris déficientes pour l'adaptateur moléculaire MyD88 de la voie de signalisation intracellulaire des TLR, ont une croissance tumorale et une mortalité diminuée après induction de tumeurs intestinales.

Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer dans les pays développés et la survie à 5 ans n'est que de 8 à 12%, en dépit des traitements. Les thérapies couramment utilisées sont, en fonction du stade de la tumeur, l'exérèse chirurgicale associée ou non avec une chimiothérapie néo-adjuvante ou adjuvante, à base de sels de platine. Toutefois, à ce jour, les cancers pulmonaires sont considérés comme plutôt résistants à la chimiothérapie.

L'inflammation chronique pulmonaire augmente le risque de développer un carcinome pulmonaire. De plus, les poumons sont le siège d'infections par des virus respiratoires comme le virus respiratoire syncytial ou le virus influenza. Ces virus appartiennent à la famille des virus à ARN simple brin qui sont reconnus par les TLR7 et 8. Ainsi, les infections pulmonaires pourraient contribuer indirectement à la progression des cancers pulmonaires, via les TLR et particulièrement via TLR7 et 8.

Les objectifs de notre équipe de recherche ont donc été, depuis quelques années, de déterminer les rôles de TLR7 dans l'inflammation chronique pulmonaire, dans la progression tumorale et la résistance aux traitements dans les cancers pulmonaires.

Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes induisant ces effets pro-tumoraux et la résistance aux traitements in vivo. Nous voulons comparer l'évolution de la croissance de tumeurs pulmonaires injectées par différentes voies, dans des souris sauvages ou déficientes pour TLR7, ou dans des souris NOD/SCID, après injection de ligands agonistes ou antagonistes du TLR7 (récepteur impliqué dans les phénomènes inflammatoires) et après traitement par différents types de chimiothérapie. Nous suivrons la croissance de ces tumeurs et l'apparition de métastases et caractériserons l'infiltrat immunitaire dans les différentes conditions de traitement.

Les animaux sont hébergés dans des portoirs ventilés (5 souris par cage) en attendant l'expérimentation. Après injection des cellules tumorales, les animaux seront suivis quotidiennement par les expérimentateurs et le personnel de l'animalerie. L'apparition de critères cliniques tels que perte de poids (détermination du poids des animaux deux fois par semaine), vivacité, mobilité, aspect du poil, tumeur palpable, sera évaluée et, le cas échéant, les animaux seront sacrifiés par dislocation cervicale.

Pour cette étude, 2700 souris dont C57Bl/6J, B6.129S1-Tlr7tm1Flv/J (TLR7 KO) et NOD/SCID seront nécessaires. Afin d'assurer une validité statistique aux expériences, un nombre de 5 à 10 souris par groupe sera utilisé (selon les expériences); Par ailleurs, chaque expérience sera répétée trois fois.

5020. Notre projet consiste en l'élucidation du rôle de la régulation spatio-temporelle des microtubules et des moteurs moléculaires lors de la formation du fuseau mitotique, étape clé de la vie des cellules, qui lors d'erreurs peut conduire à de nombreux dysfonctionnements (cancer).

Le caractère innovant de ce projet réside dans l'utilisation d'un nouvel outil basé sur les méthodes de la microfluidique pour mettre en évidence les mécanismes permettant d'expliquer la persistance, l'adaptabilité ou la fragilité de la morphologie (bipolarité, multipolarité) face à un environnement cytoplasmique fluctuant. L'utilisation combinée de systèmes modèles de biologie (Xénope) et de techniques biophysiques permet la quantification des anomalies éventuelles (multipolarités, aneuploidie) dans la morphologie du fuseau due à la modification de la concentration de régulateurs clés (Ran, OP18, Chromosomes, Eg5...). L'originalité de nos approches repose sur la combinaison de techniques à l'interface entre la Biologie, la Physique et la Chimie

pour tenter de décrire cet interactome très complexe qui aboutit à la division d'une cellule. Cette approche, appliquée à l'étude de la morphogenèse du fuseau mitotique/méiotique dans le modèle de Xénope, est inédite à ce jour et devrait permettre d'obtenir des résultats pertinents de premiers plans.

Nous avons réalisé un premier prototype robuste d'une cellule microfluidique et une preuve de concept de l'étude sur le fuseau de Xénope. Nos méthodes pourraient être utilisées par la communauté scientifique pour sonder de nouvelles molécules synthétiques ou naturelles avec une approche microfluidique, complémentaire au criblage automatique.

Sur la durée du projet, le nombre d'animaux nécessaires est estimé à 30 avec aucune euthanasie (sauf si les points limites sont franchis).

Nous respectons les règles des 3Rs. Les protocoles expérimentaux employés minimisent le stress, la douleur et les lésions aux animaux. Les pontes sont réalisées avec une manipulation minimale des animaux qui sont retournés à l'animalerie le plus tôt possible. Pour le remplacement. Il n'y a pas de système biologique alternatif aux expériences effectuées. Ce système, très utilisé par le monde, est le seul qui permette d'auto-organiser le fuseau méiotique avec une bonne efficacité et de façon régulée par le cycle cellulaire. La réalisation du projet se fera suivant les règles de bonnes pratiques d'expérimentation animale. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au strict minimum.

5021. L'électrotransfert d'ADN a été très largement utilisé *in vitro* pour transférer des bactéries, des levures mais aussi des cellules animales comme des cellules souches ou encore des cellules différenciées. Ce procédé d'électro-génothérapie (EGT) est actuellement bien caractérisé chez l'animal et fait l'objet des toutes premières évaluations cliniques.

En effet, pour obtenir une biodisponibilité optimale, l'ADN est généralement directement inoculé dans le tissu cible. Puis, on utilise un dispositif expérimental d'électrotransfert comporte un générateur d'impulsions électriques (électro- pulsateur) auquel sont reliées des électrodes placées autour ou dans le tissu cible. Les impulsions électriques sont générées par l'électro-pulsateur et appliquées après inoculation de l'ADN à l'aide des électrodes.

Le muscle ciliaire lisse nous est apparu comme une cible idéale de thérapie génique : (i) seul muscle intraoculaire, il était potentiellement utilisable comme « organe sécréteur » pour produire des protéines dans l'œil, à l'image du muscle squelettique électrotransféré sécrétant des protéines dans la circulation générale ; (ii) sa localisation stratégique au carrefour des segments antérieur et postérieur de l'œil permettait d'envisager une sécrétion dans les deux segments oculaires ; (iii) il était situé à proximité de la surface oculaire et constitué de cellules non neuronales ce qui rendait son ciblage faiblement invasif et potentiellement sans conséquence sur le cheminement de l'information visuelle.

Cette étude sera réalisée sur l'espèce Lapin (*Oryctolagus cuniculus*) pour démontrer la faisabilité de la technique d'Electro-transfection, procédure invasive, de façon chirurgicale d'une durée inférieure à 5mn. L'ensemble de l'étude couvrira autant la faisabilité que les mises au point de différents paramètres, et nécessitera au maximum 84 Lapins. Le nombre maximum de prélèvements par animal sera de 3 prélèvements (ponction oculaire d'humeur Aqueuse et de vitré) sur la cinétique d'expression de la protéine.

Dans le cadre de la règle des 3R:

1- le modèle Lapin est le seul modèle expérimental pour démontrer la faisabilité de notre technologie, d'un point de vue physiologique, morphologie de l'œil, et du coût lié à l'expérimentation. En effet, la faisabilité ainsi que les efficacités préclinique chez le rat ont été déjà montrées. Pour le développement du dispositif humain, le lapin à une taille d'œil ainsi que le muscle ciliaire proche de l'homme (le cochon ne pouvant être utilisé pour le développement du dispositif à cause de l'épaisseur de la sclère et la forme de la cornée).

2- le nombre d'animaux dans chaque étude a été particulièrement étudié pour obtenir un nombre suffisant d'yeux (obtention d'assez de données pour obtenir des statistiques) sans en utiliser excessivement.

3- la technologie d'Electro-transfert est une technique non traumatique et de courte durée; des points critiques sont prévus en cas de non production de la protéine dans l'œil. Des animaux seront sacrifiés ou les études arrêtées si les animaux présentent des inflammations oculaires trop importantes

5022. Les plaquettes sanguines jouent un rôle fondamental dans les processus d'hémostase. C'est ce qui nous permet d'éviter les hémorragies en cas de blessures ou de lésions. Quand le taux de plaquettes circulantes chute en dessous de 30.000 plaquettes par μL de sang chez un patient, le risque d'hémorragie interne devient important et une transfusion peut être envisagée. Une complication post transfusionnelle connue est la production d'anticorps anti-plaquettes par le receveur dirigés contre les plaquettes du donneur, on parle alors d'allo-immunisation. Ainsi, si le receveur développe de tels anticorps de nouvelles transfusions seront inefficaces sur un plan thérapeutique puisque les plaquettes du donneur seront détruites par ces anticorps. Cette problématique est particulièrement importante chez des patients dont les pathologies nécessitent des transfusions plaquettaires récurrentes (thérapie anti cancéreuse par exemple).

Définir les mécanismes qui conduisent à la production d'anticorps anti-plaquettes permettrait de mettre en place des stratégies pour prévenir la production de tels anticorps et les complications qui en découlent.

La compréhension de tels mécanismes nécessite la mise en place d'un modèle animal d'allo-immunisation afin de pouvoir prélever, après la transfusion, différents échantillons (organes, sang,...) et analyser la prise en charge des plaquettes transfusées et les mécanismes immuns qui en découlent. Ce modèle repose sur la différence génétique entre donneur et receveur ainsi nous devons travailler avec des animaux de fond génétique différent. La consanguinité des souris et la bonne connaissance de leur système immunitaire en font un modèle de choix. Nous utiliserons donc des souris « donneuses » différentes génétiquement des souris « receveuses ». Ce modèle nous permettra de produire des allo-anticorps plaquettaires et nous sera utile pour étudier les

événements initiaux de la prise en charge des plaquettes du donneur par les cellules de la rate du receveur. L'activation du système immunitaire du receveur suite à la transfusion sera caractérisée finement en termes de sécrétion de cytokines (des médiateurs solubles qui déterminent le type de réponse immune engagée) et en termes de populations cellulaires présentes (nombre de cellules, quel sous types de cellules, statut d'activation de ces cellules).

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimisés, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives avec un test de type Student. Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires et dans la mesure du possible, dans les expériences qui l'exigent, le sang et les tissus seront prélevés sur les mêmes animaux.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront réduites au minimum et remplacées par des études in vitro sur cellules (tests de phagocytose et tests d'activation cellulaire).

Raffiner : Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Ils ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture.

Ce projet nécessitera 526 souris.

5023. L'anguille est une espèce classée par l'IUCN en danger critique d'extinction. Sa conservation fait l'objet d'un plan de gestion européen décliné par chaque état. Le choix des mesures de gestion à mettre en place se heurte à une méconnaissance de certaines données biologiques de base telles que le sexe ratio. En effet, chez l'anguille le sexe est déterminé par l'environnement, et on connaît très mal les facteurs agissant sur ce déterminisme. De plus l'examen histologique des gonades ne permet pas de connaître le sexe des individus avant que ceux-ci aient atteint une trentaine de cm. Une méthode consiste à déduire le sex ratio sur la base des effectifs automnaux des pré-migrants échantillonnés par pêche électrique. Cependant, cette méthode se heurte à la difficulté d'échantillonnage des milieux profonds qu'occupent les plus gros individus, et au faible nombre d'anguilles argentées effectivement capturées. Ainsi, un échantillonnage d'anguilles juvéniles, plus faciles à capturer car avec une préférence d'habitat pour les milieux peu profonds permettrait d'obtenir une estimation du sexe ratio. Pour cela, il est nécessaire de posséder un outil d'identification précoce du sexe, autre que l'histologie car le tissu des gonades n'est pas différencié chez les jeunes individus.

La quantité relative d'ARN dans la gonade peut être mesurée et attribuée spécifiquement à l'activité de certains gènes qui sont impliqués dans le déterminisme du sexe. Ainsi, la capacité de 6 marqueurs précoces à discriminer le sexe parmi des anguilles entre 29 et 40 cm (c'est à dire avec des gonades histologiquement différenciées), et la capacité de ces mêmes marqueurs à discriminer les anguilles juvéniles (sans gonades différenciées histologiquement) provenant de deux sites caractérisés par des sexe ratio fortement biaisés ont été confirmés dans une étude précédente. Dans le cadre de ce projet, nous cherchons à valider les estimations de sex ratio sur ces deux sites en confrontant de nouvelles données sur l'expression des gènes (2017) à des données sur le sexe ratio d'anguilles de la même cohorte et échantillonnées sur les mêmes sites, avant leur argenture. Cela nécessitera un échantillonnage des anguilles jaunes de 20 à 25 cm en année 1, puis de 30-40 cm en année 2 et 3, soit 2018 et 2019.

Réduire : Les anguilles seront obtenues en les achetant à des pêcheurs et nous ciblerons 80 individus par année et par site (soit 480 poissons), ce qui étant donné les contraintes de notre protocole correspond à l'effectif minimal nécessaire pour obtenir une estimation du sexe ratio avec des incertitudes acceptables. Effectivement, aujourd'hui nous ne sommes pas encore capables d'établir précisément les enveloppes autour des niveaux d'expression pour discriminer entre mâle et femelle, et ce travail devrait justement nous permettre d'y parvenir.

Raffiner : Les anguilles seront transportées par lot de 80 individus maximum dans des bacs de 100l jusqu'à un laboratoire (temps de transport inférieur à 2 heures dans de l'eau thermo-régulée et aérée) et conservées à jeun (moins de 24h) dans un bassin thermorégulé et aéré avant d'être anesthésiées.

Remplacer : Il n'est malheureusement pas possible de remplacer l'anguille par une autre espèce car son déterminisme du sexe est particulier (déterminisme environnemental), mais outre le fait qu'en achetant à des pêcheurs, nous n'augmentons pas la pression de prélèvement sur la population, d'autres prélèvements auront lieu sur animal mort (otolithes, tissu cutané, musculaire, vessie nataoire, fèces...) afin de maximiser le niveau de rentabilité de ces individus sacrifiés.

5024. Dans les pays développés, le cancer du sein est le plus fréquent chez la femme, et malgré les progrès importants obtenus ces dernières années pour sa détection et l'efficacité des thérapies ciblées, il reste la première cause de mortalité par cancer. Outre l'augmentation constante du nombre de cas, ceci est dû au manque de traitement pour les tumeurs les plus agressives. Il est donc nécessaire d'identifier de nouveaux marqueurs diagnostiques et cibles thérapeutiques pour ces cancers.

Notre laboratoire étudie un régulateur des jonctions serrées des tissus épithéliaux. In vitro, en utilisant des modèles cellulaires mammaires humains, nous avons établi qu'il agit comme un antagoniste au développement tumoral grâce à sa capacité à maintenir l'organisation architecturale des tissus épithéliaux. L'analyse de larges collections de tumeurs mammaires humaines a révélé que la perte d'expression de notre protéine d'intérêt est associée à un sous-type agressif et corrélée avec une forte diminution de la survie à 5 ans.

Notre premier objectif est donc de démontrer in vivo un lien de cause à effet entre la perte d'expression de notre protéine d'intérêt et le développement tumoral mammaire. La glande mammaire étant constituée de deux populations épithéliales, nous déterminerons également si la perte d'expression de notre protéine a un impact distinct sur ces populations. Nous souhaitons aussi déterminer si la perte d'expression de notre protéine contribue à l'orientation de la progression tumorale vers le sous-type agressif identifié dans notre étude des tumeurs de patientes. Ces trois questions ne peuvent être adressées que par des approches in vivo.

Nous proposons de réaliser deux procédures: procédure 1) avec des souris immunodéficientes (type NSG) nécessaires pour effectuer les xélogreffes orthotopiques de lignées mammaires humaines; procédure 2) avec des souris sauvages dans lesquelles

des greffes syngéniques orthotopiques seront effectuées avec des cellules mammaires isolées à partir de souris modifiées génétiquement qui développent spontanément des tumeurs mammaires comparables aux tumeurs humaines. Dans les 2 cas, nous injecterons des cellules mammaires dans lesquelles nous aurons réprimé l'expression de notre protéine d'intérêt puis nous suivrons la croissance tumorale primaire et l'apparition de métastases. L'ensemble des expériences proposées permettra d'établir si la perte d'expression de notre protéine aura un impact sur le développement tumoral et sur l'orientation vers un ou des sous-types cancéreux particuliers.

La pertinence et la faisabilité de ces études ont été établies lors d'une expérience préliminaire conduite par le laboratoire d'un collaborateur. Cette première expérience a montré que des cellules mammaires humaines faiblement tumorales dans lesquelles nous avons réduit l'expression de notre protéine ont produit des tumeurs deux fois plus rapidement que les cellules non modifiées. La perte de notre protéine semble donc être un facteur pro-tumoral, ce que les expériences proposées dans ce projet permettront de confirmer et de préciser.

En préparant ce projet nous avons pris soin de minimiser le nombre d'animaux utilisés et de mettre en oeuvre des procédures en accord avec le bien-être animal.

Par le passé, nous avons analysé le pouvoir tumorigène in vitro de nombreuses lignées mammaires humaines dans lesquelles nous avons réprimé l'expression de notre protéine. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, tout en restant en capacité de répondre aux questions scientifiques posées, nous avons restreint notre étude à 4 lignées cellulaires. Pour analyser l'orientation vers le(s) sous-type(s) agressif(s) nous proposons de commencer l'étude avec un seul modèle de souris.

Sur la base de nos résultats et de ceux obtenus par d'autres laboratoires ayant suivi les mêmes procédures, nous avons calculé au plus près le nombre minimum d'animaux à utiliser pour donner des résultats statistiquement significatifs en nous appuyant à la fois sur le résultat d'expériences pilotes réalisées par nos collaborateurs, et sur des calculs de puissance statistique. Après le sacrifice des animaux, nous prélèverons les tumeurs primaires ainsi que les organes susceptibles d'abriter des métastases pour des analyses ultérieures et ainsi récolter le maximum de données sur un minimum d'animaux. Dans un souci de raffinement, toutes nos procédures prévoient des protocoles d'anesthésie et d'analgésie adaptés. Les animaux en cours d'expérimentation feront par ailleurs l'objet d'un suivi systématique à travers une fiche individuelle d'observation appuyée sur une grille de score permettant de détecter les signes de souffrances et prévoyant la mise en oeuvre de points limites précoces et adaptés le cas échéant.

Ce projet nécessitera 141 souris.

5025. Le développement de nouvelles nanoparticules combinant des propriétés thérapeutiques, d'imagerie et de ciblage pour créer de nouvelles stratégies de traitement du cancer est en plein essor. Le cancer du côlon étant le 3^{ème} cancer le plus fréquent et le 2^{ème} le plus mortel en France, et le nombre de personnes atteintes étant en augmentation, il est important de rechercher des alternatives aux traitements actuels.

Notre projet consiste à évaluer de nouvelles vésicules biocompatibles pour le suivi d'une thérapie du cancer du côlon (CT26) chez la souris. Ces vésicules sont des capsules commercialement utilisées pour incorporer des médicaments, appelées liposomes. Ils pourront être accumulés dans une tumeur grâce à un aimant. L'encapsulation d'un médicament antitumoral est combinée à l'application d'un échauffement provoqué par des ultrasons focalisés de hautes intensités (HIFU) dans la tumeur pour permettre une libération du médicament localisé dans la région d'intérêt.

Les méthodes d'Imageries par Résonance Magnétique (IRM) et de fluorescence sont des outils de diagnostic in vivo non invasifs et atraumatiques chez le petit animal. L'IRM est un dispositif hospitalier utilisé chez l'Homme pour le diagnostic et suivi thérapeutique. Les Ultrasons Focalisés de Hautes Intensités (HIFU) sont non invasifs, et aussi utilisés en clinique.

La compatibilité biologique de ces nouveaux liposomes est préalablement testée sur cellules. La mise au point de notre stratégie thérapeutique de relargage actif par HIFU du médicament est d'abord effectuée sur cellules tumorales et permet de remplacer autant que possible l'utilisation d'animaux par des cultures cellulaires.

Il est ensuite essentiel d'étudier la biodistribution, le ciblage par aimant et la libération active par ultrasons in vivo de ces vésicules. L'efficacité des liposomes chargés en molécules antitumorales sera évaluée en comparaison avec un traitement sans ciblage magnétique et/ou sans relargage actif du principe actif.

Des souris saines seront utilisées dans un premier temps pour évaluer la biodistribution générale des liposomes. Ensuite, un modèle de souris tumorale CT26 permettra de valider les propriétés de ciblage et de relargage actif de molécules antitumorales dans la tumeur ainsi que l'efficacité du traitement.

Les souris tumorales comporteront 2 tumeurs, ainsi chaque souris constitue son propre contrôle ou pourra permettre de tester 2 conditions dans le cas des traitements avec HIFU. Le nombre d'animaux utilisés sera ainsi diminué.

Toutes les expériences in vivo seront réalisées sous anesthésie. Les animaux ainsi surveillés ne présenteront pas de douleur. De plus, des points limites sont définis afin de prévenir la douleur éventuelle de l'animal et entraînant sa mise à mort si nécessaire.

Ce projet utilisera au total : 980 souris pendant 5 ans, et est basé sur une méthode d'observation sous anesthésie, par imagerie non invasive, permettant le suivi de groupes, donc pas de sacrifice séquentiel pour contribuer au raffinement et à la réduction du nombre de souris.

A terme, les résultats de ce projet auront permis de développer une méthode de traitement personnalisé contre le cancer du côlon CT26, applicable à d'autres types de tumeurs.

5026. Les troubles anxieux sont particulièrement fréquents dans les pays industrialisés. Ainsi, il est estimé que 13 à 22% des habitants de ces pays développeront une pathologie anxieuse au cours de leur vie. Par ailleurs, les états anxieux sont impliqués dans l'apparition de pathologies d'ordre psychiatrique avec, au-delà de l'aspect individuel, un coût important pour la société. Par

exemple, le trouble de l'adaptation avec anxiété est à l'origine d'environ 9% des consultations de médecine générale pour motif psychologique en France. L'évaluation de l'efficacité de nouveaux composés pour traitement de l'anxiété nécessite d'observer le comportement animal dans des conditions adéquates.

Le test de la boîte clair-obscur est l'un des modèles d'évaluation de l'anxiété les plus utilisés chez la Souris. Il présente l'avantage majeur d'être sensible à de nombreux types de molécules utilisées en clinique humaine. Sa sensibilité aux molécules pharmacologiques telle que la buspironne en plus des anxiolytiques plus classiques comme les benzodiazépines, rend ce modèle très pertinent pour l'évaluation des effets anxiolytiques des molécules en cours de développement. L'utilisation d'animaux est nécessaire pour étudier les effets anxiolytiques de nouveaux produits car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) (remplacement).

Ce test est basé sur l'aversion naturelle des rongeurs pour la lumière.

Le dispositif expérimental est composé de 2 compartiments juxtaposés, le compartiment clair aux parois blanches qui est ouvert, et le compartiment sombre aux parois noires qui est fermé. Une ouverture dans la cloison centrale permet le passage de l'animal d'un compartiment à l'autre. Au cours du test l'animal peut explorer librement le dispositif pendant 5 minutes. Dans cette situation, le compartiment clair induit un état d'anxiété plus important pour l'animal que le compartiment sombre, on dit qu'il est plus anxiogène. Le niveau d'anxiété sera évalué par la comparaison entre le temps passé dans chacun des compartiments, le nombre de transitions entre les compartiments ainsi que la distance parcourue. Ainsi par exemple plus un animal sera anxieux plus il passera de temps dans le compartiment sombre ; en revanche l'administration d'un traitement anxiolytique devrait permettre aux animaux de diminuer le temps passé dans le comportement sombre au profit du compartiment clair.

L'objectif de ce projet est de tester l'interaction entre la souche et les traitements pharmacologiques, ainsi que l'effet du temps d'hébergement en animalerie avant la réalisation du test, ce dernier paramètre pouvant influencer le niveau d'anxiété des animaux. Nous appliquerons dans ce projet une nouvelle méthode de planification expérimentale identique à celle utilisée dans un précédent projet : alors que la méthode classique nécessiterait l'utilisation de 288 souris, la méthode de planification utilisée permet de réduire l'effectif à seulement 96 souris (réduction, raffinement).

Ainsi 48 souris seront hébergées pendant 3 semaines et 48 souris seront hébergées pendant 1 semaine avant la réalisation du test.

Les 96 souris du projet seront traitées par voie orale avec un placebo pendant les 3 jours précédents le test pour les habituer au traitement par voie orale (procédure 1) et le jour du test avec le placebo ou les composés pharmacologiques de référence 1 heure avant leur passage dans le test de la boîte clair-obscur. Les animaux seront placés à jeun pour la réalisation du test (procédure 2). Le test de la boîte clair-obscur sera effectué pendant 5 minutes pour chaque souris comme décrit précédemment (procédure 3).

Les animaux seront hébergés à 2 par cage avec un enrichissement du milieu (feuille de papier absorbant). Des points limites concernant une perte de poids de 20% du poids maximum ou de 15% cumulés sur 3 jours consécutifs, une souffrance (cachexie, affaiblissement, hypothermie persistante), difficulté à bouger ou à manger, diarrhée pendant au moins 48h, seront suivis et toute atteinte de l'un de ces points limites entrainera la mise à mort des animaux en conformité avec les recommandations éthiques (Raffinement).

A la fin des expérimentations, les animaux seront mis à mort par injection d'une surdose d'anesthésique.

5027. Nous avons démontré que la molécule X309 a des effets positifs sur la régénérescence musculaire et hématopoïétique (cellules sanguines). Nous souhaitons maintenant vérifier si cette molécule est également efficace dans le cadre de la régénérescence de la peau. Pour ce faire nous utiliserons 50 souris C57Bl/6 avec une seule procédure expérimentale. Le but étant de vérifier si l'application de notre molécule a des effets bénéfiques sur la fermeture des cicatrices de la peau. Dans les grandes lignes nous effectuerons une petite cicatrice sur la peau de l'animal et mesurerons la fermeture de celle-ci au cours du temps. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés nous utiliserons au maximum un modèle de peau in vitro développé notamment pour la recherche en cosmétique. La blessure quant à elle sera superficielle afin de ne pas faire souffrir les animaux.

5028. La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Elle se caractérise par une mort sélective des neurones moteurs situés dans le système nerveux central, par de l'atrophie musculaire et de la paralysie. Le décès des patients intervient trois à cinq ans après diagnostic.

L'axe principal de la pathologie correspond à l'axe moteur, et les principaux tissus impliqués dans la pathologie sont la moelle épinière, les nerfs moteurs et les muscles squelettiques. L'étude de l'interaction de ces 3 acteurs est la clé de la recherche sur cette pathologie. Une partie des cas de SLA est d'origine familiale (SLAF), et des mutations dans plus de 10 loci sont actuellement connues pour provoquer la SLAF.

Nous disposons au laboratoire d'un modèle murin de la maladie basé sur une mutation du gène *Fus*, qui provoque la forme la plus sévère de la maladie avec des patients débutant les symptômes entre 15 et 30 ans et décédant en quelques mois.

Ce modèle conditionnel permet de contrôler l'expression de la mutation à un âge donné et dans un type cellulaire donné.

Nous proposons ici d'utiliser des techniques de transfert de gène par vecteur viral pour provoquer l'expression de la mutation uniquement dans les motoneurones.

Les souris seront suivies pour le développement de signes de SLA et mis à mort à l'apparition de ces signes ou à 6 mois d'âge au plus tard. Les souris seront mises à mort par injection intra-péritonéale d'une dose létale de pentobarbital.

Les données phénotypiques seront analysées par des ANOVA avec mesure répétées.

Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation des protocoles. Les groupes expérimentaux ont été réduits au maximum pour permettre une robustesse statistique et 184 animaux seront inclus dans l'étude.

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

5029. Presque 20% de la rétine est composée de lipides dont plus de la moitié sont des acides gras polyinsaturés. L'acide docosahexaénoïque (DHA) est un de ces acides gras de type oméga-3 qui se retrouve dans les segments externes des photorécepteurs où il participe activement au codage de l'information lumineuse en influx nerveux. Sa forte concentration dans la rétine et ses propriétés anti-inflammatoires suggèrent un rôle favorable dans les pathologies rétinienne, comme le rapportent les études épidémiologiques qui montrent une réduction du risque de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), première cause de cécité dans les pays industrialisés pour les plus de 65 ans, avec la consommation d'oméga-3 (essentiellement DHA et acide eicosapentaénoïque ou EPA). Si les facteurs de risque de la DMLA sont bien identifiés, les moyens curatifs restent limités aux formes néovasculaires. C'est pourquoi à ce jour, les mesures de prévention doivent être amplifiées.

Les produits de la mer sont les sources principales de ce type d'acides gras oméga-3. Cependant leur consommation reste inférieure aux recommandations de l'ANSES. Les compléments alimentaires à base d'oméga-3 permettent de fournir les apports recommandés en EPA et DHA. En revanche, toutes les sources d'oméga-3 ne sont pas équivalentes en termes de proportion d'EPA et de DHA et de forme d'apport (triglycérides ou phospholipides). A ce jour aucune étude n'a permis de montrer une efficacité différente d'une source alimentaire riche en EPA ou en DHA sur le profil en acides gras de la rétine. Aussi, nous souhaitons définir la biodisponibilité de l'EPA et du DHA selon leur source d'origine. Ce projet sera mené chez le rat qui sera soumis pendant 3 mois à 5 conditions nutritionnelles différentes : standard sans EPA ni DHA, huile de poisson riche en EPA sous forme de triglycérides, huile de poisson riche en DHA sous forme de triglycérides, huile marine riche en EPA sous forme de phospholipides, huile marine riche en DHA sous forme de phospholipides. Des analyses lipidiques seront effectuées après mise à mort des animaux. Cette étude nécessitera l'utilisation de 10 rats par condition de régime (6 pour les dosages lipidiques dans les différents tissus incluant la rétine et 4 pour l'imagerie de la rétine par spectrométrie de masse), soit un total de 50 animaux.

La mise en œuvre du projet s'inscrira dans la règle des 3R. Le nombre d'animaux utilisé est justifié par la distribution a priori non normale des données et la différence attendue entre les groupes (+10% de DHA dans la rétine, risque $\alpha=0.05$, puissance $1-\beta=0.9$). Du fait du nombre limité de reliquats biologiques, un test non paramétrique sera utilisé.

L'étude est exclusivement nutritionnelle et ne générera aucune douleur, souffrance. Le stress des animaux sera limité à l'acclimatation aux conditions expérimentales. Ils seront manipulés par des agents disposant des habilitations requises. Une structure chargée du bien-être animal veillera et aidera les expérimentateurs à améliorer les conditions d'élevage des animaux.

Seul un modèle animal peut rendre compte du métabolisme des acides gras alimentaires et de leur incorporation dans les tissus, incluant la rétine.

5030. Les défaillances des mécanismes de coagulation du corps aboutissent à des pathologies bien connues comme l'hémophilie. Bien qu'il existe plusieurs causes, les symptômes consistent principalement en une hémorragie excessive et une absence de coagulation. Il est important d'identifier rapidement le potentiel pro- ou anticoagulant de toute nouvelle molécule à visée thérapeutique. L'objectif général de ce projet est d'évaluer le potentiel pro ou anticoagulant de nouveaux candidats médicaments chez le rat.

Pour cela, dans chaque étude et après administration du produit testé (3 doses), du produit de référence positif ou du véhicule ayant servi à préparer la formulation du produit testé, un saignement sera provoqué chez l'animal anesthésié et le temps nécessaire à l'animal pour coaguler sera mesuré (test du temps de saignement). Un produit ayant une activité procoagulante diminuera le temps de saignement en comparaison du groupe contrôle, alors qu'un produit anticoagulant aura l'effet inverse.

Pour ce projet, un maximum de 1500 animaux pourra être utilisé sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement : dans le cadre du développement de certains nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets pro ou anticoagulants. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'un candidat médicament. A ce jour, le rat est l'espèce la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : un nombre minimal et homogène d'animaux est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est effectué par :

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à l'utilisation d'anesthésie et d'analgésie pour diminuer la douleur
- le suivi des signes cliniques et des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

5031. Le projet porte sur une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* homologuée pour les chevaux par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) avec l'allégation « amélioration de la digestibilité ». Pour le renouvellement par l'EFSA de l'homologation de cette levure un test d'efficacité *in vivo*, réalisé en conditions contrôlées est nécessaire.

Le présent projet vise à déterminer l'effet d'une supplémentation avec une dose de levure *S. cerevisiae* sur la digestibilité totale de la ration.

Huit chevaux de race Trotteur Français seront intégrés dans le projet. L'essai doit nécessairement être réalisé sur des chevaux car c'est l'espèce cible. L'utilisation de huit individus est souhaitée pour obtenir la puissance statistique nécessaire pour les dossiers EFSA. Les chevaux seront répartis en deux groupes de quatre chevaux recevant chacun, suivant la période, une ration « témoin » ou la même ration supplémentée avec la dose recommandée de levure. Chaque période durera trois semaines et sera séparée de la suivante par trois semaines de « wash-out » pour limiter les risques d'effet rémanent.

A la fin de chaque période, la digestibilité de la ration sera mesurée par récolte totale des fèces pendant quatre jours grâce à des harnais de digestibilité. Un prélèvement de fèces sera effectué par fouille rectale le jour précédent la pose des harnais de digestibilité pour mesurer les modifications de l'écosystème fécal (activité enzymatique, composition bactérienne et activité microbienne).

Les chevaux seront observés quotidiennement afin de vérifier leur état de santé et de bien-être, et ils seront pesés une fois par semaine. En cas de rupture de cet état, sur conseil vétérinaire, tout animal sera retiré du protocole et soigné.

5032. Les différents tissus de l'organisme sont approvisionnés en sang par les artères. Plus on s'éloigne du cœur, plus le calibre de ces artères est réduit. Les petites artères périphériques, comme les artères de la peau, ont la capacité de se contracter afin de contrôler la répartition du flux sanguin dans les différents organes de l'organisme. Le niveau de contraction de ces artères est sous le contrôle de différents éléments, dont des nerfs innervant ces artères. Ces nerfs appartiennent au système nerveux sympathique, qui est impliqué dans toutes les réactions au stress non conscientes (accélération du rythme cardiaque par exemple).

Nous avons mis en évidence que l'Ephrine-A4 est une protéine exprimée par les artères chez la souris au cours du développement et chez l'adulte, et son récepteur EPHA4 par les neurones sympathiques les innervant. Les souris chez lesquelles le récepteur EPHA4 a été génétiquement inactivé spécifiquement dans les neurones sympathiques présentent une plus grande densité de nerfs autour des artères qu'une souris sauvage, ainsi qu'un épaississement de la paroi de leurs artères. Nous pensons que ces deux modifications pourraient favoriser l'apparition d'une hypertension artérielle chez ses souris. Si tel est le cas, nos travaux pourraient conduire à la proposition de nouveaux traitements pour cette maladie dont l'importance tant d'un point de vue économique que de santé publique ne cesse de croître.

L'espèce animale utilisée est la souris. Nous avons choisi la souris car ce modèle présente un bon compromis entre la proximité physiologique avec l'Homme et la facilité de manipulation génétique. Notamment, les valeurs de pression artérielle qui nous intéressent dans ce projet sont similaires entre l'Homme et la Souris.

Le nombre d'animaux total requis pour ce projet est 240 animaux.

Ce projet respecte les principes énoncés par les 3R :

Remplacement : nous avons réalisé le maximum d'expérimentation *in vitro* avant de passer à l'expérimentation sur l'animal. Ce projet nécessitant la mesure de la pression artérielle, il n'est pas possible dans ce cas de s'affranchir de l'expérimentation animale.

Réduction : le nombre d'animaux utilisés correspond au minimum nécessaire pour obtenir un résultat scientifique valide.

Raffinement : les souris sont hébergées en groupe dans un milieu enrichi en coton de nidification ; toutes les précautions sont prises afin de réduire leur stress au minimum lors des transports ; toutes les procédures douloureuses sont précédées d'une injection d'antidouleur ; tout animal présentant des signes de douleur ou de dégradation de l'état général sera exclu de la procédure en cours.

5033. Le carcinome hépatocellulaire (ou hépatocarcinome - 90% des cancers du foie) est le 5e cancer dans le monde par ordre de fréquence, le 3e cancer le plus létal et le plus fréquent des cancers primitifs du foie. L'incidence annuelle mondiale est d'environ 500 000 nouveaux cas par an et son incidence dans les pays développés a particulièrement augmenté ces vingt dernières années.

Par ailleurs, les cancers du foie sont dans la plupart des cas des localisations secondaires d'autres cancers ayant métastasé, c'est à dire des cellules cancéreuses ayant migré à partir d'un site tumoral primitif. C'est notamment le cas des cancers du sein, du colon/rectum (et globalement du tractus gastro-intestinal) ou du poumon. Les métastases peuvent apparaître parfois plusieurs années après résection de la tumeur primaire originale. Les métastases sont une cause majeure de mortalité.

Etant donné le pronostic clinique particulièrement sombre de ces tumeurs hépatiques, il est indispensable de disposer de modèles expérimentaux pertinents, en particulier chez l'animal afin de permettre un passage efficace des candidats-médicaments de la préclinique à la clinique.

Le projet consiste à évaluer les effets anti-tumoraux de différentes approches thérapeutiques (chimiothérapie - dont les immunothérapies - associée ou non à une radiothérapie) dans des modèles expérimentaux de tumeurs hépatiques primitives ou de métastases hépatiques induites par l'injection de cellules tumorales directement dans la veine qui irrigue le foie (système porte hépatique) chez les rongeurs (souris/rat). Les cellules tumorales inoculées par voie intraveineuse vont coloniser le foie et former des tumeurs.

Un suivi longitudinal et non-invasif de la croissance tumorale peut être réalisé par l'utilisation des techniques d'imagerie optique comme la bioluminescence et la fluorescence *in vivo*, ou l'imagerie par résonance magnétique.

La durée totale de chaque étude dépend de la cinétique de croissance tumorale *in vivo* des cellules implantées ainsi que de l'apparition des signes cliniques associés à la tumeur (de quelques jours à plusieurs semaines selon le type et l'origine des cellules

tumorales implantées). En fin d'expérience, le foie pourra être prélevé pour analyse. Des prélèvements de sang pourront avoir lieu en cours de suivi pour l'évaluation de biomarqueurs par exemple. D'autres prélèvements de tissus pourront être effectués en phase terminale.

Au cours de chaque étude de ce projet, différents groupes d'animaux seront constitués (en général 4 groupes avec 10 animaux par groupe). Pour ce projet d'une durée de 5 ans, il est prévu un nombre maximum de 1200 souris (4 groupes de 10 souris par étude x 6 études par an x 5 ans) et 400 rats (4 groupes de 10 rats par étude x 2 études par an x 5 ans).

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R

- Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur (souris ou rat) car il n'existe pas de méthode alternative (in vitro ou in silico) permettant de se substituer complètement aux essais in vivo pour évaluer les effets d'une nouvelle approche thérapeutique sur les tumeurs hépatiques primitives ou secondaires. À ce jour, les rongeurs (souris ou rat) sont les espèces les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

- Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par étude est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique. L'utilisation d'une technique d'imagerie longitudinale et non-invasive (quand cela est possible) pour le suivi des tumeurs permet de réduire le nombre d'animaux par étude puisque cela ne nécessite pas de sacrifier les animaux à des temps intermédiaires pour prélever le foie.

- Raffinement : Ce projet fait l'objet de procédures rigoureuses réalisées par un personnel formé et vigilant quant à la détection de points limites (suivi quotidien de l'état de santé des animaux) et fait recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

5034. La résorption de l'os alvéolaire consécutive à la perte dentaire est un problème de santé publique important puisque 30% de la population européenne est confrontée à ce problème. Cette résorption osseuse complique les soins dentaires, notamment la chirurgie implantaire.

Alors que d'énormes efforts sont concentrés sur les problèmes de perte osseuse du squelette appendiculaire (ostéoporose), il n'y a que peu de résultats qui concernent l'os alvéolaire. Or, la physiopathologie des mâchoires démontre que l'os alvéolaire est caractérisé par des mécanismes cellulaires originaux qui diffèrent de ceux des os appendiculaires: cinétique de remodelage très rapide, réactivité exceptionnelle aux contraintes mécaniques (exploitée en orthodontie pour déplacer les dents), et hypersensibilité aux variations métaboliques (ostéonécrose des mâchoires sous traitements anti-ostéoporotiques). Il est donc important de comprendre la spécificité de cet os et les mécanismes impliqués dans la perte et la réparation osseuse. Récemment, des études sur la souris ont montré que les ostéoblastes (les cellules souches de l'os) isolés à partir de la mandibule présentent des capacités de régénération différentes de ceux isolés de la crête iliaque. Ceci pourrait être dû à l'origine embryologique des ostéoblastes. En effet, au cours de la formation osseuse, les ostéoblastes des os appendiculaires dérivent exclusivement du mésoderme, tandis que la crête neurale (neuroectoderme) contribue également à ceux des os cranio-faciaux. Néanmoins, l'origine embryologique des cellules contribuant à la réparation osseuse chez l'adulte consécutive aux extractions dentaires est aujourd'hui inconnue.

Dans ce projet, nous proposons d'extraire les molaires M2 et M3 de souris génétiquement modifiées afin de pouvoir visualiser et suivre in vivo des cellules osseuses issues des crêtes neurales ou dérivant du mésoderme. L'analyse histologique par traçage cellulaire (souris transgéniques avec marqueurs fluorescents, hybridation in situ et immunodétection) nous permettra de déterminer la contribution embryologique des cellules impliquées dans la réparation osseuse post-extractionnelle.

Dans ce projet, nous avons tout fait pour mettre en application la règle des 3R. Remplacement : Le recours à l'animal est nécessaire. Bien que des lignées cellulaires de type ostéoblastique et endothéliales existent, aucun modèle in vitro ne permet de modéliser le processus physiologique complexe de la réparation tissulaire de l'os alvéolaire suite aux extractions dentaires.

Raffinement : Des études préliminaires validées par le Comité d'Éthique #89 et acceptées par le Ministère en 2016 nous ont permis de déterminer les deux lignées de souris génétiquement modifiées les plus adéquates pour visualiser l'origine embryonnaire des ostéoblastes. Par ailleurs, le protocole d'extraction étant parfaitement maîtrisé par notre équipe, les gestes chirurgicaux ainsi que la prise en charge du stress et de la douleur lors de la procédure chirurgicales et aux stades post-opératoire sont connus et attentivement pris en compte.

Réduction du nombre d'animaux : Le protocole d'extraction étant parfaitement maîtrisé, aucune mise au point n'est nécessaire et le nombre d'animaux inclus dans ce protocole est réduit au strict minimum. Nos études antérieures nous ont permis de déterminer les 6 points cinétiques post-extractionnels d'intérêt : 48h, 1, 2, 4, 6 et 8 semaines. Pour obtenir des résultats histologiques statistiquement significatifs, il est indispensable d'utiliser 3 animaux par lignée murine et par temps expérimentale et de répéter la procédure trois fois. Pour ce projet de 5 ans, nous prévoyons donc d'utiliser 108 souris.

5035. La leptospirose est une infection bactérienne qui touche notamment l'homme et les animaux domestiques. Les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien (SOOI) sont particulièrement affectées par cette pathologie et enregistrent des incidences humaines parmi les plus élevées au monde. Les micromammifères terrestres et les chauves-souris endémiques du SOOI sont des réservoirs majeurs de leptospires excréant des leptospires jusque-là inconnus et endémiques du SOOI dans l'environnement. La population humaine peut être infectée par ces leptospires par contact direct avec les urines ou les tissus d'animaux infectés ou par contact avec un environnement contaminé.

Des prévalences d'infection élevées ont été enregistrées dans de nombreuses populations sauvages, cependant nous n'avons aucune information concernant la pathogénicité de ces leptospires endémiques. Dans le contexte actuel d'émergence d'agents pathogènes chez l'homme, il est urgent de déterminer parmi les nombreux leptospires isolés, ceux qui sont pathogènes pour l'Homme.

Des travaux précédents ont montré une spécificité d'hôte importante pour les leptospires inféodés aux petits mammifères endémiques du SOOI et un spectre d'hôte plus large pour les leptospires cosmopolites. Des études épidémiologiques réalisées sur l'homme indiquent que les cas aigus sont plus souvent rencontrés à La Réunion qu'à Mayotte, une différence attribuée à la prédominance d'un leptospire cosmopolite dont le rat est le principal réservoir.

L'objectif de ce projet est d'évaluer le risque que représentent les leptospires endémiques de la faune sauvage pour les populations humaines du SOOI. La pathogénicité et le spectre d'hôte de leptospires endémiques seront évalués par une approche expérimentale.

Deux souches de leptospires endémiques provenant de chauves-souris et de tangués endémiques du SOOI seront étudiées et une souche cosmopolite retrouvée essentiellement chez les rats servira de témoin positif.

La pathogénicité de ces différentes souches de leptospires sera étudiée via l'infection expérimentale de hamsters, modèle sensible à la leptospirose et couramment utilisé dans les études de cette pathologie.

Le spectre d'hôtes de ces leptospires sera étudié via l'infection de rats, réservoir majoritaire de leptospires.

Ce projet a été pensé de façon à respecter les exigences des 3R.

Au total, 130 hamsters et 82 rats seront utilisés :

- 48 hamsters seront utilisés pour restaurer la virulence des souches de leptospires ;
- 50 animaux de chaque espèce seront utilisés dans une étude pilote qui déterminera la dose de leptospires adéquate pour créer une infection aiguë chez le hamster et une colonisation rénale chez le rat ;
- 32 animaux de chaque espèce seront utilisés dans l'étude principale.

Les animaux seront hébergés dans des cages contenant un environnement enrichi. Ils seront observés et pesés quotidiennement. Des prélèvements réguliers de sang et d'urine seront effectués afin de suivre la dynamique d'infection pendant 1 mois chez les hamsters et 4 mois chez les rats. Les organes seront in fine collectés, après euthanasie des animaux selon une méthode autorisée, pour une observation microscopique des tissus infectés.

Ces résultats seront complétés par une analyse du génome de ces leptospires afin d'identifier les éléments génétiques liés aux caractères étudiés.

5036. L'incidence des maladies rénales chroniques est en progression constante et représentent actuellement un problème majeur de santé public dans les pays industrialisés. Ainsi en France les maladies rénales d'origine diverses touchent plus de 2,5 millions de personnes. Malgré le progrès accomplis par la médecine moderne les traitements actuels ne sont que partiellement efficaces. En effet, les malades qui arrivent en stade terminal sont au nombre de 70000 environ, ce qui représente 2% des dépenses d'assurance maladie. De plus cette population augmente de 3% par an pour les patients dialysés et 5% pour les patients greffés. Le but de ce projet est d'étudier le rôle de la connexine 43 dans le développement de la maladie rénale. Etant donné que le rein est un tissu constitué de plusieurs compartiments les différents modèles cellulaires ne suffisent pas pour étudier les mécanismes qui conduisent à la régression progressive de la fonction rénale. Pour cela nous disposons de modèles de néphropathie expérimentale bien établis chez la souris qui permettent de travailler sur différents types de pathologies rénales comme l'hypertension, la glomérulonéphrite, la néphropathie obstructive ou encore certaines complications associées à la transplantation. De plus, ce sont des modèles bien établis qui produisent une altération progressive du tissu rénal et donc très fiables pour révéler des biomarqueurs utiles de la progression de la maladie. Afin de d'étudier le rôle de la connexine 43 dans l'apparition de la maladie rénale chronique, nous avons établi quatre différents protocoles de néphropathie que l'on appliquera en utilisant 260 souris génétiquement modifiés durant une période de 5 ans. Le nombre de souris utilisées dans notre étude a été calculé de sorte à réduire au maximum l'utilisation des animaux afin de respecter la règle des " 3R ". Afin de garantir le bien-être des animaux une surveillance quotidienne après les procédures expérimentales et le recours à des analgésiques sont préconisés. Lors de l'élevage des animaux, un enrichissement de l'environnement des animaux sera également entrepris : pipette de l'abreuvement automatique, nids végétaux, tunnels en carton ou maison/igloo en plastique, litière en copeaux, pas d'animaux isolés. Lors des expériences, des points limites ont été définis permettant d'exclure les animaux en souffrance. Les animaux sont hébergés dans des conditions d'hygrométrie et de température adaptées à l'espèce. Une alternance jour/nuit est en place dans les zones d'élevage et d'expérimentation pour respecter le rythme chronobiologique des animaux. Ces conditions sont surveillées en permanence par logiciel via des capteurs de mesure. Un modèle animal pour l'étude d'un système intégré comme le fonctionnement du rein est nécessaire pour tester nos hypothèses, un bon modèle cellulaire n'est pas disponible pour les cellules rénales.

De cette manière, nous espérons proposer que la connexine 43 soit une nouvelle cible thérapeutique pour éviter aux patients la dialyse ou à terme la transplantation.

5037. Le développement de molécules anti-convulsivantes correspond à un enjeu majeur dans le traitement de l'épilepsie. L'efficacité des candidats-médicaments doit pouvoir être évaluée sur des modèles animaux qui permettent notamment de mimer les crises épileptiques. Par ailleurs, dans le cadre des études de pharmacologie de sécurité, la détection d'un effet pro-convulsivant éventuel (non voulu et délétère) du futur médicament doit être effectuée, dans la mesure où la présence de ce type d'effet pro-convulsivant pourra éventuellement aboutir à l'arrêt du développement de cette molécule. Une telle évaluation sera attendue par les autorités sanitaires en fonction des données de sécurité générées jusqu'à lors.

L'administration de pentylentétrazole (ou PTZ) chez le rongeur provoque des convulsions à partir d'une certaine dose. Ce modèle est considéré par les autorités de santé comme pertinent à utiliser dans le cadre de la détection d'effets potentiels anti- ou pro-convulsivants de candidats-médicaments.

L'objectif du présent projet est de détecter chez le rongeur l'existence d'effets pro- ou anti-convulsivants induits par des candidats-médicaments et ce en utilisant le test des convulsions induites par le PTZ. Pour ce projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 2060 animaux.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement: le projet est réalisé sur le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences in vitro) pour détecter les effets pro- ou anticonvulsivants d'un candidat médicament

Réduction: un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique

Raffinement: ce projet fait l'objet de procédures rigoureuses, il est réalisé par un personnel formé attentif à la recherche des points limites et au recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

5038. La maladie de Parkinson correspond à une perte progressive des neurones dopaminergiques. Le déficit en dopamine au niveau cérébral induit de graves troubles moteurs chez le patient.

Les tremblements de repos constituent l'un des symptômes cardinaux de la maladie de Parkinson et peuvent être modélisés in vivo par l'induction de mouvements de tremblements de la mâchoire chez le rat par administration de substances pharmacologiques. Ainsi, l'administration de tacrine induit une perturbation de l'équilibre entre acétylcholine et dopamine dans le cerveau ce qui aboutit au phénotype comportemental. Les tremblements de la mâchoire (mâchonnements) induits peuvent être réversés par des agents pharmacologiques qui augmentent le tonus dopaminergique tels que les agonistes dopaminergiques (utilisés pour traiter la maladie de Parkinson).

L'objectif de ce projet est d'utiliser le modèle de tremblements induits par la tacrine comme modèle de screening pour l'identification de molécules anti Parkinson.

Pour ce projet, le nombre total d'animaux utilisés est estimé à 1200 rats (sur 5 ans).

Ce projet est conçu en accord avec le principe des 3Rs.

Remplacement : dans le cadre du développement de certains nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets analgésiques. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'un candidat médicament. A ce jour, le rat est l'espèce la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : un nombre minimal et homogène d'animaux est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est effectué par :

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- la surveillance renforcée des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

5039. L'objectif de ce projet est d'étudier la sensibilité musicale en lien avec l'apprentissage vocal et l'empathie chez les psittacidés, une des familles d'oiseaux présentant la cognition la plus complexe.

Nous étudierons donc la musique en relation avec l'apprentissage vocal et l'empathie chez les oiseaux, sous trois principaux aspects :

- les préférences musicales dont ils pourraient faire preuve et l'écoute spontanée de morceaux de musique si on leur laisse le choix
- l'expression musicale qu'ils peuvent montrer à travers les rythmes qu'ils frappent ou qu'ils dansent, ou les notes qu'ils produisent via des instruments de musique
- les influences musicales sur différents comportements spontanés et plus spécifiquement sur l'empathie (selon certaines hypothèses, la musique et la danse pourraient avoir évolué biologiquement et culturellement dans le but de renforcer les liens sociaux).

Ces recherches pourraient permettre d'éclairer l'évolution de la musique humaine en se focalisant principalement sur les liens qu'elle peut avoir avec l'apprentissage vocal et l'empathie, mais aussi avoir des applications pratiques, notamment en ce qui concerne le bien-être animal et la façon dont on pourrait l'induire par la diffusion de musique.

Cette étude sera réalisée sur 11 callopsittes (6 mâles, 5 femelles). Les callopsittes sont de la famille des psittacidés, un modèle particulièrement pertinent car capable d'apprentissage vocal et de plusieurs formes d'empathie. Ils ont de plus des capacités cognitives aussi importantes que celles des primates et un cerveau particulièrement gros proportionnellement à la taille de leur corps.

Pour ce qui est de l'application des trois R : le recours à l'animal vivant est indispensable pour répondre à nos questions, mais peu d'oiseaux (le minimum pour pouvoir obtenir des résultats généralisables) sont utilisés au cours de cette thèse et aucune expérience n'est invasive. Les situations de stress auxquelles les animaux seront exposés sont les suivantes : privation alimentaire (n'excédant pas 2 heures), introduction de nouveaux objets dans leur environnement (ils sont néophobes), séparation du groupe social (n'excédant pas 2 heures), contention et mal-être pouvant être induit par la diffusion de morceaux de musique qu'ils n'apprécieraient pas. Leurs comportements étant relevés pendant ces périodes, l'expérience sera stoppée si les oiseaux montrent des signes de stress importants.

5040. La fibrillation auriculaire, arythmie cardiaque la plus fréquemment rencontrée en pratique clinique, est associée à une diminution de la qualité de vie et une augmentation de morbidité (survenue d'accident vasculaires cérébraux, ...) et de mortalité. Sa prévalence augmente avec le vieillissement de la population et elle devient un véritable problème de santé publique d'autant plus que l'arsenal thérapeutique actuel est souvent inefficace et parfois responsable de pathologie iatrogène (occasionnée par les médicaments). Les mécanismes cellulaires et moléculaires d'apparition de cette arythmie sont encore mal compris. Les manchons de cardiomyocytes présents dans la paroi des veines pulmonaires sont cependant le foyer anormal d'activités électriques (dites ectopiques) qui déclenchent cette arythmie.

Dans le laboratoire, nous avons montré que la noradrénaline peut déclencher une activité ectopique automatique en salve dans les veines pulmonaires de rat. Des différences fonctionnelles marquées ont pu également être mises en évidence entre les cardiomyocytes des veines pulmonaires et ceux de l'oreillette et du ventricule gauches.

Afin de poursuivre l'exploration des mécanismes à l'origine de cette activité ectopique décelée au niveau des cardiomyocytes des veines pulmonaires et de rechercher parallèlement le rôle de facteurs pouvant favoriser l'apparition de la fibrillation auriculaire chez l'homme tels que l'âge et l'hypertension artérielle, il nous est nécessaire de continuer l'exploration sur des modèles animaux.

Pour cela, des études fonctionnelles ex vivo sont menées sur des lambeaux et des cellules isolées de veine pulmonaire, d'oreillette gauche, de ventricule gauche et d'oreillette droite prélevés sur des rats jeunes et âgés de diverses souches : rat normotendu non consanguin (souche Wistar, 9 semaines à environ 9 mois), rat spontanément hypertendu (souche SHR, 9 semaines à environ 9 mois) et rat normotendu issu de la souche de référence (Wistar-Kyoto, 9 semaines à environ 9 mois).

Le projet nécessitera 600 rats pour une durée totale de 5 ans, soit 10 rats/mois pour l'ensemble de l'équipe.

Remplacer : du fait de sa structure comportant plusieurs types cellulaires et de son fonctionnement peu connu, il n'y a pas de modèle cellulaire ou in silico de la veine pulmonaire que nous pouvons utiliser en remplacement des animaux.

Réduire : l'utilisation d'outils statistiques permet de réduire au minimum le nombre d'animaux indispensable à l'obtention de résultats interprétables.

Raffiner : la planification des expériences, la manière de prélever et les appareillages ont été optimisés afin d'effectuer un maximum de prélèvements par rat. En outre, nous prévoyons toujours une semaine d'acclimatation avant d'utiliser les rats afin de réduire le stress des animaux. Ils sont hébergés à plusieurs (3 à 6 selon leur poids) en présence d'un enrichissement (tunnel plastique, papier absorbant). Nous faisons aussi attention à ce qu'un rat ne se retrouve pas seul dans sa cage le vendredi, car il le resterait pendant un week-end entier. Les animaux sont anesthésiés et le prélèvement se fait rapidement.

5041. Le fœtus est potentiellement soumis à des situations à risque d'hypoxie (diminution des apports en oxygène au fœtus) et d'acidose (situation à risque pour le fœtus définie par une accumulation du dioxyde de carbone et une baisse de pH) pendant le travail et l'accouchement. La diminution des apports en oxygène pendant le travail peut être à l'origine de séquelles notamment cérébrales. Ainsi l'objectif de la surveillance est donc de repérer et de prévenir ces situations à risque.

Actuellement, la surveillance pendant l'accouchement est assurée par un enregistrement du rythme cardiaque fœtal (RCF). L'apparition d'anomalies du RCF (ARCF) peut être corrélée à une hypoxie fœtale. Mais l'analyse de ces anomalies est subjective, donc dépendante de la personne l'interprétant, et peu spécifique de l'acidose. Devant des ARCF, un recours à des techniques dite de seconde ligne est souvent nécessaire (prélèvement sanguin au scalp du fœtus, pose d'une électrode sur le scalp en continu...). Cependant, ces techniques sont toutes invasives avec nécessité de la rupture de la poche des eaux. La mise au point d'outils d'évaluation de l'hypoxie fœtale, objectifs et par une méthode non invasive est donc essentielle.

Le but de notre étude est de valider un nouveau modèle de surveillance du fœtus pendant le travail. Cet outil évalue l'inconfort fœtal par l'analyse de la variabilité du rythme cardiaque fœtal.

La variabilité du rythme cardiaque fœtale est le reflet de l'activité du système nerveux autonome, mis en jeu dans le bien être fœtal, et peut être calculée à partir d'un signal électrocardiogramme. Notre système d'enregistrement de la variabilité du rythme cardiaque permet l'analyse de celle-ci par le calcul d'un indice. La finalité de ces travaux serait l'application en pratique clinique comme élément de surveillance non invasive, continue et objective de deuxième ligne pendant le travail, pour confirmer ou non un réel état de stress fœtal.

Cependant, avant de pouvoir l'appliquer à des situations pathologiques pendant le travail, il est nécessaire de déterminer quelles sont les limites potentielles de cet outil. Ainsi, nous souhaitons, grâce à l'utilisation de molécules pharmacologiques mimant des situations qui pourraient être observées en pratique clinique (variation du rythme cardiaque fœtal ou de la tension artérielle), étudier les mécanismes de variation de ce nouvel outil.

Il n'existe pas, à notre connaissance, de méthode de substitution à un modèle animal pour étudier la réponse due à une modification des paramètres hémodynamiques lors de la vie intra-utérine. Nous avons donc choisi comme modèle la brebis, espèce mammifère dont la grossesse possède de nombreuses similitudes avec la grossesse chez l'Homme. 30 brebis gestantes (soit 30 fœtus) seront concernées, soit environ 10 brebis par an.

Après une semaine d'acclimatation aux locaux de l'animalerie, nous créerons notre modèle chirurgical et débuterons le protocole. Une manipulation par jour sera réalisée et nous évaluerons la réponse du fœtus aux différentes molécules pharmacologiques. Le projet respectera la règle des "3R" en limitant le nombre d'animaux et en prenant compte de la douleur et de l'angoisse infligées par le protocole. Ainsi lors de l'intervention, une analgésie maternelle mais aussi fœtale sera réalisée. D'autre part, l'accueil dans l'animalerie respectera le confort de l'animal (température, luminosité, alimentation...).

Ce travail expérimental est le prérequis indispensable à une utilisation de notre outil d'évaluation de la variabilité du rythme cardiaque chez le fœtus humain.

5042. En 2011, l'Institut National du Cancer a recensé 365 500 nouveaux cas et 147 500 décès de cancer en France. Aussi, la recherche s'oriente vers de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'évaluation de l'effet de ces nouvelles thérapeutiques nécessite le développement de procédures *in vitro*. Néanmoins, les cellules tumorales se comportent différemment *in vitro* et *in vivo* en termes de croissance, de dissémination, de résistance aux traitements, etc. Aussi, l'évaluation du bénéfice de nouvelles thérapeutiques requière le développement de modèles précliniques intégrant l'ensemble de la biologie d'un organisme vivant.

Ce projet vise à mettre en place différents modèles tumoraux pertinents chez la souris (cancers cérébraux, du sein, du poumon, de la peau, des ovaires, de la prostate, des intestins, des os, du foie et du sang), représentatif des tumeurs humaines et permettant d'évaluer l'effet de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Une première étape portera sur l'évaluation de la croissance tumorale après injection sous cutanée (sc) pour s'assurer que les cellules tumorales sont bien capable de proliférer *in vivo* chez l'animal. Cette étape validée, des implantations orthotopiques (au sein même de l'organe d'origine) seront réalisées afin de développer des modèles représentatifs de la pathologie humaine.

Ces modèles porteront sur l'implantation de cellules de souris dans des souris possédant un système immunitaire normal (souris syngénique C57/Bl6, Balbc) et de cellules humaines dans des souris immunodéficientes (Nude, NOD-SCID, NSG) (xénogreffe).

Le suivi de la croissance tumorale sera réalisé par mesures physiques directes et par des méthodes non invasives (eg. Bioluminescence, IRM).

Ce projet nécessitera l'utilisation de 2250 animaux.

Au regard de la règle des 3R

Remplacer : L'objectif de ce projet étant la mise en place de modèle animaux permettant par la suite d'évaluer l'effet de nouvelles stratégies thérapeutiques, cela ne peut pas être remplacée par des modèles *in vitro* ou *in silico*. Néanmoins, les cellules utilisées seront bien évidemment contrôlées avant la moindre implantation chez l'animal.

Réduire : De nombreux laboratoires internationaux ont déjà développé des modèles tumoraux. Aussi, nous nous baserons sur leurs différents travaux afin de bénéficier de leur expérience. Par ailleurs, notre plus-value porte sur l'utilisation de cellules tumorales dites « primaires » (très proche de la maladie humaine) et également de modèle orthotopiques peu répandus.

De plus, afin de réduire la quantité d'animaux utilisée les différentes étapes seront réalisées successivement, afin de définir à chaque fois les meilleures conditions expérimentales.

Enfin, les lots utilisés seront de 5 souris, ce qui est suffisant pour avoir une bonne idée de l'homogénéité de la croissance tumorale et qui est très souvent utilisé dans diverses publications scientifiques.

Raffiner : Pour limiter toute souffrance animale inutile, les cellules tumorales utilisées (testées *in vitro*) seront dans un premier temps implantées en sous-cutané afin de s'assurer qu'elles peuvent bien induire une tumeur chez l'animale, ce qui préservera des injections orthotopiques bien évidemment invasives. Ainsi, afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés, chaque étape sera réalisée successivement.

Les techniques de suivi non-invasif (Bioluminescence, IRM) permettront également de faire un suivi cinétique non douloureux et tout à fait pertinent quant à la mise en place et à la caractérisation des modèles tumoraux.

Afin de prévenir au maximum de la souffrance de l'animal, les souris seront suivies quotidiennement (suivi du poids, attitude générale). A la moindre apparition de signes décrits dans les points limites définis pour chaque procédure les souris seront euthanasiées.

5043. Les os des vertébrés servent au soutien de l'organisme, aux mouvements et au stockage des minéraux. L'os est un organe vivant constitué de cellules. Chez l'adulte, l'os est remanié sous l'action conjointe de deux types de cellules, les ostéoblastes et les ostéoclastes, qui respectivement, bâtissent et détruisent l'os. Au cours de certaines périodes de la vie, comme après la ménopause chez les femmes, un déséquilibre entre ces deux activités conduit à une fragilisation de l'os. C'est pourquoi il est essentiel de comprendre le fonctionnement de l'os, ce qui fait l'objet de ce projet de recherche fondamentale.

Remplacement: Des études génétiques effectuées chez l'Homme suggèrent qu'il existe un lien entre certains gènes et la biologie de l'os. Ainsi, nous étudions deux gènes dont l'activité a été liée à la densité osseuse chez l'Homme. L'os est un organe complexe dont la modélisation *in vitro*, en particulier sur phénomènes longs et évolutifs comme l'ostéoporose, n'est pas possible; aussi, les modèles animaux sont indispensables pour ce type d'étude. Nos études préliminaires montrent que les souris déficientes pour ces gènes ont des défauts osseux.

Ce projet a pour but de définir la vitesse de minéralisation de l'os dans ces deux modèles de souris grâce à une molécule fluorescente se fixant sur l'os en croissance, la calcéine. L'utilisation de cette méthode est répandue dans le monde de la recherche; l'accès aux études publiées permet de réduire le nombre des animaux et de raffiner le protocole.

Réduction: des groupes de 10 animaux seront utilisés afin d'avoir des résultats statistiquement représentatifs. Ainsi un maximum de 80 souris sera utilisé dans ce projet.

Raffinement: La molécule injectée n'étant pas toxique, aucun dommage n'est attendu. De plus, les animaux feront l'objet d'un suivi rapproché afin d'éviter tout stress ou toute souffrance inutile.

5044. Le tryptophane (Trp) est un acide aminé essentiel nécessaire à la biosynthèse des protéines et c'est également un précurseur biochimique de métabolites qui ont des effets majeurs sur la physiologie des mammifères. Dans le tractus gastro-intestinal, le métabolisme du Trp peut suivre trois voies principales, qui sont toutes sous le contrôle du microbiote intestinal. Les produits

finaux de ces voies jouent un rôle clé dans la modulation de la réponse immunitaire, des fonctions intestinales et du comportement. Plusieurs maladies qui impliquent le microbiote intestinal dans leur pathogenèse sont également impactées par des métabolites du Trp. Cela suggère que l'effet du microbiote dans ces maladies pourrait être, au moins partiellement, médié par un métabolisme du Trp altéré.

Nous avons récemment observé qu'une dysfonction du métabolisme du Trp par le microbiote intestinal est impliquée dans la pathogenèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et des données préliminaires suggèrent un rôle potentiel dans d'autres grandes maladies humaines. Les objectifs de ce projet sont (i) d'identifier les composants du microbiote intestinal impliqués dans le contrôle des 3 voies du métabolisme du Trp dans l'intestin, (ii) de déchiffrer l'équilibre réciproque entre les 3 voies pour évaluer le potentiel d'une modulation comme cible thérapeutique, et enfin (iii) d'évaluer la pertinence de ces phénomènes chez des patients humains.

Ce projet se déroulera sur 5 ans. Afin de répondre aux objectifs posés, nous utiliserons plusieurs modèles pour étudier différentes pathologies observées chez l'homme telles que des inflammations intestinales, ou des perturbations du microbiote provoquées soit par des traitements antibiotiques, soit par un régime alimentaire riche ou pauvre en tryptophane, ou encore riche en graisse (« western diet »). Ces modèles seront appliqués soit à des souris témoins, soit à des souris invalidées pour un ou plusieurs gènes des 3 voies du métabolisme du tryptophane soit enfin à des souris invalidées pour le gène *Card9* (Caspase recruitment domain 9) chez lesquelles nous avons récemment montré que le microbiote était défaillant pour le métabolisme du Trp.

L'essentiel des prélèvements (sang, tissus, contenus intestinaux) sera fait post mortem à l'exception des fèces.

Afin d'appliquer au mieux la règle des 3R, nous avons prévu dans nos projets scientifiques d'utiliser des expérimentations *in vitro* sur des lignées cellulaires ou des cellules primaires préalablement à l'utilisation d'animaux, ce qui permet d'en réduire le nombre. Nos études imposent le modèle animal pour valider les hypothèses soulevées grâce aux résultats des expérimentations *in vitro*. Il n'existe pas aujourd'hui de modèle *in vitro* récapitulant tous les paramètres du tube digestif. Nos groupes de souris seront réduits à 10 animaux par traitement testé. Le nombre de lignées de souris étant relativement élevé pour décrire les voies du métabolisme du Trp (7 lignées génétiquement modifiées) dans ce projet, nous utiliserons un maximum de 440 souris par an sur 5 ans. Ce nombre d'animaux est calculé au plus juste en fonction de notre expérience antérieure pour garantir la qualité statistique des données.

Les animaux sont hébergés dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (litière changée régulièrement, eau et nourriture à volonté, température et hygrométrie régulées...). Nous avons veillé à enrichir le milieu de vie par l'ajout de feuille de cellulose dans les cages et d'un abri prévu à cet effet. Le suivi attentif et régulier des animaux sera réalisé afin de minimiser autant que possible la souffrance éventuelle des animaux.

5045. Les ganglions de la base sont un ensemble de structures cérébrales impliquées dans le contrôle moteur et l'apprentissage d'habitudes motrices. Le but du présent projet est de caractériser les propriétés (composition, activité globale, plasticité) des réseaux neuronaux au sein des ganglions de la base et de comprendre comment ces propriétés sont modifiées lors de l'apprentissage. Les ganglions de la base sont fortement affectés dans le cadre de la maladie de Huntington. Ce projet vise également à caractériser les anomalies au niveau de la composition et l'activité des réseaux neuronaux lors des phases pré-symptomatiques de la maladie de Huntington. Cette maladie neurodégénérative héréditaire est caractérisée par des désordres moteurs apparaissant progressivement (chorée), un déclin cognitif et des troubles psychiatriques. Les patients meurent habituellement 15-20 ans après l'apparition des premiers symptômes et il n'y a aujourd'hui aucun traitement efficace pour prévenir ou retarder la progression de cette maladie. En France, 12.000 patients sont touchés et environ 6.000 personnes développeront la maladie dans les 20 prochaines années. Démasquer des dysfonctionnements dans les réseaux neuronaux dans les phases pré-symptomatiques de la maladie pourrait aider à développer des stratégies thérapeutiques plus précoces.

L'utilisation de vecteurs viraux permettant de cibler spécifiquement une structure d'intérêt et des populations neuronales spécifiques constitue une approche unique pour disséquer la composition et la dynamique des réseaux neuronaux. La souris apparaît comme le modèle de choix pour ce projet compte-tenu de la similarité de l'organisation anatomo-fonctionnelle de son cerveau avec celle de l'homme et de l'existence chez cette espèce des outils de transgénèse nécessaires. Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude (2 procédures expérimentales) est de 736. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Notamment, dès que possible, l'animal sera utilisé comme son propre contrôle afin de diminuer le nombre de groupes expérimentaux nécessaires. Ce projet implique de la neurochirurgie et certaines tâches comportementales correspondant à un niveau de douleur de classe modérée. La chirurgie sera effectuée sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique adéquate. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de bien-être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance apparaissent.

Le projet traitant du fonctionnement des réseaux neuronaux et nécessitant des approches intégrées et comportementales, il nous est impossible de remplacer le modèle animal vivant par des cultures cellulaires ou des simulations informatiques.

5046 Les mammarénavirus sont des virus dont les réservoirs sont des rongeurs. Certains d'entre eux sont responsables de fièvres hémorragiques humaines. Le taux de mortalité fluctue entre 1 à 50% selon les paramètres de l'infection (espèce et souche virale, antécédents de santé du patient, accès à des soins adaptés etc.). Ces infections étant rares et à la symptomatologie précoce non spécifique, le personnel médical se retrouve sans grande option pour traiter des infections diagnostiquées souvent trop tardivement. Pour résoudre ce problème, nous cherchons à produire un vaccin multivalent ciblant les mammarénavirus d'Amérique du Sud : les virus Machupo, Junín, Guanarito, Chapare et Sabiá. La finalité du projet vise à développer un candidat vaccin utilisable chez l'Homme. Pour atteindre ce but, après des expériences sur des lignées cellulaires, nous souhaitons évaluer

l'innocuité et l'efficacité protectrice (prophylactique et thérapeutique) d'un candidat vaccin sur notre modèle animal, des cobayes Dunkin Hartley, modèle disponible en France et représentatif de la pathologie hémorragique. Le nombre d'animaux (n=62) a été déterminé pour être le plus petit effectif significatif et respecter le principe de réduction. Les animaux seront hébergés selon les standards en vigueur et socialisés sur la durée du projet. Les cobayes auront accès à un enrichissement alimentaire, de stimulation et de confort adapté spécifiquement à cette espèce. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'animaliers expérimentés. En cas de signes cliniques de l'infection et/ou de l'installation d'un état de prostration, des mesures appropriées seront prises pour limiter au maximum toute douleur, souffrance ou angoisse des animaux.

5047. Le lupus est une maladie auto-immune, c'est à dire secondaire à la production d'auto-anticorps dirigés contre divers composants cellulaires du corps humain, et responsable d'inflammation de certains organes (rein, cœur, cerveau, poumon). Ces auto-anticorps sont des protéines synthétisées par des cellules du système immunitaire, les plasmocytes. Les plasmocytes sont localisés et fabriqués dans les organes lymphoïdes secondaires (la rate, les ganglions), mais peuvent aussi se trouver dans les organes cibles de la maladie. Le rein est l'un des organes les plus touchés au cours du lupus et les lésions tissulaires peuvent aboutir à une insuffisance rénale chronique terminale nécessitant la mise en place d'une dialyse. Ces lésions sont liées, d'une part au dépôt d'anticorps dans le rein mais aussi, selon des études récentes notamment chez un modèle murin, à la présence de plasmocytes directement au niveau rénal avec production locale d'anticorps. Nous avons montré que le médicament (rituximab) détruisant les cellules B (précurseur des plasmocytes) pouvait avoir un effet paradoxal sur les plasmocytes. En effet, l'analyse de l'expression des gènes des plasmocytes des patients ayant reçu ce traitement a montré l'expression d'un programme cellulaire à longue durée de vie, différent de celui habituellement observé (à moyenne ou courte vie). L'émergence de plasmocytes à longue durée de vie pourrait donc expliquer l'échec de ce traitement. Nous avons pu montrer que ce mécanisme était dépendant d'une molécule responsable de la survie de cellules B. En effet, l'ensemble du processus peut être inhibé en bloquant cette molécule par un anticorps. Nous pensons qu'une stratégie de combinaison thérapeutique par un anticorps qui inhibe ce facteur de survie de cellules B et le rituximab pourrait permettre d'améliorer le traitement de la maladie.

Nous souhaitons donc savoir, si la combinaison des deux traitements peut éviter la survenue de ces lésions rénales. Une souche de souris qui développe une insuffisance rénale spontanée avec une atteinte mimant un lupus sera utilisée pour l'expérience. Cette souche New-Zealand Black/New-Zealand White (NZB/NZW) est disponible chez les fournisseurs agréés.

Ce projet ne peut être effectué que chez l'animal car seule l'expérimentation animale mimant le plus fidèlement possible le microenvironnement de la maladie permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans les lésions rénales au cours du lupus.

Des groupes de cinq souris seront constitués pour évaluer l'efficacité des deux médicaments associés par rapport à un seul médicament. Le traitement débutera lorsque les souris atteindront l'âge de 20 semaines. Les animaux seront euthanasiés à 37 semaines pour le prélèvement d'organes et l'étude des lésions rénales. Afin d'assurer la reproductibilité des résultats l'expérience sera répétée. .

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Nous estimons devoir utiliser 40 souris pour l'ensemble de l'étude qui durera deux ans.

A terme, si l'hypothèse que nous analysons est validée, ce travail pourrait déboucher sur un essai thérapeutique dans le lupus rénal.

5048. Les moustiques *Anopheles gambiae* sont vecteurs de *Plasmodium falciparum*, le parasite responsable du paludisme. Le paludisme infecte 200 millions de personnes dans le monde et est responsable chaque année de 600.000 décès. La compréhension de cette maladie et la mise au point de nouveaux traitements nécessite d'étudier les interactions entre le parasite, son vecteur moustique et ses hôtes vertébrés, ce qui suppose la production en masse du moustique *Anopheles gambiae*.

Pour accomplir leur cycle et pondre leurs œufs, les moustiques femelles requièrent du sang de mammifères. Pour certaines espèces d'anophèles, telles qu'*A. stephensi*, il est possible d'apporter ce repas sanguin dans un gorgé artificiel contenant du sang de cheval ou de bovin. Malgré de nombreuses tentatives dans des conditions variées, cela n'a pas été possible jusqu'à présent avec *A. gambiae* car les rendements de production en œufs et la qualité des moustiques obtenus sont trop faibles pour notre activité. La seule modalité qui permet d'atteindre notre objectif est la piqûre d'un lapin anesthésié.

Les modalités du repas sanguin sur lapins ont été établies pour minimiser l'impact de cette procédure sur le bien-être des animaux. Chaque lapin est soumis à un repas sanguin une fois par semaine, sous anesthésie générale. La zone de peau exposée aux piqûres est ensuite enduite de crème apaisante. Les animaux sont surveillés, en particulier pour les signes éventuels d'allergie locale ou de perte de poids pouvant résulter des prélèvements de sang répétés. La production d'anticorps contre la salive de moustique est suivie en analysant par ELISA un prélèvement sanguin à l'oreille. Chaque lapin est soumis aux repas sanguins pendant une période de 6 mois. Sur les 5 ans de ce projet, un total de 20 lapins sera utilisé dans une procédure de sévérité légère.

5049. Les patients hypertendus présentent des lésions des microvaisseaux qui causent la dégénérescence de certains organes comme les yeux ou les reins. L'hypertension artérielle est la plus fréquente des affections cardiovasculaires, touchant environ 20 % de la population adulte. L'hypertension artérielle est d'ailleurs la deuxième cause de mise sous dialyse en Europe, derrière le diabète.

Nous utiliserons différentes lignées de souris génétiquement modifiées pour étudier les mécanismes impliqués dans les lésions vasculaires rénales et rétiniennes au cours de l'hypertension artérielle. Nous cherchons ainsi à valider *in vivo* des cibles thérapeutiques préalablement identifiées par des études *in vitro*.

En premier lieu, nous induirons une hypertension artérielle chez les souris et nous analyserons la fonction cardiaque et rénale en réalisant des prélèvements sanguins, urinaires et par échographie. La pression artérielle sera également mesurée tout au long de la procédure. Après 6 semaines maximum, les souris seront euthanasiées pour prélèvement d'organes afin d'étudier les lésions vasculaires.

L'hypertension artérielle est une maladie complexe et seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement possible le microenvironnement hypertensif, permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans les lésions vasculaires rénales et rétiniennes au cours de l'hypertension artérielle.

La souris est un modèle de choix car elle développe des complications vasculaires hypertensives proches de celles de l'homme. De plus, nous tirerons parti de la transgénèse, c'est à dire le fait de pouvoir modifier les gènes des souris, afin d'étudier les cibles identifiées *in vitro*.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans. Le nombre de souris utilisées sera de maximum 2740.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans le développement des lésions micro vasculaires au cours du diabète. Ils pourraient permettre le développement de nouveaux médicaments ciblant les voies mises en causes, permettant ainsi de prévenir ou freiner le développement des maladies vasculaires chez les patients hypertendus.

5050. Notre groupe travaille sur la mise au point d'approches de thérapies cellulaires dans des pathologies ostéo-articulaires telles que l'arthrose ou la polyarthrite rhumatoïde. Notre objectif est d'inhiber l'inflammation associée à ces maladies grâce à l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses (CSM).

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer les capacités anti-inflammatoires de ces cellules souches mésenchymateuses (ou de molécules thérapeutiques libérées par ces cellules) dans un modèle inflammatoire simple, avant d'avoir recours à des modèles plus complexes et plus lourds à mettre en œuvre. Le modèle que nous utiliserons est le modèle d'hypersensibilité retardée (DTH) chez la souris. Le projet repose sur l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (de différentes origines et espèces) ou des vésicules extracellulaires qui sont libérées par ces cellules (exosomes ou microparticules). La voie d'injection des cellules ou des molécules thérapeutiques est systémique (intraveineuse) ou locale.

Nous avons déterminé un programme de travail sur les 5 ans à venir qui tient compte des avancées attendues de notre projet de recherche. Cependant, le nombre d'animaux concerné par chaque procédure est certainement maximal (maximum envisagé : 640) et sera revu à la baisse si besoin pour tenir compte de la règle des 3R.

Toutes les dispositions seront prises pour respecter la règle des 3R :

- Réduction : le nombre d'animaux a été calculé avec l'aide d'un logiciel permettant d'évaluer le nombre d'animaux minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les paramètres à mesurer (données préliminaires obtenues dans d'autres expériences réalisées au laboratoire)
- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement. Les protocoles utilisés étant de degré de sévérité modérée au maximum, les animaux ne présentent pas de signes de souffrance habituellement. Cependant, dans le cas où certains signes seraient observés, un traitement oral avec du paracétamol serait mis en place
- Remplacement : Afin de proposer une thérapie cellulaire chez l'homme, il est important de démontrer l'efficacité thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses humaines et murines dans un modèle simple chez l'animal. Des modèles *in vitro* ne suffisent pas seuls à évaluer l'efficacité de ces cellules ou des molécules ou des vésicules qui en dérivent.

5051. Le cancer est un problème de santé public majeur, touchant un individu sur trois au cours de son existence. Le vieillissement de la population et des modes de vie plus sédentarisés entraînent une augmentation de l'incidence de plusieurs pathologies cancéreuses, ainsi que des coûts supportés par la collectivité. Si des améliorations significatives ont été obtenues au cours des dernières décennies pour le traitement et la prise en charge des patients, le cancer reste une pathologie lourde avec un pronostic souvent très sombre. Les approches immunothérapeutiques récentes ont permis de démontrer le potentiel du système immunitaire dans la lutte anti-tumorale. Le développement de vaccins thérapeutiques anti-tumoraux a soulevé un enthousiasme important au vu des excellents résultats obtenus en préclinique, qui n'ont été cependant confirmés que partiellement dans les phases cliniques avancées. Ces études ont permis néanmoins de renforcer nos connaissances des mécanismes immunitaires impliqués dans la réponse et la tolérance lors du développement tumoral.

Les améliorations visées actuellement portent non seulement sur les vaccins eux-mêmes mais aussi sur les adjuvants utilisés, afin d'ouvrir des perspectives de traitements combinés avec une efficacité renforcée.

Notre partenaire est une société spécialisée dans le développement de vaccins pour des indications de santé publique insuffisamment prises en charge.

Un modèle murin de lignée cancéreuse (CT26) a été sélectionné en raison de sa caractérisation génomique, mutationnelle, immunologique et de sa sensibilité aux médicaments immuno-modulateurs.

Les expérimentations animales serviront à mesurer l'efficacité anti-tumorale des produits formulés par notre partenaire.

Dans un autre projet, se déroulant en parallèle, nous déterminerons des associations de formulations vaccinales et d'adjuvants capables de déclencher une immunogénéricité satisfaisante.

Dans ce projet, nous utiliserons ces combinaisons optimisées de traitements sur des animaux porteurs de tumeurs, afin de mettre en évidence leur efficacité thérapeutique. Cela nous permet d'éviter tout double emploi d'animaux, selon les règles de réduction et de raffinement préconisées par les 3R.

Plusieurs protocoles seront ainsi effectués afin de déterminer le meilleur schéma thérapeutique avec les différentes combinaisons retenues par ailleurs.

Au préalable, nous effectuerons un premier protocole, sans traitement, visant à déterminer la quantité de cellules tumorales à injecter afin de mettre en place des tumeurs primaires dans l'ensemble des animaux traités tout en minimisant l'apparition de métastases tumorales, qui ne sont pas l'objet de cette étude.

La chronologie d'apparition des tumeurs et métastases sera caractérisée, par un suivi régulier au niveau du site d'injection ainsi qu'un contrôle par échographie et tomographie assistée par ordinateur (μ CT).

Ce protocole utilisera donc 3 quantités de cellules à injecter, avec 15 animaux par lot (10 animaux pour le suivi de croissance tumorale seul et 5 animaux qui seront utilisés aussi pour le suivi des métastases par échographie et tomographie ainsi qu'une collecte de la tumeur primaire pour analyse et une analyse nécropsique des poumons pour corroborer les résultats préalablement obtenus). Ces premiers résultats nous permettront d'ajuster le nombre d'animaux par groupe pour s'assurer d'obtenir l'ensemble des réponses nécessaires au projet.

Afin de tester les différentes formulations, un maximum de 10 protocoles de mesures de croissance tumorales est prévu par année, pouvant se répéter sur les 5 années à venir.

Bien qu'il s'agisse de maxima et que nous souhaitions utiliser le moins d'animaux possible, cette étape est obligatoire pour mettre en évidence la formulation la plus aboutie et efficace.

Nous utiliserons un maximum de 75 animaux par protocole, répartis en 5 groupes de 15 animaux (un groupe contrôle et quatre combinaisons de formulations/adjuvants seront testées en simultanément). Le nombre d'animaux pour chaque groupe pourra être réduit après connaissance de la variabilité observée à la suite des premières expériences. Le nombre total d'animaux pour ce projet peut donc atteindre 3795 animaux, tout en considérant qu'il s'agit d'un maxima et que tous les efforts seront faits afin de déterminer le plus rapidement possible et en utilisant le moins de protocoles possibles, la formulation la plus efficace. Il convient donc de signaler que toutes les démarches possibles visant à réduire le nombre de protocoles seront effectuées afin de correspondre aux règles éthiques de réduction du nombre d'animaux utilisés à fin expérimentale. De plus, afin de satisfaire au raffinement, Les animaux seront observés tous les jours. En cas de doute sur l'état des animaux, un suivi de poids quotidien sera mis en place en accord avec les responsables du bien-être animal et la vétérinaire de notre établissement. Ils seront euthanasiés en présence de critères de souffrance.

Amendement : dans le cadre de ce projet, nous avons obtenu un traitement capable de résorber complètement des tumeurs installées et/ou d'empêcher leur mise en place. Dans ce contexte, et dans une optique de raffinement, nous souhaitons proposer l'ajout d'une procédure qui consistera en une injection supplémentaire de cellules tumorales dans des souris ayant reçu ces traitements, afin de déterminer les possibilités de repousse de ces cellules suite au traitement.

5052. Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer un potentiel effet anxiolytique ou anxiogénique d'un candidat-médicament chez le rongeur (rat et souris) soumis au test du labyrinthe en croix surélevé.

Les troubles anxieux sont un groupe de problèmes psychologiques et dont les symptômes sont notamment une anxiété excessive, un sentiment de peur, d'inquiétude et des comportements d'évitement et de compulsivité. Chez l'homme, ils comprennent : les crises de panique, la névrose obsessionnelle compulsive, les phobies, le trouble d'anxiété généralisée, le syndrome de stress post-traumatique (peur à la suite d'un événement traumatisant).

Les rongeurs ont peur du vide et ont une tendance naturelle à chercher la sécurité dans des endroits sombres. Le test du test du labyrinthe en croix surélevé consiste à placer les rongeurs dans un labyrinthe surélevé par rapport au sol d'environ 60 cm et constitué de 4 bras en forme de croix (2 bras fermés avec des parois hautes et opaques, 2 bras ouverts) pendant 5 minutes. Les rongeurs vont avoir tendance à se réfugier dans les bras fermés (plus sombres, donc plus sécurisants) et à rester peu de temps dans les bras ouverts, dans lesquels leur curiosité naturelle les pousse. Les conditions de luminosité de la pièce expérimentale (pièce soit très lumineuse soit faiblement illuminée) vont influencer directement sur le niveau d'anxiété des animaux. Ces conditions expérimentales sont destinées soit à augmenter soit à réduire (selon le protocole utilisé) l'anxiété naturelle des rongeurs. Le niveau d'anxiété des animaux est évalué par le temps passé et le nombre d'entrées effectuées dans les bras ouverts pendant les 5 minutes du test.

Au cours de chaque étude, les rats ou les souris sont traités avec le candidat-médicament testé à 3 doses différentes, un produit de référence ou le véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée. Un nombre prévisionnel maximum de 6300 animaux sera utilisé sur 5 ans.

La conception du projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement : ce projet est réalisé sur le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences in vitro) pour évaluer les effets anxiolytiques ou anxiogéniques d'un candidat-médicament. A ce jour, le rongeur est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

Raffinement : ce projet fait l'objet de procédures rigoureuses, il est réalisé par un personnel formé et attentif à la recherche des points limites et au recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

5053. La maladie de Parkinson (MP) correspond à une mort progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta, une structure cérébrale qui joue un rôle majeur dans le contrôle de la motricité. De fait, les symptômes de la maladie sont principalement d'ordre moteur.

A ce jour, les médicaments disponibles ne permettent que de prendre en charge les symptômes de la maladie. Le développement de nouvelles thérapeutiques permettant de stopper/ralentir la progression de la MP constitue donc un enjeu majeur et correspond à un effort de recherche substantiel.

Le but de ce projet est de permettre l'évaluation de molécules neuroprotectrices et/ou de molécules agissant sur l'évolution de la maladie. Dans ce projet, la MP sera modélisée chez le rat en lésant expérimentalement les voies dopaminergiques par surexpression de la protéine alpha-synucléine (impliquée dans la pathologie humaine). Ce modèle, bien connu et caractérisé dans la littérature scientifique, est associé à une perte progressive des neurones dopaminergiques et à un déficit moteur facilement quantifiable.

L'objectif est (i) de caractériser la cinétique de perte neuronale en répartissant les animaux dans différents groupes qui seront testés sur le plan moteur à différents temps après la lésion (jusqu'à 16 semaines), (ii) de comparer les modifications moléculaires qui apparaissent dans le sang et liquide céphalorachidien avec celles décrites chez des patients parkinsoniens et (iii) de valider une technique de fluorescence *in vivo* permettant de réaliser un suivi non-invasif de la perte neuronale.

Pour ce projet, il est prévu d'utiliser un nombre maximum de 1964 rats sur 5 ans.

Un test de rotations induites à l'apomorphine permettra de sélectionner les animaux ayant subi une lésion massive des neurones dopaminergiques (>85%). Ces animaux seront utilisés pour évaluer le potentiel thérapeutique de candidats-médicament sur les dyskinésies (mouvements anormaux involontaires) induites par un traitement chronique de 3 semaines de L-DOPA commençant la neuvième semaine après la chirurgie. Par la suite, les dyskinésies seront quantifiées. Les rats seront ensuite traités par le candidat-médicament (3 doses différentes), un produit de référence ou le véhicule qui a servi à la formulation. L'utilisation d'échelles comportementales spécifiques permettra de quantifier les dyskinésies obtenues et donc d'évaluer l'effet bénéfique (antidyskinétique) des composés testés.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R:

Remplacement: le projet est réalisé sur le rat car il n'existe pas de méthodes de substitution (expériences *in vitro*) pour évaluer les effets d'un candidat médicament sur les déficits moteurs et/ou non-moteurs dans le cadre de la MP. A ce jour, le rat est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction: un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique

Raffinement: ce projet fait l'objet de procédures rigoureuses, il est réalisé par un personnel formé attentif à la recherche des points limites et au recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

5054. La tuberculose (TB), causée par l'infection par voie aérienne de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), est l'une des trois pathologies infectieuses à agent étiologique unique les plus meurtrières. Cela est dû en partie à une forte résistance de la bactérie aux traitements existants. C'est pourquoi, dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques, il est aujourd'hui important de mieux comprendre les interactions entre le pathogène et l'hôte. Ces interactions incluent notamment les mécanismes par lesquels Mtb parasite les macrophages qui sont à la fois les premières cellules immunitaires impliquées dans la lutte contre le pathogène mais aussi le principal réservoir cellulaire permettant sa survie.

La spécificité de notre projet est qu'il s'intéresse au rôle dans cette interaction du microbiote (constitué de l'ensemble des micro-organismes qui peuplent les muqueuses de l'organisme). Le microbiote participe par compétition à la lutte contre la colonisation de bactéries pathogènes et à la modification du métabolisme des cellules immunitaires (telles que les macrophages) soit présentes à proximité soit dans d'autres organes (tels que l'intestin) via la sécrétion de métabolites qui peuvent diffuser dans le sang. Si le rôle du microbiote est déjà décrit dans plusieurs pathologies, très peu d'études existent aujourd'hui sur son rôle dans la réponse aux infections non intestinales, telle la tuberculose.

Des différences étant visibles entre la composition du microbiote de patients atteints de tuberculose et des sujets sains, l'hypothèse de notre projet est que le microbiote, par les biais de réseaux métaboliques, module la réponse immunitaire et en particulier celle des macrophages à Mtb et, par conséquent, module la réponse antimicrobienne et/ou les mécanismes de tolérance de l'hôte. Pour étudier cette hypothèse, nous nous proposons d'utiliser deux approches afin d'analyser dans un premier temps les modifications du microbiote qui se produisent au cours de l'infection par Mtb et dans un deuxième temps d'évaluer le potentiel thérapeutique de souches isolées du microbiote ou de métabolites produits par le microbiote sur l'infection par Mtb. Cette étude nécessite l'utilisation de modèles cellulaires et animaux d'infection par Mtb.

Dans l'ensemble de ces études, les animaux infectés seront utilisés pour déterminer des paramètres de sensibilité à l'infection (survie, charges bactériennes, histologie) ainsi que des paramètres immunologiques (moléculaires et cellulaires). Le nombre maximal d'animaux utilisé sera de 5376 souris se répartissant en 4704 souris C57BL/6 et 672 souris B6 Rag2^{-/-}. Les souris Rag2^{-/-} ne possèdent pas de lymphocytes et nous permettront d'évaluer spécifiquement le rôle des macrophages dans les phénotypes observés. Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 4 étapes dans notre raisonnement.

Tout d'abord, les expériences réalisées in vivo font suite soit à des travaux publiés identifiant des souches comme très prometteuses, soit à des étapes de validation dans des modèles cellulaires (pour les souches non/peu décrites et les métabolites) : ainsi les expériences proposées sont réalisées au stade où les méthodes de remplacement de l'expérimentation animale ont été exploitées et s'avèrent suffisamment prometteuses pour utiliser le modèle intégré murin.

Ensuite, certaines étapes de nos projets (clairement identifiées dans les procédures détaillées) pourront en effet être suivies de décisions de poursuite ou d'arrêt de l'étude en fonction des promesses offertes par les résultats.

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

Finalement, notre équipe a une expertise dans l'utilisation de modèles animaux d'infection par Mtb et l'expérience des années précédentes nous a fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir en première intention des résultats statistiquement significatifs.

La souffrance et/ou le stress animal sont présents à quatre niveaux dans nos expériences : i) lors du gavage ou de l'administration par voie intranasale des souches du microbiote ; ii) lors de l'administration des métabolites par voie intrapéritonéale ; iii) lors de l'infection des animaux ; et iv) lors de l'inflammation pulmonaire chronique induite par l'infection. Ces quatre niveaux de douleurs font l'objet d'une prise en charge spécifique indiquée dans les procédures respectives (anesthésie, surveillance journalière des animaux et l'inspection de leur aspect (posture, poil) accompagnée de prise de poids deux fois par semaine ; les animaux présentant des signes de souffrance sur cette base seront immédiatement euthanasiés.

5055. Les maladies à prion sont des maladies neurodégénératives transmissibles présentes chez l'homme et l'animal. Elles peuvent présenter un risque zoonotique (transmission de l'animal à l'homme, par exemple l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine) ou un risque iatrogène (transmission interhumaine par acte médical ou chirurgical : hormone de croissance, transmission transfusionnelle de la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, vMCJ) qui constituent autant de menaces pour la santé publique. Des données récentes suggèrent que plus de 30.000 britanniques pourraient être porteurs sains de la souche de prion responsable de la vMCJ, ce qui pourrait se traduire par au moins 1000 poches de sang à risque chaque année. En France, les prévalences attendues sont 10 fois inférieures (soit 3000 porteurs sains et 100 poches à risque par an). L'évaluation du risque sanguin lié aux prions reste donc nécessaire pour anticiper d'éventuels nouveaux cas transfusionnels de cette maladie neurodégénérative. Par ailleurs, la découverte ces dernières années de nouvelles souches de prion animales nécessite d'évaluer leur potentiel zoonotique.

Le modèle PNH constitue à ce jour un des meilleurs modèles de la situation humaine vis-à-vis des prions. Tout particulièrement, les macaques sont sensibles aux souches de prion transmissibles à l'Homme, et ils développent des maladies dont les caractéristiques biochimiques et histologiques sont proches de celles observées chez les patients humains. De plus, leur taille et leur physiologie permettent d'évaluer mieux que d'autres modèles animaux (rongeurs, ruminants) les risques de transmission primaire par voie orale et secondaire par voie transfusionnelle.

Pour mesurer l'étendue du risque iatrogène, il est important de pouvoir définir, chez des individus infectés (homme ou animaux), la distribution des prions dans leur organisme. Les études biochimiques et histologiques permettent de mettre en évidence la forme anormale de la protéine du prion (PrP), seul marqueur actuel des maladies à prion, mais leur sensibilité reste limitée et la présence de PrP anormale n'est pas toujours parfaitement corrélée à la présence d'infectiosité. En conséquence, l'infectiosité d'un échantillon dérivé d'un individu animal infecté est actuellement mise en évidence par son inoculation à un hôte réceptif, idéalement de la même espèce (ci-après désignée sous le terme générique de transmission secondaire).

Afin de limiter l'utilisation de macaques pour ces transmissions secondaires, nous avons généré des souris transgéniques exprimant la PrP de macaque (souris tgMac) à la place de la PrP de souris pour s'affranchir de la barrière d'espèce. L'inoculation de ces souris transgéniques avec des organes de primates infectés devrait permettre de mesurer le caractère infectieux de ces organes et réduire ainsi le nombre de PNH utilisés pour ces études de transmissions secondaires. Nous proposons dans cette étude de vérifier dans un premier temps que les souches de prion transmissibles au macaque (10 au total) le soient également aux souris tgMac (200 souris au total).

Dans un second temps, pour les souches confirmées transmissibles, nous évaluerons la présence d'infectiosité dans certains organes dérivés de macaques infectés par lesdites souches, organes pour lesquels les approches in vitro (biochimiques et histologiques) sont négatives. Nous prévoyons de tester au maximum 50 échantillons (minimum 5 par souche), soit jusqu'à 1.000 animaux (20 animaux par inoculum afin de pouvoir mettre en évidence de faibles niveaux d'infectiosité).

Après inoculation des échantillons à tester par voie intracérébrale ou par voie intraveineuse, les rongeurs seront surveillés cliniquement tout au long de l'expérience, ce qui nous permettra d'intervenir de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. A l'installation de signes neurologiques évidents, les animaux seront euthanasiés et la présence de PrP anormale sera recherchée dans leur cerveau par des techniques biochimiques et histologiques.

5056. Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer un potentiel effet anxiolytique ou anxiogène ou anti psychotique d'un candidat-médicament chez le rat soumis à un test d'interactions sociales.

Les rongeurs sont des animaux sociaux qui en présence de congénères ont une tendance naturelle à interagir entre eux. Le test des interactions sociales consiste à mettre un rat expérimental dans un environnement non familier en présence d'un congénère inconnu de poids/âge équivalent à l'animal expérimental et de les laisser interagir pendant un temps défini (10 min). Le niveau d'anxiété des animaux, variant selon les conditions expérimentales définies ci-dessous, est évalué par le temps total passé par les 2

rats en interactions sociales non agressives. Dans ce modèle, il est crucial que les 2 partenaires ne se soient jamais vus/sentis auparavant.

Deux conditions expérimentales peuvent être utilisées :

-les rats sont isolés et stabulés en faible luminosité pendant environ 5 jours ; puis lors du test, l'arène est fortement éclairée ; ce protocole permet de mettre en évidence un effet de type « anxiolytique » du produit à tester ;

-les rats sont isolés et sont stabulés dans les conditions habituelles de luminosité pendant environ 5 jours ; puis lors du test, l'arène expérimentale est faiblement éclairée (intensité lumineuse comparable à celle de la salle de stabulation ou inférieure) ; ce protocole permet de mettre en évidence un effet de type « anxiogénique » ou un effet "antipsychotique "avec induction d'un déficit du produit à tester

Au cours de chaque étude, les rats (8 ou 10 paires soit 16-20 rats par groupe) sont traités avec le candidat-médicament testé à 3 doses différentes, un produit de référence ou le véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée. Un nombre prévisionnel maximum de 7200 animaux est prévu pour 5 ans.

La conception du projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement : ce projet est réalisé sur le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences in vitro) pour évaluer les effets anxiolytiques, anxiogéniques ou anti psychotiques d'un candidat-médicament. A ce jour, le rat est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

Raffinement : ce projet fait l'objet de procédures rigoureuses, il est réalisé par un personnel formé et attentif à la recherche des point limites et au recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire

5057. Les aiguilles d'injection demeurent, dans certains domaines, la méthode la plus largement disponible/utilisée pour délivrer un médicament.

Pour améliorer la compliance chez le patient, il y a un besoin évident de réduire la douleur/sentiment désagréable associé à l'insertion d'une aiguille dans le corps.

Le développement d'aiguilles d'injection qui permettent de limiter la douleur associée à l'injection implique la mise en place de méthodes permettant de quantifier la douleur associée à l'insertion d'une aiguille. Pour ce faire, l'idéal serait de réaliser des études chez l'homme.

Malheureusement, il est très difficile de quantifier objectivement une telle douleur potentielle chez l'homme en raison (i) de limites techniques, (ii) du caractère subjectif d'une expérience douloureuse et (iii) de la forte composante psychologique associée à une telle expérience (iv) des limites éthiques.

L'objectif de ce projet est de développer une méthode permettant de quantifier de manière objective la douleur associée à l'insertion d'une aiguille chez le rat anesthésié selon une technique décrite dans la littérature scientifique. L'animal sera anesthésié, de sorte que la contrainte soit la plus faible possible. Le réflexe moteur induit par un stimulus douloureux mécanique appliqué sur la patte de l'animal sera monitoré par électromyogramme (EMG).

Pour ce projet, le nombre total d'animaux est estimé à 1304 rats (sur 5 ans).

Ce projet est conçu en accord avec le principe des 3Rs:

Remplacement : dans le cadre du développement de certains nouveaux dispositifs médicaux, ce projet est réalisé chez le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour quantifier la douleur associée à l'insertion d'une aiguille. A ce jour, le rat est l'espèce la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : un nombre minimal et homogène d'animaux est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est effectué par :

- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à des procédures réalisées sous anesthésie générale
- la surveillance renforcée des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

5058. Les troubles de la vision sont un problème de santé publique touchant un grand nombre de personnes. Selon l'OMS, en 2002, plus de 161 millions de personnes étaient atteintes de déficiences visuelles dont 15.5 millions de personnes en Europe, plus particulièrement les personnes âgées de plus de 50 ans. Avec le vieillissement de la population, le nombre de personnes atteintes de déficiences visuelles/cécité augmente. Ces déficiences visuelles sont principalement dues à des rétinopathies pigmentaires ou à la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Au cours de ces pathologies, les photorécepteurs de la rétine sont affectés par une dégénérescence. Depuis de nombreuses années, le développement de techniques telles que la prothèse rétinienne redonne l'espoir à ces patients de restaurer leurs propriétés visuelles. Toutefois, cette technologie n'est pas accessible à des patients ayant perdu la vue suite à une rétinopathie diabétique (atteintes des vaisseaux sanguins de la rétine) ou à un glaucome (atteinte du nerf optique). Cette étude s'adresse à ce type de patients (ceux pour qui l'emploi d'une prothèse rétinienne est impossible) et elle a pour but de restaurer la vision chez ces patients.

Au cours de ce projet, nous voulons étudier la possibilité d'utiliser l'optogénétique dans la rétine et/ou des aires visuelles cérébrales comme outil pour restaurer la vision à des patients présentant des déficits visuels. Cette approche se fait en deux étapes. La première consiste en la transfection de neurones par des vecteurs permettant la synthèse d'une protéine sensible à la lumière

(issue d'algue ou de bactérie) capable de créer un courant électrique au travers de la membrane cellulaire et d'activer ainsi la cellule. Cette technique a déjà donné des résultats encourageants chez le rongeur et le primate au niveau de différentes structures cérébrales. Nous injecterons des vecteurs dans une aire choisie préalablement (la rétine, le cortex visuel primaire ou le corps genouillé latéral) afin d'infecter un nombre maximal de neurones chez des primates non-humain. Ce modèle animal a l'avantage d'avoir un système visuel semblable à celui des hommes et de pouvoir apprendre des tâches comportementales visuelles complexes. La seconde étape consiste en l'enregistrement des activités neuronales par différentes méthodes (l'imagerie optique ou ultrasonore fonctionnelle et les enregistrements électrophysiologiques unitaires). Ainsi nous pourrons tester l'efficacité du système visuel à l'aide de 3 méthodes d'enregistrement différentes mais complémentaires

Au total 20 primates seront nécessaires à cette étude. Nous avons recours à ce modèle animal car il nous est nécessaire de disposer d'un système biologique dans son intégrité : de l'œil jusqu'au cerveau afin de comprendre comment les informations visuelles sont encodées au niveau des différentes structures neuronales (rétine, thalamus et cortex).

Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie (vétérinaire compris). Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

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

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

- Réduire : Nous allons utiliser au maximum le principe des fenêtres chroniques afin de pouvoir réutiliser un même animal sur de multiples sessions d'expérimentation. De plus, il nous sera possible de croiser les protocoles de nos animaux afin de limiter une fois de plus le nombre de primates nécessaires. Il est possible aussi que nous récupérons des animaux destinés à être sacrifiés. Nous pourrons donc (une fois ceux-ci anesthésiés) réaliser diverses acquisitions (électrophysiologie/imagerie par ultrasons) avant l'euthanasie.

- Raffiner : Les chirurgies préalables aux expériences étant invasives, nous prendrons grand soin des anesthésies et des analgésies réalisées avec des tests à la douleur réguliers. De plus, une surveillance régulière sera effectuée auprès des animaux afin de s'assurer de leur bien-être constant. Dans le cas contraire on choisira une injection supplémentaire d'anesthésiant ou d'analgésiant, et en dernier recours, à l'euthanasie de l'animal. Nous prendrons grand soin des conditions stériles nécessaires lors des chirurgies afin d'éviter toute infection. Les animaux sont hébergés dans des cages de façon appariée lorsque cela est possible. Une volière sera également mise à leur disposition régulièrement.

5059. Ce projet consiste à évaluer les effets de différents candidats médicaments sur les paramètres cardiovasculaires chez le rongeur ayant subi une lésion irréversible de la moelle épinière. Cette lésion a pour but de bloquer le fonctionnement du système nerveux central et donc de pouvoir observer les effets spécifiques des composés sur le système cardiovasculaire. La mesure des paramètres cardiovasculaires permettra d'évaluer le profil hémodynamique de différents composés dans ces conditions, en s'affranchissant des effets liés au système nerveux central.

Un nombre prévisionnel maximum de 600 animaux sera utilisé dans ce projet (420 rats et 180 cobayes).

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R:

Remplacement : dans le cadre du développement de certains nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'un candidat médicament sur la fonction cardiovasculaire. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'une molécule. A ce jour, le rat et le cobaye sont les espèces les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

Réduction : un nombre minimal et homogène d'animaux est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences, et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est effectué par :

- le suivi des signes cliniques (pour une prise en charges antalgique) et des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

5060. Le cancer du sein représente la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Son traitement repose sur la chirurgie et/ou une chimio ou hormonothérapie adaptée. De façon innée ou en réponse aux traitements thérapeutiques conventionnels, des mécanismes de résistance se mettent en place conduisant à des problèmes cliniques majeurs. Parmi ces mécanismes, l'adaptation du métabolisme du glucose et la surexpression de protéines protégeant les cellules tumorales de la mort ont été décrites comme des événements de cette résistance. La dégradation du glucose a été décrite comme étant essentielle pour augmenter l'expression de ces protéines bloquant la mort cellulaire. Nos résultats in vitro ont montré que le traitement de cellules tumorales mammaires par deux molécules naturelles (le citrate ou l'acide lipoïque) induit un ralentissement de la prolifération cellulaire et une baisse de l'expression de protéine intervenant dans la survie cellulaire.

Le projet a pour but d'aboutir à l'utilisation de molécules qui permettront de ralentir ou d'inhiber le développement tumoral en association avec des agents chimiothérapeutiques. D'un point de vue scientifique, cette étude permettra d'apporter des informations supplémentaires sur l'intérêt d'utiliser le citrate ou l'acide lipoïque dans le traitement du cancer et plus particulièrement dans le cancer du sein.

Le projet fait suite à des résultats obtenus in vitro et nous voulons montrer son intérêt in vivo. Le modèle rongeur que nous souhaitons utiliser pour notre étude est bien référencé dans la littérature scientifique.

D'un point de vue éthique, nous avons établi un nombre minimum d'animaux par groupe de traitement en nous appuyant sur la littérature scientifique et sur un test de puissance statistique (10 animaux par groupe). Tout acte qui sera effectué sur l'animal aura été pensé dans le souci du respect du bien-être de l'animal et de la gestion de la douleur. Les souris seront suivies avec un soin particulier par des personnes compétentes et une définition précise des points limites permettra de détecter et de limiter précocement tous signes de souffrance. Ce projet concernera au maximum 280 souris.

5061. Afin qu'un nouveau composé devienne un médicament sûr et efficace, un ensemble d'études expérimentales utilisant des animaux est nécessaire. Dans ce contexte, il s'agit ici d'évaluer la biodistribution d'un futur médicament contre la schizophrénie, administré par voie intranasale chez le rat en comparaison avec une administration par voie orale. En effet, des effets secondaires cardiaques (potentiellement létaux), ont été notés chez les patients traités par voie orale avec ce médicament et dont un effet pharmacologique du métabolite en serait la cause. Une administration intranasale permettrait de concentrer la dose du médicament au niveau de la cible souhaitée (système nerveux central) tout en limitant son passage dans le sang et donc l'apparition du métabolite à l'origine des effets adverses.

Le projet se divisera en deux parties. Dans une première phase, on cherchera à mesurer la biodistribution du médicament dans le cerveau et le sang après l'administration intranasale à deux doses différentes sur 8 animaux afin de choisir la dose efficace pour la phase principale. L'administration intranasale se fera au niveau de canules implantées chirurgicalement sous anesthésie générale, à la limite entre le museau et le front avec un suivi post-opératoire rapproché et une analgésie. Dans une deuxième phase, on cherchera, sur le même modèle expérimental, à évaluer la cinétique de biodistribution du médicament administré à une seule dose par voie intranasale en comparaison avec une administration orale. Cette partie du projet utilisera au maximum 33 rats, nombre minimal permettant d'obtenir des résultats interprétables statistiquement.

Des prélèvements de sang et de tissus seront réalisés afin de pouvoir doser la molécule.

Dans le cadre de cette étude, les rongeurs sont nés et élevés dans un élevage agréé.

Les animaux seront hébergés selon les standards en vigueur et feront l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. En cas d'apparition de signes cliniques, des mesures appropriées seront prises pour maintenir le bien-être des animaux.

5062. L'accident vasculaire cérébral ou AVC, caractérisé par une perte subite des fonctions cérébrales imputable à une interruption du flux sanguin vers le cerveau, est une cause majeure de morbi-mortalité. Le diabète est facteur aggravant de risque d'AVC. Aujourd'hui, il n'existe pas de traitement neuroprotecteur satisfaisant et le traitement de l'AVC reste essentiellement symptomatique quand la revascularisation précoce n'a pas été possible. Malgré des efforts de recherche fondamentale soutenus, un besoin thérapeutique considérable persiste donc.

Le but du projet est de tester de nouvelles molécules pharmacologiques visant à protéger le cerveau et améliorer le devenir fonctionnel après un AVC. Après avoir subi une ischémie cérébrale transitoire, des souris non diabétiques et des souris diabétiques seront traitées par des nouvelles molécules activant spécifiquement les récepteurs B1 ou les récepteurs B2 du système kallikréine-kinines (SKK). La fonction cérébrale sera évaluée quotidiennement grâce à une échelle neuro-comportementale réalisée à l'aide de plusieurs tests comportementaux. 48 h après l'AVC, l'atteinte cérébrale sera évaluée par une échelle histo-morphométrique caractérisant la taille et le type de lésion observé.

Le choix de la souris est justifié par le fait c'est un modèle reconnu en recherche biomédicale. De nombreux gènes sont conservés entre souris et humains. De plus les manipulations génétiques sont plus faciles sur la souris que le rat.

Dans la mesure du possible, nous appliquerons la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer). Le nombre d'animaux (300) est limité au maximum au vu de la fragilité des animaux liée au diabète et de l'effet attendu des traitements. L'ensemble des manipulations sera réalisé afin de limiter au maximum la souffrance de l'animal. Cependant l'étude des atteintes fonctionnelles de l'ischémie cérébrale transitoire nécessite un modèle in vivo ce que ne permet pas des modèles in vitro.

5063. Le glioblastome (GBM) est la forme la plus agressive de gliomes, qui sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes chez l'adulte. Les GBM sont résistants aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie, représentant une cause importante de mortalité liée au cancer. Alors que de nombreuses altérations génétiques ont été identifiées dans les GBM, on ne sait pas bien comment ces tumeurs se forment.

Les tumeurs utilisent des régulateurs clés du développement normal pour leur croissance. Le régulateur transcriptionnel Id4 contrôle la prolifération et la différenciation des progéniteurs neuraux au cours du développement, et est surexprimé dans les GBMs. Le but du projet est de déterminer la fonction de Id4 dans les GBMs et dans les cellules souches neurales, les cellules d'origine potentielles de ces tumeurs.

Pour ce projet, nous utiliserons comme modèle expérimental la souris. Les cellules souches neurales sont bien caractérisées et de nombreux modèles (comme les souris génétiquement modifiées) sont disponibles pour étudier ces cellules dans cette espèce. Les données de la littérature scientifique fournissent donc une large base de connaissances permettant la préparation précise d'expériences en utilisant le minimum d'animaux.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée : 1) remplacement, les études in vitro et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes ; le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude. 2) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides. Nous utiliserons un nombre total de 241 souris pour ce projet. 3) raffinement, les

procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux.

5064. Définition du projet et durée : ce projet d'une durée de deux ans consiste à explorer un modèle de synucléinopathie de souris transgénique M83 « accéléré ». Ce modèle est créé à partir d'un modèle de souris transgénique homozygote M83 possédant le gène codant pour l' α -synucléine (α -syn) humaine, présente dans les formes familiales de maladie de Parkinson et qui possède la propriété de former des agrégats plus rapidement que la protéine sauvage. Ce modèle « accéléré » a la particularité de présenter des signes cliniques plus précoces que le modèle classique.

Mots clés : maladies neurodégénératives ; synucléinopathie ; α -synucléine ; Tomographie par Emission de Positons ; Imagerie par Résonance Magnétique

Objectifs et attentes du projet : les maladies neurodégénératives sont de nos jours un sujet de santé publique majeur ayant un impact économique et humain destiné à croître avec le vieillissement de la population. La maladie de Parkinson (MP), la démence à corps de Léwy (DCL) et l'atrophie multisystématisée (AMS) font partie d'une famille de maladies neurodégénératives liées à l'accumulation pathologique d'une protéine : l' α -synucléine (α -syn), appelées les synucléinopathies. Ces pathologies font partie des maladies neurodégénératives progressives pour lesquelles il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de diagnostic formel ante-mortem. A ce jour, la confirmation définitive de synucléinopathie n'est possible que sur des études post-mortem histopathologiques.

D'autre part, le chevauchement clinique considérable des synucléinopathies nécessite de développer des biomarqueurs qui permettraient d'améliorer le diagnostic et la compréhension des mécanismes physiopathologiques et d'effectuer une classification en sous-types de maladies au sein des synucléinopathies.

Des études par Tomographie par Emission de Positons (TEP) permettront d'étudier la neurotransmission dopaminergique (en complément de résultats préliminaires sur la neurotransmission sérotoninergique) chez ce modèle de synucléinopathie.

Ce modèle sera également exploré longitudinalement par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), en fonction de l'évolution de la synucléinopathie.

L'objectif de cette étude est donc d'explorer les conséquences de l'agrégation pathologique d' α -syn à différents stades de la maladie.

Règle des 3R et nombre d'animaux : les études in vitro menées avec des fibrilles synthétiques d' α -syn ne permettent pas d'étudier la pathogénicité des agrégats protéiques. Ce modèle « accéléré » avec manifestation de signes cliniques constitue un modèle de synucléinopathie pertinent pour l'étude des processus physiopathologiques.

Ces modalités d'imagerie in vivo ont l'avantage de permettre un suivi longitudinal (de plusieurs mois) des animaux, diminuant ainsi leur nombre (réduire).

Le nombre d'animaux envisagé est de 75 souris maximum (souris transgéniques et contrôles).

La règle de raffinement est aussi appliquée par l'utilisation de cages enrichies (igloo, tunnel, bâton à ronger) et tout au long de cette phase de traitement, un suivi clinique régulier sera réalisé afin de s'assurer du bon état général des animaux.

5065. Ce projet d'une durée de 5 ans, vise à étudier plusieurs cibles cérébrales qui sont impliquées dans des pathologies psychiatriques (troubles de l'humeur incluant la dépression unipolaire) et neurologiques (Alzheimer et troubles neurodégénératifs associés). Ces cibles moléculaires sont choisies en fonction de leurs rôles connus (ou supposés) dans les mécanismes de la pathologie mais également dans le but d'en faire des biomarqueurs de l'évolution de la maladie et/ou de sa thérapeutique.

Notre équipe s'intéresse à deux grands types de cibles cérébrales :

- 1) les récepteurs neuronaux ou hormonaux,
- 2) les protéines agrégées ou la myéline.

Les travaux présentés dans ce projet se répartissent selon 4 axes :

- A) la neurotransmission, avec l'étude des récepteurs neuronaux de la sérotonine,
- B) la transmission hormonale avec le ciblage des récepteurs de l'ocytocine,
- C) l'agrégation pathologique de protéines sous forme fibrillaire,
- D) la démyélinisation avec le ciblage de la matière blanche cérébrale.

L'objectif de ces développements et validations précliniques de radiotraceurs est de pouvoir proposer, dans quelques années, des radiopharmaceutiques utilisables en Tomographie par Emission de Positons (TEP) chez l'homme et dont l'imagerie sera un apport pour le diagnostic, la compréhension physiopathologique et l'évaluation thérapeutique.

La TEP est une technologie d'imagerie permettant d'explorer les systèmes de neurotransmission et les modifications physiopathologiques du cerveau, elle constitue un outil central de la recherche translationnelle entre les études précliniques (chez le modèle animal) et les études cliniques (chez les patients).

Règle des 3R et nombre d'animaux : notre expérience dans l'évaluation de molécules candidates nous permet d'estimer à 468 rats ou souris et 7 chats, le nombre maximal utilisés. Les modalités d'imagerie in vivo ont l'avantage de permettre un suivi longitudinal des animaux, diminuant ainsi leur nombre. Nous allons utiliser mettre en œuvre un enrichissement pour les rongeurs (igloo, tunnel, bâton à ronger) ou hébergement en groupe pour les chats dans une pièce dédiée et enrichie (arbres à chats, grattoirs, jeux). Tout au long de la phase de traitement, un suivi clinique régulier sera réalisé afin de s'assurer du bon état général des animaux.

5066. *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie responsable d'infection pulmonaire grave chez les patients atteints de mucoviscidose et chez les patients en réanimation. Cette bactérie, au gré de successives antibiothérapies, devient résistante à tous les antibiotiques habituellement utilisés. Aussi il est capital de rechercher des alternatives thérapeutiques aux antibiotiques comme les probiotiques. Les probiotiques, parmi lesquels certaines souches de *Lactobacillus*, sont des microorganismes qui, administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte.

Nous avons sélectionné précédemment certaines souches de *Lactobacillus* issus de lait ou de sujets sains. Lorsque ces souches sélectionnées sont injectées de manière préventive à un groupe de souris dont le poumon est infecté par *Pseudomonas aeruginosa* pendant 4 heures, la quantité de *Pseudomonas aeruginosa* diminue de façon significative par rapport au groupe de souris n'ayant pas reçu les *Lactobacillus*. Ces résultats prometteurs nous conduisent à poursuivre nos expérimentations en analysant 2 nouveaux paramètres :

-nous allons sélectionner des nouvelles souches de *Lactobacillus* issues de patients atteints de mucoviscidose ayant une bonne activité contre *Pseudomonas aeruginosa*.

-nous allons réaliser les analyses supplémentaires immunologiques, 6h et 24 h après l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* pour mieux comprendre l'effet des souches de *Lactobacillus*.

Nous choisissons de travailler avec deux cocktails différents de souches de *Lactobacillus* afin d'explorer le support immunologique de l'activité probiotique. Nous travaillerons ainsi avec un premier cocktail de 3 souches de *Lactobacillus* possédant une bonne activité contre *Pseudomonas aeruginosa* (groupe *Lactobacillus* Fort), et un second cocktail composé de 3 souches dénuées d'activité contre *Pseudomonas aeruginosa* (groupe *Lactobacillus* Faible). Ce groupe nous permettra de juger si les *Lactobacillus* exercent leur activité anti-*P. aeruginosa* au travers de l'inhibition des facteurs de virulence de *P. aeruginosa* ou par l'intermédiaire d'une activité immunomodulatrice. Nous utiliserons donc 102 souris réparties en 5 groupes : (1) groupe placebo de 18 souris, (2) groupe infecté à *Pseudomonas aeruginosa* de 21 souris, (3) groupe non infecté et traité par des *Lactobacillus* à forte activité de 21 souris, (4) groupe infecté à *Pseudomonas aeruginosa* et traité par des *Lactobacillus* à forte activité de 21 souris, et (5) groupe infecté à *Pseudomonas aeruginosa* et traité par des *Lactobacillus* à faible activité de 21 souris.

Le critère de jugement principal sera la quantité de *P. aeruginosa* dans le poumon 24 heures après l'instillation de la bactérie.

Des dosages cytokiniques et cytologiques pulmonaires seront réalisés 6 heures et 24 heures après l'infection.

Nous espérons que l'utilisation de ce mélange de *Lactobacillus* sélectionnés sur des données in vitro permettra de diminuer la quantité de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau des poumons des souris et pourra donc être proposé ultérieurement comme traitement contre cette bactérie. Nous espérons également éclaircir les connaissances sur le mode d'action des souches de *Lactobacillus*.

L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement. En effet les *Lactobacillus* ont été sélectionnés 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'anxiété des animaux (principe de raffinement).

5067. Chez l'homme, l'exposition à un stress intense et traumatique peut induire un syndrome de stress post-traumatique (ou PTSD pour «post-traumatic stress disorder») chez certains individus. L'une des caractéristiques de ce syndrome est la trop longue persistance dans le temps des souvenirs du trauma, ce qui est généralement considéré comme représentant un déficit d'oubli de ce type de souvenirs chez les patients. Chez l'animal, ce type de mémoire traumatique peut être stimulé en utilisant un test de conditionnement aversif dans lequel les animaux seront mis dans une situation stressante en présence ou non d'un stimulus sonore (son). Le fait de les remettre le lendemain dans le même environnement ou de leur ré-administrer le même son va induire un rappel de ce qu'ils ont vécu et une réaction (immobilité) qui peut être assimilée à un comportement de peur.

Le but de ce projet est d'identifier des composés capables de bloquer le développement du PTSD chez l'homme, en évaluant leur capacité chez le rat à atténuer efficacement, à bloquer ou à éteindre cette mémoire. Pour cela, lors d'une première étape, les conditions expérimentales du test seront validées chez des animaux contrôles ou administrés avec un produit de référence positive (procédure 1). Ensuite (procédure 2), ce protocole sera utilisé pour tester des nouveaux composés. Dans une troisième étape, un second protocole sera utilisé pour tester la capacité des composés à accélérer l'extinction de ce type de mémoire (procédure 3).

Au cours de chaque étude, les animaux (un nombre prévisionnel total de 1750 rats sur 5 ans) seront évalués dans ce test de conditionnement aversif. Le candidat médicament sera administré soit avant la phase de conditionnement soit avant la phase de test ou d'extinction. A la fin de chaque étude, des prélèvements de sang ou de tissus pourront être effectués.

Ce projet intègre la Règle des 3R :

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur ce type de mémoire émotionnelle. Or avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'un candidat médicament. A ce jour, le rat est l'une des espèces (avec la souris) qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude car présentant une réponse robuste et reproductible.

Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par étude est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est effectué par :

- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

5068. L'hormone thyroïdienne est essentielle au développement du cerveau. L'hypothyroïdie au cours du développement induit un retard mental sévère et irréversible. Le défaut de signalisation thyroïdienne peut avoir différentes origines (manque d'hormone, mutation des récepteurs ou de transporteurs,...), nécessitant des approches thérapeutiques adaptées. Cependant, les mécanismes d'action de l'hormone thyroïdienne au niveau du cerveau sont très mal connus, si bien que dans de nombreux cas, il n'existe pas à ce jour de traitement à proposer aux patients, même si la maladie est identifiable au niveau génétique. Il existe deux types de récepteurs de l'hormone thyroïdienne, répartis dans tout l'organisme : alpha et beta. Les deux types de récepteurs sont présents dans le cerveau, mais leurs rôles respectifs ont été difficiles à évaluer jusqu'à présent en raison de la difficulté à séparer les effets centraux des effets périphériques de l'hormone. Pour surmonter cet obstacle, nous utilisons des lignées de souris permettant un ciblage spécifique des récepteurs alpha du cerveau. Ce projet porte sur des lignées pour lesquelles une mutation du récepteur alpha est exprimée dans les neurones GABAergiques, des neurones inhibiteurs essentiels à l'équilibre excitation/inhibition au sein du cerveau.

L'objectif de cette étude est d'analyser, à plusieurs échelles, les conséquences induites par l'expression de cette mutation dans les neurones GABAergiques et de rechercher les mécanismes impliqués. Cette étude contribuera à progresser dans la compréhension des fonctions des récepteurs de l'hormone thyroïdienne dans le cerveau. Elle repose sur des croisements de lignées de souris transgéniques. Les procédures sur l'animal consisteront d'une part, en des observations comportementales et d'autre part en des prélèvements de cerveaux pour analyses moléculaires et histologiques. Selon les analyses auxquelles il est destiné, le prélèvement de cerveau sera réalisé soit post mortem, soit sous anesthésie profonde et sans réveil, si bien qu'aucune souffrance animale n'est attendue lors de ce geste.

Compte tenu de la complexité du cerveau, des études in vivo sont nécessaires pour étudier le rôle de la signalisation thyroïdienne dans cet organe. Des études in vitro sont réalisées en parallèle, notamment pour aborder les aspects moléculaires de cette signalisation. Pour les expériences in vivo, nous travaillons avec des souris car actuellement c'est la seule espèce chez laquelle il existe des modèles ciblant l'expression de mutations des récepteurs de l'hormone thyroïdienne dans le cerveau. Le nombre de souris indiqué a été calculé pour assurer un nombre suffisant d'observations pour répondre aux questions posées, compte tenu des aléas expérimentaux prévisibles. C'est un nombre maximum, dans la mesure où nous arrêterons chaque procédure dès que nous aurons réalisé un nombre d'observations suffisant pour conclure. Les souris seront suivies avec un soin particulier, afin de détecter précocement tout signe de souffrance. Ce projet concernera 520 souris au maximum.

5069. A l'heure actuelle suite à une lésion carieuse, de nature érosive ou traumatique, seul un traitement invasif de la pulpe dentaire (le tissu où circulent les nerfs et les vaisseaux à l'intérieur de la dent) est possible et consiste en son élimination complète puis son remplacement par un matériau plastique, biocompatible mais inerte. A terme, ce traitement invasif rend la dent plus sensible à la fracture et aux infections. Avec l'allongement de la durée de vie, la nécessité de préserver la pulpe vivante en l'aidant à cicatrifier est un enjeu majeur de santé publique.

Les connaissances de la physiopathologie pulpaire permettent d'envisager un processus naturel de cicatrisation lorsque la pulpe est partiellement atteinte. La pulpe se défend en sécrétant une dentine dite "de réparation" qui se dépose au sein de l'espace pulpaire. Plus la lésion se répare rapidement, plus la barrière de tissu calcifié qui isole la pulpe dentaire est efficace.

La sclérostine, une protéine exprimée dans l'os et aux stades précoces du développement dentaire, est un puissant activateur de la résorption osseuse. Suite à de nombreux travaux de recherche, des médicaments anti-sclérostine sont aujourd'hui utilisés pour limiter la destruction osseuse dans le cadre de l'ostéoporose post-ménopause. Nous émettons l'hypothèse qu'au niveau de la pulpe dentaire lésée, l'expression de la sclérostine par les cellules qui sécrètent la dentine de réparation pourrait retarder la cicatrisation pulpaire ce qui compromet à terme la vitalité pulpaire et donc le devenir de la dent.

L'objectif de cette étude est donc de déterminer si la sclérostine joue un rôle dans la régulation du processus de réparation pulpo-dentinaire et, si oui, si l'inhibition de cette protéine pourrait être utilisée comme une stratégie thérapeutique pour accélérer la réparation.

Pour ce faire, nous allons utiliser un modèle classique de lésion pulpaire chez des souris invalidées pour la sclérostine afin de voir si la réparation est accélérée (et donc plus efficace) que chez des souris sauvages. La chirurgie sera réalisée sur un nombre d'animaux restreint (25 souris invalidées pour sclérostine et 25 souris sauvages) mais suffisant pour obtenir des résultats significatifs pour les différents stades de réparation observés. Les souris seront suivies longitudinalement pendant 4 mois par imagerie in vivo micro-CT et des prélèvements seront réalisés à différents temps pendant la période de suivi pour des analyses en histologie conventionnelle. Pour éviter toute douleur chez la souris, la chirurgie et toutes les séances d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale, la dent sera réparée avec du ciment. Un suivi attentif des signes d'infection et de douleurs avec des antalgiques et des antibiotiques prévus si nécessaire

5070. L'athérosclérose est l'une des principales causes de mortalité dans les pays industrialisés. Cette maladie est à l'origine de la plupart des maladies cardiovasculaires. Elle se caractérise par une accumulation de cholestérol dans la paroi des vaisseaux qui bouche les artères, gêne le fonctionnement du cœur et conduit à la "crise cardiaque" ou aux accidents vasculaires cérébraux (AVC). Nous avons démontré qu'une molécule appelée "Wnt5a" limite l'accumulation du cholestérol.

L'objet de ce projet est l'identification des mécanismes par lesquels Wnt5a contrôle le devenir du cholestérol dans la cellule musculaire de la paroi des vaisseaux, empêche le cholestérol de s'accumuler dans cette paroi et protège contre les maladies cardiovasculaires.

Nous utiliserons des souris génétiquement modifiées dont les cellules musculaires des vaisseaux sanguins sont dépourvues de Wnt5a (Sm22Wnt5a). Tout d'abord nous caractériserons ce tout nouveau modèle animal afin de déterminer si la présence de

Wnt5a dans les cellules des muscles des vaisseaux n'est pas primordiale pour le développement du système cardiovasculaire et donc pour la survie de l'animal. Nous suivrons, par échographie, le développement des embryons, puis des animaux adultes pendant plusieurs mois. Nous confirmerons chez l'animal adulte, le rôle protecteur de Wnt5a en donnant aux souris Sm22Wnt5a ainsi qu'aux souris témoins un régime riche en cholestérol qui aboutira à la formation de lésions d'athérosclérose.

Avec ce modèle nous pourrions étudier les mécanismes contrôlant l'accumulation du cholestérol dans les vaisseaux de l'organisme entier. Nous utiliserons 220 animaux au maximum sur 5 ans.

Remplacement :

Le modèle animal est, pour le moment, le seul modèle qui permet d'étudier dans son ensemble les phénomènes complexes mis en œuvre dans l'athérosclérose. En effet cette atteinte est multifactorielle et nécessite un grand nombre d'acteurs comme les cellules de l'immunité, les particules de cholestérol circulantes (les LDL ou mauvais cholestérol), les globules rouges. Toutes ces conditions ne sont, malheureusement, pas reproductibles fidèlement dans un modèle de culture cellulaire. Nous utiliserons au maximum les cellules en culture de type musculaire lisse vasculaire humaine (lignée cellulaire) pour approfondir les résultats obtenus sur les animaux et étudier certains mécanismes liés à l'utilisation du cholestérol par les cellules.

Réduction :

Si nous arrivons à mettre en évidence un mécanisme d'action de Wnt5a rapidement, nous n'utiliserons pas le nombre total d'animaux demandé (220 animaux sur 5 ans au total).

Nous utiliserons également les souris Sm22Wnt5a et témoins afin de faire des cultures de cellules musculaires de vaisseaux sanguins et de cellules cardiaques, dans le but d'identifier les mécanismes cellulaires par lesquels Wnt5a protège de l'accumulation du cholestérol. La partie « culture de cellules » permettra de limiter le nombre d'animaux nécessaire à notre étude.

Raffiner :

Nous mettrons en place différents points limites dans notre expérimentation pour atténuer autant que faire se peut la gêne de nos animaux liée au régime riche en cholestérol que nous leur donnerons : nous tiendrons compte de l'aspect et du comportement des animaux au cours du régime (œdèmes, prostration). Pendant la phase de régime, les animaux seront 3 à 5 par cage, avec des enrichissements sous forme de morceaux de bois pour que les animaux usent leurs dents et un carré de coton qu'ils pourront utiliser pour confectionner leur nid. Le suivi de l'état des animaux sera quotidien.

5071. La douleur est un problème de santé publique majeur. Elle diminue la qualité de la vie et son traitement a un impact économique considérable. Bien que des progrès importants aient été réalisés dans la compréhension des mécanismes de la douleur, peu de progrès ont été faits dans le développement de nouveaux analgésiques et l'administration d'opiacés demeure le moyen le plus efficace de traiter les douleurs moyennes à sévères. Malheureusement pour les patients, les opiacés présentent de nombreux effets secondaires, parmi lesquels le développement d'une tolérance à leurs effets analgésiques, ce qui conduit inévitablement à une diminution de l'effet du traitement au cours du temps. Ce phénomène serait dû à l'activation de systèmes anti-opioïdes induite par l'administration prolongée d'opiacés, conduisant ainsi au développement d'une hyperalgésie s'opposant à l'effet analgésique de l'opiacé. Les douleurs chroniques, qui répondent souvent faiblement aux opiacés, sont fréquemment associées au développement d'une hypersensibilité à la douleur. Ces observations suggèrent que les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'hyperalgésie induite par les opiacés pourraient avoir des points communs avec ceux impliqués dans le développement de l'hyperalgésie induite par les douleurs chroniques. Des résultats récents indiquent que les récepteurs aux neuropeptides RF-amides sont impliqués dans ces phénomènes. Des antagonistes sélectifs des différents récepteurs RF-amides ont été récemment identifiés et seront utilisés pour mieux comprendre l'implication de chaque récepteur dans la modulation du signal nociceptif et le développement de l'hyperalgésie. L'étude de l'activité de chacun des antagonistes sélectifs sera réalisée dans différents modèles d'hyperalgésie induite par les opiacés et par des douleurs persistantes. A terme, ces études permettront d'identifier de nouvelles cibles potentielles pour le traitement de la douleur.

Adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer

La caractérisation d'antagonistes sélectifs des récepteurs RF-amide dans différents modèles d'hyperalgésie est un passage incontournable pour mieux comprendre l'implication de ces récepteurs dans la modulation de la douleur. Il n'existe pas de modèles in vitro permettant de réaliser ce travail. Les composés qui seront évalués ont été sélectionnés in vitro pour leur activité, leur sélectivité et leurs caractéristiques physicochimiques.

Réduire

Compte tenu de la variabilité dans les différentes expériences prévues, le nombre d'animaux est limité à 10 par groupe ce qui permet d'obtenir des résultats exploitables en termes statistiques.

Raffiner

Une limite est fixée pour chaque test nociceptif utilisé au-delà duquel la stimulation nociceptive est arrêtée en absence d'une réaction de l'animal. Les animaux sont hébergés dans des animaleries dont le fonctionnement a été conçu pour maximiser le confort et limiter la souffrance des animaux. En particulier, les souris sont hébergées en cohorte, elles font l'objet d'observations régulières tout au long de l'expérience, l'enrichissement par un carré de coton est systématiquement appliqué à toutes les cages.

Dans le cas des modèles de douleur persistante, les animaux sont sous observation quotidienne pour détecter les signes de détresse et de douleur à prendre en charge par des procédés antalgiques et des points limite sont prévus.

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet : 1350 souris C57BL6N

5072. Le cancer du sein est la première cause de décès liés à une pathologie tumorale chez la femme. Les métastases se logent majoritairement dans les os, les poumons et le foie, et sont la cause majeure des décès. Les mécanismes de la progression tumorale et de la dissémination métastatique du cancer du sein sont encore mal connus.

Les métastases proviennent de cellules de la tumeur primaire, disséminées soit par le sang soit par la lymphe. Cette dissémination nécessite la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) et lymphatiques (lymphangiogenèse) à partir de vaisseaux existants. Il s'agit de deux processus primordiaux dans le développement physiologique normal, mais également dans des pathologies vasculaires ou au cours du développement tumoral et dans la dissémination des métastases.

Nous venons de mettre en évidence un rôle crucial du facteur de croissance circulant, BMP9, dans la maturation du réseau vasculaire sanguin et lymphatique. Qu'en est-il de son implication dans la progression tumorale ?

Notre étude vise à approfondir la compréhension du rôle de BMP9 dans la régulation de la prise et de la croissance tumorale ainsi que dans la dissémination de métastases. Pour cela, nous utiliserons des souris transgéniques exprimant spécifiquement dans les glandes mammaires un oncogène. Ces souris développent spontanément à partir de 12 semaines des tumeurs mammaires. Nous comparerons l'apparition de ces tumeurs chez des souris exprimant ou pas la protéine BMP9. A l'aide de ce modèle, nous analyserons la prise et la croissance tumorale, la dissémination métastatique pulmonaire, le développement du réseau vasculaire sanguin et lymphatique de la tumeur et des ganglions lymphatiques « sentinelles » (les plus proches de la tumeur).

Aucun modèle cellulaire ou informatique ne peut fournir ces informations, importantes pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques anti-tumorales. Le recours à des investigations in vivo est aujourd'hui nécessaire.

Les modèles rongeurs de cette étude sont nés et ont été élevés dans un établissement agréé. Leur nombre (650) a été déterminé sur la base des données de la littérature et pour répondre aux exigences d'un test statistique (test de Mann Whitney). Ainsi, nous veillons à n'utiliser que le minimum nécessaire d'animaux pour assurer la validité des résultats. Les animaux sont hébergés en groupe et en milieu enrichi de modules permettant d'améliorer leurs conditions de vie. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée (injection d'un antalgique ou euthanasie de l'animal si nécessaire) dès le moindre signe de souffrance.

5073. La gestion efficace d'un accident ou d'une attaque impliquant l'exposition externe de personnes à des rayonnements ionisants nécessite un triage rapide et efficace des personnes exposées, ainsi qu'une évaluation de la dose absorbée par irradiation externe (en Gray), selon les recommandations nationales et internationales. L'évaluation de la dose absorbée permet de déterminer le type de suivi dont devra bénéficier la personne irradiée en fonction de la dose reçue, ainsi que les traitements à mettre en œuvre pour les soulager. Les méthodes actuellement disponibles ne permettent pas de réaliser ce tri radiologique sur le terrain et de manière rapide. Dans le cadre de projets soutenus par la commission Européenne, nous avons mis au point et breveté un test de dépistage, qui permet de répondre à ces problématiques, en évaluant par des mesures biologiques l'irradiation, accidentelle ou non, reçue par un individu. Ce test est basé sur un prélèvement sanguin et plusieurs prélèvements pileux à différents endroits du corps, réalisés dans les heures/jours qui suivent l'irradiation. Les prélèvements sont traités, et un marquage par anticorps permet de mettre en évidence l'irradiation et de la quantifier. Cette méthode est innovante par plusieurs aspects :

- elle permet de réaliser une cartographie de l'irradiation ;
- elle fournit des résultats en moins d'1h ;
- elle est adaptée à une utilisation sur le terrain.

Cet outil permettra une gestion plus efficace des accidents d'irradiation, en orientant les individus vers les structures de soins adaptées et en minimisant les réactions de panique et d'angoisse des personnes.

Le test de dépistage de l'irradiation externe a été mis au point et développé à partir de lignées cellulaires, et de prélèvements sanguins et pileux humains conservés dans un milieu de culture, et irradiés in vitro immédiatement après prélèvement. Nous souhaitons maintenant valider cette méthode en établissant un modèle se rapprochant le plus possible de l'irradiation accidentelle d'un individu. L'irradiation d'animaux vivants (rongeurs élevés à des fins d'expérimentation), dans des gammes de doses compatibles avec la réalité d'un accident d'irradiation devient incontournable. Le choix du rongeur découle de deux observations :

- ce sont des mammifères, dont les réactions physiologiques sont proches de l'Homme ;
- la réponse à l'irradiation de ces animaux est connue dans la littérature, et nous permettra donc de positionner notre outil par rapport à des données déjà existantes. Les animaux seront irradiés en corps entier par des rayonnements gamma (source de césium 137) à des doses comparables à celles pouvant être rencontrées dans une situation accidentelle, et génératrice d'effets déterministes (pathologies radio-induites). Du sang et des poils seront prélevés à différents temps après irradiation, immédiatement après euthanasie de l'animal, pour mesurer des paramètres spécifiques de la réponse à l'irradiation (marqueurs protéiques du sang et des bulbes pileux). Ce projet sera réalisé sur 96 animaux qui correspondent au nombre minimal d'animaux pour obtenir un résultat statistique fiable. Le prélèvement immédiatement après euthanasie permet d'être dans des conditions transposables à l'homme, tout en limitant la souffrance de l'animal.

Cette expérimentation nous permettra de construire des courbes dose/réponse en fonction du temps écoulé depuis l'irradiation. Les courbes seront comparées aux résultats obtenus sur les prélèvements humains irradiés ex vivo. L'ensemble de ces éléments de validation sera intégré au dossier d'homologation CE du test de dépistage. Notre objectif in fine est la commercialisation du test en France et à l'international.

Les animaux sont hébergés en groupe, permettant ainsi de reproduire leur mode de vie dans la nature. Des modules sont ajoutés dans les cages pour varier leurs activités. Ils seront observés quotidiennement pour détecter d'éventuelles douleurs. Dans ce but, des critères d'arrêt ont été définis dans le projet, ce qui permet d'intervenir rapidement pour éliminer toute souffrance des animaux

5074. Les progrès de la médecine ont permis une augmentation importante de notre espérance de vie. En contrepartie, les pathologies liées au vieillissement (cancers, diabète, faible renouvellement des tissus) peuvent diminuer la qualité de vie des personnes âgées. Une sénescence cellulaire et une inflammation chronique semblent contribuer à l'apparition de ces pathologies. Nos dernières études ont permis l'identification d'une protéine qui s'accumule avec l'âge dans certaines cellules de la peau. Nos études préliminaires, avec des cellules en culture, indiquent que cette protéine agit comme un régulateur qui favorise l'expression des gènes d'inflammation lorsque les cellules de la peau vieillissent.

Nous voudrions comprendre les fonctions physiologiques de cette protéine chez l'Homme et tester son rôle possible dans le développement d'un état d'inflammation chronique associé à des pathologies lors du vieillissement, point de départ éventuel au développement de nouveaux traitements. Pour cela, il est nécessaire de comparer l'inflammation et le vieillissement entre un modèle témoin et un modèle pour lequel le gène codant la protéine d'intérêt est invalidé. Seul un modèle animal est capable de rendre compte de la complexité de ces deux phénomènes. Comme il existe un modèle rongeur invalidé spécifiquement pour le gène codant la protéine d'intérêt, nous l'utiliserons pour notre étude. Tous les animaux proviendront d'élevages reconnus.

Dans ce projet, des prélèvements sanguins et d'organes seront réalisés sur les animaux, aux âges de 6, 12, 18, et 24 mois, afin de procéder à une batterie de tests biochimiques permettant de caractériser l'état physiologique des organes et le niveau des facteurs inflammatoires circulant dans le sang.

Nous prévoyons l'utilisation de 120 rongeurs de laboratoire pour cette étude, ce qui est un minimum nécessaire pour obtenir des analyses statistiques fiables.

Les animaux seront hébergés selon les règles en vigueur dans l'animalerie, conformes à la législation. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Par exemple, les animaux seront systématiquement anesthésiés avant un prélèvement sanguin. Leur état de santé sera surveillé tout au long de l'expérience, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Des critères d'arrêt (poids des animaux, apparence, comportement) sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuelles pathologies. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

5075. Beaucoup de chevaux sont soumis à des efforts athlétiques important, même à un âge avancé. Ainsi, il est fréquent que des chevaux souffrent de douleurs qui entraînent une diminution de leur bien-être et de leurs performances. De plus, les réactions causées par la douleur chez le cheval peuvent parfois être violentes et se révéler dangereuses pour son entourage.

Pour mettre sur le marché une nouvelle formule de produit antalgique injectable, celle-ci doit être testée in vivo afin d'assurer que la formule n'est pas néfaste pour la santé des chevaux. Les tests doivent être réalisés sur des chevaux, car il s'agit de l'espèce cible.

La présente étude a pour but d'évaluer l'impact d'une nouvelle formule destinée au cheval de solution antalgique injectable. Ce produit est aujourd'hui utilisé chez l'homme uniquement. La dose commerciale de produit sera testée sur un, puis sur trois chevaux suivant le protocole précisé ci-dessous.

Dans un premier temps la dose commerciale du produit sera testée sur un cheval. Le produit sera injecté au cheval le premier jour de l'étude. Durant la première demi-heure, le cheval sera sous surveillance continue. Trente minutes après l'injection la zone concernée sera observée et l'inflammation locale sera évaluée. Trois heures après l'injection, l'état général et locomoteur du cheval sera évalué. Le cheval sera ensuite gardé en observation durant quatorze jours. Au cours de cette période, la zone d'injection sera contrôlée quotidiennement et la santé générale du cheval ainsi que sa locomotion seront suivies quotidiennement. Dans le cadre du suivi de la santé, une prise de sang sera effectuée avant l'injection du produit, puis sept et quatorze jours après injection. De plus une échographie de contrôle sera réalisée sept jours après injection.

Si la zone d'injection, la santé générale et la locomotion du cheval ne présentent pas de signes anormaux au terme de la période d'observation, le test sera reproduit avec trois autres chevaux. Ces chevaux seront suivis pendant quatorze jours selon le même protocole que le premier cheval.

En cas de rupture de la santé ou du bien-être observé chez un cheval, sur conseil vétérinaire, tout animal sera retiré du protocole et soigné.

5076. Le sepsis se définit comme une réaction inflammatoire généralisée de l'organisme vis-à-vis d'une infection (bactérie, virus, champignon ou parasite). Les médiateurs de l'inflammation comme le TNF transforment la surface endothéliale en lui conférant des propriétés procoagulantes et pro-inflammatoires. Ces caractéristiques, associées à la dysfonction vasculaire endothéliale-dépendante, favoriseraient les anomalies de perfusion tissulaire, la souffrance cellulaire et l'apparition de la défaillance d'un ou plusieurs organes, puis au décès de l'individu, si le sepsis n'est pas traité rapidement. Le sepsis grave représente 75 000 nouveaux cas par an en France, et 750 000 nouveaux cas par an aux USA. La mortalité élevée demeure essentiellement conditionnée par la persistance des défaillances d'organes malgré le traitement, notamment la défaillance respiratoire qui est la plus fréquente (50% de l'ensemble des défaillances d'organe), et celle qui conditionne le pronostic vital (plus de 30-40% des décès attribués à la défaillance respiratoire). Les cellules endothéliales jouent un rôle majeur dans le maintien de la fluidité sanguine. Elles expriment à leur surface des molécules anticoagulantes comme la protéine C, la protéine S, l'antithrombine III et l'activateur tissulaire du plasminogène, et synthétisent des médiateurs vasorelaxants comme le NO et la PGI₂. Au cours du sepsis, l'endothélium perd son caractère anticoagulant, exprime des molécules d'adhérence pour les plaquettes et les leucocytes de type E-sélectine ou ICAM-1.

Associé à une diminution de la synthèse des médiateurs NO et PGI₂, toutes ces modifications endothéliales vont contribuer à modifier les conditions rhéologiques locales et favoriser l'hypoperfusion tissulaire. L'importance de l'atteinte endothéliale dans la physiopathologie du sepsis commence à être appréhendée aujourd'hui en clinique. Plusieurs études ont confirmé, directement ou indirectement, l'existence de ces lésions chez des patients avec un choc septique, en soulignant le caractère pronostique des marqueurs biologiques de l'atteinte endothéliale. Le polynucléaire neutrophile (PNN) joue un rôle majeur dans la réaction inflammatoire associée au Syndrome de Détresse Respiratoire Aigu. Ces leucocytes s'accumulent dans les espaces interstitiels et alvéolaires. Les PNNs sont chargés de tuer les microorganismes présents au niveau des poumons à travers la libération de médiateurs cytotoxiques comme les radicaux libres de l'oxygène, les protéases à sérine, des métalloprotéases et des médiateurs proinflammatoires. Endocan est un protéoglycane produit et sécrété spécifiquement par l'endothélium vasculaire et de manière préférentielle par l'endothélium pulmonaire. L'endocan est augmenté dans les états septiques graves et représente un marqueur prédictif de la survenue d'une défaillance respiratoire en pathologie septique et chez les polytraumatisés. Un fragment de dégradation majeur de l'endocan est produit par l'action de la cathepsine G neutrophile. Ce métabolite est augmenté dans les états septiques graves. La fonction biologique de l'endocan est mal connue. L'endocan exercerait une activité anti-inflammatoire en inhibant les fonctions dépendantes du LFA-1. En revanche, son métabolite exercerait une activité inverse proinflammatoire. Le projet de recherche explorera le rôle d'endocan et de son métabolite majeur dans le contrôle de la réaction inflammatoire, à travers l'analyse des relations structure-fonction par mutagenèse dirigée ou protéolyse, et l'étude des fonctions à l'aide de modèles de migration transendothéliale des leucocytes (NK, PNN, monocytes, lymphocyte) *in vitro* à travers une monocouche de cellules endothéliales, et *in vivo* à travers la migration intra-pulmonaire des PNNs au cours du choc endotoxique (chez des souris sauvages et des souris génétiquement déficientes pour endocan, cathepsine G et/ou élastase) et d'autres modèles de sepsis expérimental comme la ponction ligation caecale. Le projet de recherche explorera aussi le rôle de la Cathepsine G et de l'élastase *in vitro* et *in vivo* dans le contrôle de la réaction inflammatoire via la balance entre l'endocan et son métabolite. Dans ce contexte, différentes approches thérapeutiques seront explorées : traitement du sepsis par un inhibiteur enzymatique de la cathepsine G et par l'endocan lui-même ou ses dérivés, dans le cadre d'une administration par injection intra-péritonéale, intra-veineuse ou en perfusion (pompe Alzet). Pour ce faire, 18592 souris seront nécessaires, réparties sur 6 souches différentes (Balb/C, C57Bl6/J, 129 Sv, KO endocan, cathepsine G et/ou élastase). Au total 9 procédures expérimentales seront réalisées, au cours desquelles seront effectuées différents modèles de choc septique/endotoxique, avec des cinétiques d'expression de biomarqueurs et l'administration de molécules d'intérêt. Afin de réduire au maximum le nombre de souris nécessaire, les 3 voies d'administration des molécules (*i.v.*, *i.p.*, osmopompe) seront préalablement testées sur un premier fond génétique (C57Bl6 ou 129 Sv) afin de déterminer celle qui permettra d'observer l'effet biologique attendu. Seulement après, le protocole sera transféré sur l'ensemble des autres fonds génétiques. De la même manière, la dose biologiquement fonctionnelle des protéines évaluées sera préalablement testée sur un premier fond génétique avant de transférer le protocole aux autres fonds et procédures expérimentales.

Des mesures de raffinement pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux seront prises par enrichissement du milieu (ajout de «refuge rouge» dans chaque cage), établissement d'un score clinique afin de prévenir au plutôt la souffrance de l'animal et des points limites, mises en place de soins pré-, per- et post-opératoires pour diminuer au maximum la douleur de l'animal et injection d'anesthésique/analgésique lors d'administration potentiellement stressante.

5077. Les tests décrits dans ce projet permettent l'évaluation de l'effet des substances sur le système hémodynamique (cardiaque, systémique, pulmonaire, rénal...) et le rythme cardiaque (électrocardiogramme): effet secondaire dans le contexte de la pharmacologie de sécurité principalement (études réglementaires) ou modèle d'efficacité (recherche de mécanismes d'actions). L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et est mise en œuvre au sein du laboratoire.

Ces tests nécessitent l'utilisation d'animaux. Même si des tests *in vitro* peuvent être réalisés au préalable afin de mettre en évidence certaines propriétés des substances testées (ex: vasoconstriction ou vasodilatation), ces propriétés devront être confirmées *in vivo* (obligatoire même pour certaines études effectuées dans un cadre réglementaire) dans le modèle animal. L'utilisation d'animaux est donc indispensable. Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à pouvoir interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre d'animaux qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 1500 rats, 1000 souris, 1000 cobayes, 500 lapins, 300 chiens, 200 porcs.

Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en la mise en place de mesures antalgiques et en un suivi des points limite.

5078. L'ADN est souvent considéré comme le plan architectural du vivant, et le développement récent des techniques de séquençage de l'ADN a généré de nombreux espoirs, notamment en termes de compréhension des maladies. Cependant, les mécanismes d'expression des gènes restent encore très mal compris. En particulier, il est désormais reconnu que le niveau d'expression d'un gène peut être influencé par l'interaction avec des régions d'ADN très éloignées en termes de séquence. Ces interactions à longue distance entre différentes parties du génome restent à déchiffrer. Notre projet consiste à étudier des souris issues du croisement de deux sous-espèces, *Mus musculus domesticus* et *Mus musculus molossinus*. L'intérêt de ce croisement est de réunir dans un même individu une grande hétérogénéité génétique. Ce croisement permettra notamment de voir si, dans un même environnement génétique global, les gènes issus de *M. m. molossinus* sont régulés différemment des gènes issus de *M. m.*

domesticus. Nous nous focaliserons sur l'étude des gènes régulés par l'hormone thyroïdienne dans le cerveau. En effet, l'hormone thyroïdienne agit par l'intermédiaire de récepteurs qui se fixent à l'ADN, et l'étude de des mécanismes d'action de l'hormone thyroïdienne dans le cerveau est utilisée depuis plusieurs années comme modèle plus général d'étude de la régulation de l'expression des gènes. Des gènes-cibles de l'hormone thyroïdienne dans le cerveau sont donc connus, et constitueront la base du nouveau projet.

Ce travail fondamental permettra de progresser dans la compréhension des mécanismes d'expression des gènes. A terme, cette compréhension ouvrira de nouvelles pistes pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques, non seulement pour les maladies d'origine génétique mais aussi pour tous les autres types de maladies.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 192 souris au maximum. L'objectif de ce projet étant d'étudier la régulation de l'expression des gènes après croisement de deux génomes, il est nécessaire de travailler *in vivo*. Des études *in vitro* sont réalisées en parallèle pour aborder les aspects moléculaires de la signalisation par l'hormone thyroïdienne. Le nombre de souris indiqué a été calculé comme le minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables, en tenant compte d'aléas prévisibles. Selon le nombre de petits nés par portée, le nombre de souris utilisées sera plus faible que le maximum indiqué ci-dessus. Les souris seront suivies régulièrement par un personnel qualifié, afin de détecter précocement tout signe éventuel de souffrance.

5079. Les vaisseaux vascularisant la moelle épinière sont étanches à la grande majorité des drogues compte tenu de la présence de la Barrière Hémato Médullaire (BHM), véritable paroi vasculaire renforcée. Ainsi, bon nombre de traitements médicamenteux utilisés pour des pathologies de la moelle épinière (i.e. sclérose latérale amyotrophique) restent avec une faible efficacité. Or, on sait depuis peu que dans le cerveau, cette même barrière, appelée barrière hémato encéphalique (BHE), peut être temporairement perméabilisée, à moindre risque, grâce aux ultrasons.

L'expérience proposée ici a pour but de montrer pour la première fois la faisabilité d'une ouverture de barrière hémato médullaire dans la moelle épinière, chez le lapin blanc de Nouvelle-Zélande sain. L'étude portera sur un total de 15 lapins, mais elle a été conçue pour que ce nombre puisse être réduit à 10 dans la mesure du possible. Après réalisation d'une laminectomie (ouverture de la partie postérieure de la colonne vertébrale), des ultrasons seront appliqués sur la moelle épinière, soit immédiatement après le geste chirurgical et directement au contact de la dure-mère, soit à distance de l'acte chirurgical, au travers du tissu cutané cicatrisé. L'application d'ultrasons s'accompagnera de l'injection intraveineuse d'agent de contraste ultrasonore. L'ensemble des procédures seront réalisées sous anesthésie générale. Nous nous attacherons à limiter la souffrance animale par l'administration systématique d'antalgiques locaux et généraux aux différentes étapes de l'étude. Le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de l'étude a été judicieusement pensé de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux sacrifiés. En outre, un protocole « progressif », avec des analyses intermédiaires, permettra d'évaluer en cours de protocole la possibilité de réduire le nombre d'animaux dans l'étude.

A terme, les résultats de cette étude permettront d'évaluer la faisabilité, l'efficacité et l'innocuité d'une telle technique pour l'ouverture de la BHM.

5080. En Europe comme aux Etats-Unis, le cancer est actuellement la seconde cause de mortalité derrière les maladies cardiovasculaires. En France, cette pathologie provoque environ 33 % des décès chez les hommes et 23 % chez les femmes. Il est donc primordial de s'intéresser à cette maladie et de trouver de nouvelles thérapies.

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

Les facteurs de risque sont multiples (environnementaux, génétiques, hormonaux) et se traduisent par la mutation d'une ou plusieurs protéines conférant à la cellule un caractère malin.

L'objectif est donc de trouver de nouvelles thérapies ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses permettant ainsi de limiter les effets secondaires sur l'organisme.

Une des approches consiste à étudier les protéines impliquées dans la cancérogénèse et de générer des molécules et/ou des anticorps candidats médicaments spécifiques de la protéine étudiée.

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

Grâce à ces tests *in-vitro*, les molécules les plus actives vont être sélectionnées puis testées, en 2^{de} intention, dans un organisme vivant pour démontrer leur activité et leur efficacité pour empêcher la croissance tumorale. En effet, c'est dans un modèle physiologique que l'on peut mesurer les effets pharmacologiques d'une molécule.

Ce projet s'inscrit dans un programme de recherche de nouvelles thérapies ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses.

Il a pour objectif d'évaluer l'efficacité de ces thérapies en s'assurant que le candidat médicament atteint bien la cible d'intérêt (au niveau de la tumeur), sans quoi il aura peu ou pas d'effets sur la croissance tumorale, et ne sera pas une « thérapie ciblée » et donc perd de son intérêt. En effet, c'est en étudiant l'impact du composé sur la cible d'intérêt, qu'on pourra envisager ou non la poursuite de la caractérisation du composé. Si celui-ci est relevant, alors il fera l'objet d'études d'efficacité (effet sur la croissance tumorale) encadré par un autre projet.

La procédure technique consiste à administrer le produit candidat médicament à des souris porteuses de tumeurs et de s'assurer en fin d'expérimentation (ou en fin de traitement) qu'il a bien atteint la cible d'intérêt, par dosage, au niveau de la tumeur qui aura été préalablement prélevée, mais également d'évaluer sa présence dans la circulation sanguine toujours par dosage.

Les caractéristiques de croissance de ces tumeurs auront été au préalable définies à l'occasion d'un autre projet. Les doses, voies, et schéma d'administration du produit auront également été déterminés a priori dans le cadre d'un autre projet ou seront basées sur la structure chimique du composé testé, la littérature ou les connaissances internes, et permettront de rester dans ce que l'on appelle des Dose Maximales Tolérées (DMT) sans risque pour l'animal.

Ces différentes études dédiées à la sélection et à la préparation précise de notre modèle contribuent au souci constant de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Pour ce projet, nous utilisons soit des modèles de souris immunodéprimées (présentant un système immunitaire très réduit voire absent) qui vont permettre de leur greffer des tumeurs humaines ou murines sans risque de rejet, soit des souris dites immunocompétentes, et qui vont nous permettre de tester nos candidats sur des tumeurs murines dans un contexte immunitaire parfaitement fonctionnel.

Afin que les souris se trouvent dans les meilleures conditions d'hébergement, elles sont hébergées par groupe sociaux de 3 à 5, en présence de coton pour favoriser leur instinct de nidification au sein d'une animalerie adaptée et contrôlée. Ce nombre correspond également à l'effectif prévu par groupe permettant de mettre en évidence l'atteinte ou non de la cible d'intérêt par la molécule.

Les expérimentateurs veillent à :

- évaluer toute altération éventuelle de l'état général de l'animal en s'appuyant sur une observation régulière et sur une liste de points limites prédéfinie
- mettre en place les mesures nécessaires afin d'éviter toute souffrance de l'animal (mesures antalgiques appropriées).

Sur 5 ans le nombre d'animaux utilisés est estimé à environ 11700.

5081. Afin qu'un dispositif biomédical devienne sûr et efficace, un ensemble d'études expérimentales utilisant des animaux est nécessaire. Dans le cadre de dispositifs intra-utérins, la réalisation d'études de toxicité de la reproduction est notamment indispensable afin de démontrer l'innocuité du dispositif sur la reproduction et l'absence de tératogénicité. Ce projet est réalisé sur l'espèce lapin, espèce non-rongeur couramment utilisée pour les études de reprotoxicité réglementaire.

La phase de réalisation de l'étude réglementaire utilise au maximum 108 femelles accouplées qui recevront l'implant en début de gestation jusqu'en fin de gestation, cette étude étant un pré-requis réglementaire non-clinique, avec un nombre d'animaux par groupe conforme aux lignes directrices.

Les animaux sont hébergés selon les standards en vigueur adaptés aux besoins spécifiques des mères et font l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. En cas de signes cliniques, des mesures appropriées seront prises pour promouvoir le bien-être des animaux.

5082. La nutrition post-natale via le lait maternel a des effets immédiats sur la physiologie du jeune mammifère, ainsi que sur son développement et sa santé au-delà du sevrage. Ces phénomènes de programmation en début de vie sont très étudiés car leurs conséquences peuvent être durables et se manifester de multiples façons ; ils sont impliqués dans l'étiologie de nombreux troubles métaboliques (par exemple : l'obésité, le diabète) ou psychiatriques (par exemple : l'anxiété, la dépression). Nous cherchons à mieux comprendre comment la physiologie et les pathologies d'un individu trouvent en partie leur origine dans les conditions environnementales du tout début de vie. Des travaux récents montrent qu'un sevrage tardif des ratons (à l'âge de 25 jours, au lieu des 21 jours habituels) affecte la physiologie et le comportement. Chez les ratons sevrés tardivement, on retrouve notamment des altérations du microbiote intestinal et des troubles dépressifs. Le lait maternel, et surtout son contenu en caséine, ont été impliqués dans ce phénomène. Cette étude vise à approfondir nos connaissances sur le rôle de la nutrition post-natale et à mieux comprendre le rôle du microbiote intestinal, en utilisant un modèle de rats sans microbiote (stériles ou axéniques). Nous évaluerons ainsi l'effet de la caséine sur des marqueurs de réactivité émotionnelle, ainsi que sur différents indicateurs de santé et de développement. Le but est de répondre à la question : les effets de la caséine du lait sont-ils médiés par le microbiote intestinal ? Ainsi, nous comparerons des ratons nourris avec du lait enrichi ou appauvri en caséine. La même expérience sera conduite sur des animaux conventionnels (hébergeant un microbiote qui leur est caractéristique) et sur leur équivalent axénique (dépourvu de microbiote). La physiologie et le comportement émotionnel de ces 4 groupes seront étudiés. En fin d'expérience, le sang ainsi que certains organes comme le cerveau ou les glandes surrénales seront prélevés, afin de connecter les phénomènes comportementaux à des événements moléculaires survenus dans le cerveau et aux taux d'hormones plasmatiques.

L'étude des interactions nutrition-microbiote-cerveau nécessite de caractériser les interactions complexes entre différents organes (intestin et cerveau) et à l'intérieur d'organes complexes (cerveau), ceci n'est exclusivement possible que lors d'expériences sur des modèles animaux in vivo. Il n'existe ici pas d'alternative à l'expérimentation animale, car on ne peut évaluer le comportement émotionnel de modèles in vitro. Un total de 48 jeunes mâles de souche Fischer élevés à des fins expérimentales dans une unité spécialisée seront utilisés dans des procédures où leur bien-être sera au cœur de nos préoccupations, étant donné que nous mesurons des comportements émotionnels qui sont très sensibles aux effets du stress. Celui-ci sera réduit au minimum, en évaluant quotidiennement la santé et le bien-être des animaux grâce à des marqueurs classiques, tels que la pesée et l'inspection du pelage. Lors de ces pesées les ratons seront aussi manipulés pour les habituer aux expérimentateurs et enrichir leur environnement sensoriel. Ils seront répartis en groupes de 4 par cage au sevrage, pour fournir un enrichissement social. Le nombre d'animaux est réduit au maximum, mais est optimisé de façon à pouvoir évaluer l'impact de la caséine du lait avec le plus de certitude possible, avec des tests statistiques appropriés.

Ces études permettront de mieux comprendre les liens entre nutrition périnatale et santé du jeune individu, notamment comment la caséine et le microbiote intestinal peuvent contribuer à la genèse de troubles dépressifs dans un modèle animal classique, chez qui peuvent être modélisés de nombreux aspects de physiologie et pathologie humaine.

5083. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le premier cancer primitif du foie en incidence. Il est la 3ème cause de mortalité par cancer dans le monde, et représente 6500 nouveaux cas par an en France. Son traitement repose sur le dépistage des sujets à risque et sur son traitement à un stade précoce afin d'obtenir la guérison. Il survient dans 90% des cas sur un fond de maladie du foie au stade de cirrhose. Malheureusement, le traitement curatif du CHC n'est possible que dans 25% des cas en France, car souvent diagnostiqué trop tardivement. Au-delà du stade curatif, il est accessible à un traitement par thérapie ciblée par sorafénib (Nexavar) qui permet de prolonger de 3 mois la survie des malades traités. Ces dernières années, de nombreux essais thérapeutiques ont testés de nouveaux traitements mais jusqu'alors aucun n'a démontré sa supériorité.

Afin de progresser dans le traitement du CHC, de nombreuses études ont identifiées les évènements génétiques impliqués. Il a ainsi été montré que près de 50% des CHC exprimaient de manière aberrante une voie de signalisation intra-cellulaire très importante dans le cancer du foie (voie mTOR). De plus, il a été démontré que cette voie de signalisation est aussi impliquée dans les mécanismes de fibrose et de cirrhose. Cependant, les médicaments inhibant cette voie de signalisation, n'ont pas montré d'effet sur la cirrhose et le cancer à cause de mécanismes de résistance très rapide. Il est donc intéressant de tester un nouveau mode de traitement inhibant cette voie de signalisation grâce à l'utilisation de nanoparticules chargées avec des ARN interférents ciblant celle-ci.

Ce projet prévoit donc d'étudier une combinaison d'ARN interférents inhibant cette voie de signalisation. Ces ARN seront d'abord testés sur lignées cellulaires afin de remplacer autant que faire se peut les animaux et ainsi réduire le nombre d'animaux utilisés. La meilleure combinaison sera ensuite utilisée sur un modèle de rat cirrhotiques développant des CHC de manière chimio-induite. Les rats ne peuvent être remplacés par des souris car celles-ci ne sont pas capables de faire de cirrhose. Ce modèle déjà bien validé permet d'étudier le traitement à différents stades de fibrose hépatique et de carcinogenèse. Il permet ainsi d'étudier l'effet curateur mais aussi l'effet préventif du traitement sur la maladie.

Les rats seront traités selon 3 modalités : traitement par ARN interférents contrôle, traitement par ARN interférents ciblant la voie mTOR et traitement par sorafénib. Ce dernier sera administré par voie orale à la dose de 30mg/kg/j comme précédemment décrit. Les ARN interférents seront injectés par voie intraveineuse par la veine latérale de queue de manière hebdomadaire. La durée totale du traitement sera de 8 semaines. 3 groupes expérimentaux seront constitués pour étudier l'effet du traitement à la phase précoce de fibrose et de carcinogenèse, à la phase intermédiaire et à la phase avancée. Le nombre d'animaux sera réduit au maximum tout en gardant un échantillon de taille suffisante pour répondre à la question posée. L'ensemble du projet nécessite donc l'utilisation de 113 animaux. Au stade avancé de la maladie, les animaux seront étudiés par IRM avant traitement puis à 1 mois et en fin de traitement. Cette analyse permettra de mieux comprendre les mécanismes vasculaires impliqués dans la réponse et/ou la résistance aux traitements étudiés.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

En l'absence d'efficacité du traitement par ARN interférents, le groupe de rats traités par sorafénib sera étudiable en lui-même car peu de données sont actuellement disponibles dans la littérature sur les effets de cette drogue dans un modèle animal cirrhotique.

5184. Chez l'homme, les épidémies de grippe saisonnières affectent chaque année 5 à 15 % de la population. Au plan mondial, l'OMS estime que les épidémies de grippe annuelles sont responsables d'environ 250 000 à 500 000 décès par an. Malgré la disponibilité de vaccins et de traitements antiviraux spécifiques, la grippe saisonnière reste encore à l'heure actuelle un problème mondial de santé publique. De plus, le développement de formules vaccinales innovantes, capables de proposer un mode de production plus rapide et moins couteux, reste nécessaire. D'autre part, environ 460 000 nourrissons sont victimes de bronchiolite chaque hiver. Cette maladie se caractérise par une obstruction des poumons provoquée par la réaction au virus respiratoire syncytial (VRS). Le VRS touche la quasi-totalité des enfants avant leurs deux ans, dont un tiers développe une bronchiolite pouvant conduire à une hospitalisation. Malheureusement, il n'existe aucun vaccin pour protéger les nourrissons contre cette infection.

Dans ce contexte, nous proposons la mise au point de nouveaux vaccins permettant de répondre aux différentes problématiques liées à la vaccination antigrippale et à la vaccination contre le VRS. Ainsi, nous évaluerons l'efficacité de plusieurs formulations vaccinales innovantes afin d'identifier le(s) candidat(s) vaccins les plus prometteurs. De plus, nous utiliserons un mode d'administration innovant, non invasif et sûr, qui serait adapté à la vaccination des populations sensibles tel que le nourrisson.

Afin de mettre au point notre modèle expérimental puis de tester l'efficacité de notre vaccin et d'optimiser le schéma thérapeutique, ce projet durera 5 ans et comprendra 24 expérimentations sur un total de 4480 souris femelles. Le nombre d'animaux inclus dans une expérience répond à des besoins statistiques et à la nécessité d'inclure des groupes expérimentaux témoins non vaccinés.

Dans le cadre de ce projet, nous appliquerons la règle des 3R (Réduction, Raffinement et Remplacement). La stratégie pour réduire le nombre d'animaux reposera sur une expérience préliminaire permettant, d'une part, de valider le modèle expérimental et d'autre part, de définir les meilleures conditions de vaccination. Les souris seront hébergées par groupes sociaux et disposeront d'eau de boisson et de nourriture à volonté. Afin d'enrichir le milieu et de maximiser le bien-être animal, les animaux auront à leur disposition une maisonnette ainsi que du papier craft. De la musique douce sera également diffusée au sein de l'animalerie. De plus, une gestion précise de l'anesthésie/analgésie est étudiée pour chaque procédure expérimentale en vue d'optimiser le bien-être animal. Des points limites quantitatifs, spécifiques aux procédures, ont également été établis pour l'ensemble des procédures expérimentales. Concernant le principe de remplacement, il n'existe, à l'heure actuelle, aucune méthode in vitro permettant de tester l'efficacité d'un vaccin.

5085. Les récentes études d'association du génome entier ont permis d'identifier de nouvelles régions génétiques qui prédisposent au cancer du rein. La découverte de ces régions est une étape clé pour une meilleure compréhension de la maladie, aux retombées potentiellement très importantes sur le plan diagnostique et thérapeutique.

Le locus de prédisposition 12p11.23 au cancer du rein a été récemment étudié et il a été mis en évidence qu'il agissait comme une région promotrice du gène BHLHE41. Il a été également mis en évidence qu'une hyperexpression de BHLHE41 induisait une augmentation de la croissance tumorale dans un modèle de xénotransplante murin. Il est important de noter que les études *in vitro* n'avaient pas démontré cet effet (complexité de la voie métabolique).

L'objectif de ce projet est d'étudier le mécanisme d'action de BHLHE41 sur la carcinogénèse rénale dans un modèle murin.

Nous souhaitons à présent étudier par analyse transcriptomique globale (RNA-Seq) les gènes dont l'expression est modifiée par une surexpression de BHLHE41. Nous proposons de réaliser une analyse transcriptomique globale comparative sur 4 tumeurs issues de xénotransplantes (2 tumeurs contrôles et 2 tumeurs surexprimant BHLHE41). Effectivement, nous souhaitons poursuivre l'étude du modèle murin celui-ci ayant permis de démontrer un effet positif sur la croissance tumorale.

Trente souris Nude balb/c femelles de 5 semaines seront utilisées. Nous réduisons au minimum le nombre de souris pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Le nombre de souris par groupe est de 15 car les chirurgies peuvent induire des décès (taux de décès d'environ 25%). Il reste donc 11 animaux par groupe, nombre minimal pour pouvoir obtenir des résultats statistiquement significatifs. Nous utiliserons le test de Student. Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. A la livraison des animaux, une période d'acclimatation de 7 jours sera respectée. Les souris seront hébergées par lots de 5 individus dans des cages de 530 cm² de superficie au sol filtrées et enrichies. Les paramètres physiques (température, hygrométrie, cycle jour/nuit) correspondront aux normes en vigueur. L'eau de boisson et la nourriture seront à disposition *ad libitum*.

Les souris seront divisées en deux groupes : 15 auront une inoculation sous cutanée des cellules ACHN contrôles et 15 des cellules ACHN exprimant BHLHE41 de façon stable. La procédure expérimentale sera réalisée en trois fois (trois séries de 10 souris (5 cas et 5 témoins)). Les souris seront suivies deux fois par semaine afin d'observer leur état et de surveiller le développement tumoral. Pour évaluer le bien-être des souris, nous utiliserons un score selon différents points limites adaptés. Les souris seront pesées deux fois par semaine. Afin de suivre la croissance tumorale, le diamètre des tumeurs sera mesuré deux fois par semaine en utilisant un pied à coulisse électronique. Huit semaines après l'injection, les souris seront sacrifiées par un gradient progressif de CO₂. Les tumeurs seront réséquées, pesées et mesurées ; elles seront ensuite immédiatement congelées. Les dix gènes dont l'expression sera significativement modifiée seront validés par RT-PCR quantitative.

Nous pensons pouvoir identifier les gènes modifiés par une surexpression de BHLHE41 dans les tumeurs rénales. Cette identification nous permettra de mieux comprendre la fonction de BHLHE41 dans la carcinogénèse rénale et donc l'origine de la prédisposition au cancer du rein issue de cette région.

BHLHE41 est une protéine intracellulaire pour laquelle nous ne disposons pas d'inhibiteur connu. L'identification des protéines impliquées dans son action pourrait permettre de cibler cette voie métabolique et éventuellement de proposer une nouvelle ligne thérapeutique dans ce cancer qui à un stade métastatique est mortel.

5086. Le diabète est une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit. L'insuline est une hormone qui régule la concentration de sucre dans le sang. L'hyperglycémie, ou concentration sanguine élevée de sucre, est un effet fréquent du diabète non contrôlé qui conduit avec le temps à des atteintes graves de nombreux systèmes organiques et plus particulièrement des nerfs et des vaisseaux sanguins.

En 2014, 9% de la population adulte (18 ans et plus) était diabétique. En 2012, le diabète a été la cause directe de 1,5 million de décès. Plus de 80% des décès par diabète se produisent dans des pays à revenu faible ou intermédiaire. Le diabète de type 1 (précédemment connu sous le nom de diabète insulino-dépendant ou juvénile) est caractérisé par une production insuffisante d'insuline et exige une administration quotidienne de cette dernière. La cause de diabète de type 1 n'est pas connue, et en l'état des connaissances actuelles, il n'est pas évitable. Les symptômes sont les suivants: excrétion excessive d'urine (polyurie), sensation de soif (polydipsie), faim constante, perte de poids, altération de la vision et fatigue. Ces symptômes peuvent apparaître brutalement. Le diabète de type 2 (appelé diabète non insulino-dépendant ou diabète de la maturité) résulte d'une mauvaise utilisation de l'insuline par l'organisme. Le diabète de type 2 représente 90% des diabètes rencontrés dans le monde. Il est en grande partie le résultat d'une surcharge pondérale et de la sédentarité. Ses symptômes peuvent être les mêmes que ceux du diabète de type 1 mais sont souvent moins marqués. De ce fait, la maladie peut être diagnostiquée plusieurs années après son apparition, une fois les complications déjà présentes. Récemment encore, ce type de diabète n'était observé que chez l'adulte mais on le trouve désormais aussi chez l'enfant.

Durant la phase d'obésité survenant avant l'établissement du diabète de type 2, l'afflux de cellules immunitaires comme les macrophages a été décrit avec une destruction des cellules β des îlots de Langerhans. Il est important de comprendre le dialogue établi entre le système immunitaire (macrophages) et les îlots de Langerhans chez un sujet sain comparativement à des sujets atteints de diabète. Nous cherchons à mieux comprendre le dialogue entre cellules entraînant un dysfonctionnement du pancréas et donc un défaut de la régulation de la glycémie. Nous avons identifié et mis en évidence *in vitro* une cytokine agissant sur les macrophages dans le tissu pancréatique humain. Cette cytokine est de plus augmentée dans le pancréas de sujets diabétiques. Elle a été décrite comme biomarqueur sérique chez les sujets atteints de diabète et pourrait donc constituer une cible thérapeutique.

Nous souhaitons dans notre projet mettre en évidence le rôle de cette cytokine dans la physiologie du pancréas et son implication dans la physiopathologie du diabète. La compréhension de la présence et de l'augmentation de cette protéine au niveau pancréatique permettraient d'envisager de nouveaux traitements dans le diabète. Pour ce faire, notre projet est divisé en 3 étapes :

- (1) Etablissement d'une lignée de souris cytokine X déficiente au niveau du pancréas
- (2) Evaluation non invasive de la fonction pancréatique de ces souris
- (3) Evaluation de la fonction pancréatique de ces souris en conditions pathologiques de diabète.

Notre démarche expérimentale tient ainsi en compte la règle des 3R :

Remplacement : l'utilisation des animaux est indispensable avant de proposer cette protéine comme cible thérapeutique, nous devons démontrer son implication *in vivo*. En effet, seule la suppression de celle-ci dans un modèle *in vivo* nous assure de son implication dans des conditions physiopathologiques proches de la réalité clinique.

Réduction : les modèles seront réalisés sur un nombre nécessaire et suffisant d'animaux (650 souris). Ce nombre a été défini afin d'exploiter des résultats statistiquement fiables.

Raffinement : les souris seront hébergées dans des conditions adaptées à l'espèce avec un enrichissement du milieu. Le protocole expérimental comprend un suivi quotidien des animaux, des indicateurs comportementaux et physiques prédéfinis (état général, prostration, poil hérissé, suivi pondéral de l'animal) seront évalués quotidiennement, et constitueront les points limites de l'expérience. Pour éviter toute souffrance de l'animal au cours du protocole expérimental des analgésiques seront donnés. Ce projet s'inscrit ainsi dans une gestion éthique de l'expérimentation animale et est donc en accord avec les réglementations européennes et françaises de bonnes pratiques de laboratoire.

5087. L'incidence des tumeurs épithéliales malignes de l'ovaire est en France de 7,3 à 10,9 pour 100 000 femmes et elles sont responsables de plus de 3000 décès par an, soit 5,8% des décès par cancer. La survie globale est également faible, d'environ 39% à cinq ans et 20% à 10 ans. Le mauvais pronostic des tumeurs épithéliales malignes de l'ovaire est lié à leur découverte tardive. Le traitement de choix repose sur la chirurgie de cytoréduction complète mais 75% de ces cancers est diagnostiqué au stade III ou IV, empêchant la plupart du temps de réaliser une exérèse chirurgicale complète première. Dans ces cas-là, le traitement de ces patients repose sur la chimiothérapie néoadjuvante, c'est-à-dire avant tout autre traitement, avec un taux de réponse initial entre 65 et 80%. Malgré cette réponse initiale, de nombreuses récurrences sont observées en raison du développement d'une chimiorésistance. Ainsi, de nouvelles thérapies ciblées ont été développées, comme les agents anti-angiogéniques ciblant spécifiquement le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Malheureusement, les thérapies anti-angiogéniques ne peuvent seules changer le pronostic global des patientes atteintes d'un cancer ovarien avancé et des rechutes avec un échappement au traitement sont observées, d'où la nécessité de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et les autres voies de résistance au traitement.

L'influence du microenvironnement tumoral dans la prolifération et la dissémination des cellules cancéreuses semble incontournable. La place des cellules endothéliales dans ce scénario est bien plus importante que son rôle classique et initial dans la formation de nouveaux vaisseaux. En effet, les cellules endothéliales qui bordent les capillaires et vaisseaux sanguins ne sont plus considérées maintenant uniquement comme des conduits passifs qui délivrent le sang. L'endothélium établit des niches vasculaires spécifiques qui déploient un set de facteurs de croissance, connu sous le nom de facteurs angiocrines qui permettent une fonction alternative non-angiogénique des cellules endothéliales. Des profils d'expression génique ont démontré des différences dans des cellules endothéliales extraites de tumeurs, ce qui implique un dialogue entre la tumeur et son endothélium. L'échec relatif des traitements anti-angiogénique pourrait donc être dû à la complexité des interactions entre endothélium et tumeur.

Notre équipe s'est intéressée à l'étude de ces interactions afin de trouver, par la suite, des stratégies efficaces pour les bloquer et ainsi développer de nouvelles stratégies de traitements. Récemment, nous avons développé un modèle d'étude *in vitro* en trois dimensions (3D), entre les cellules endothéliales et les cellules cancéreuses ovariennes (angiosphères). L'hypothèse à valider est que l'activation des cellules endothéliales, par des facteurs déjà identifiés par nos études, peut modifier leur dialogue avec les cellules cancéreuses et influencer sur l'évolution de la maladie. En effet, l'endothélium activé sécrète des cytokines (facteur angiocrines) qui stabilisent la structure des angiosphères.

L'objectif de cette étude est donc de valider cette hypothèse et observer l'impact des cellules endothéliales sur l'évolution de la maladie et la chimiorésistance dans un modèle murin de carcinose péritonéale d'origine ovarienne.

Pendant la durée du projet, nous utiliserons 107 souris femelles Nude de 4 semaines. Ce nombre a été déterminé après évaluation statistique afin de réduire le nombre d'animaux au minimum mais permettre également d'obtenir une réponse à notre étude. Des tests *in vitro* seront effectués, notamment pour sélectionner le ratio optimal de cellules endothéliales et cancéreuses à utiliser pour les angiosphères, évaluer leur potentiel métastatique et de chimiorésistance ; mais l'utilisation des animaux restent nécessaire afin de s'assurer de l'effet des angiosphères dans un système intégré.

Le bien-être des animaux sera respecté en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésique.

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

5088. Les maladies atopiques, incluant la dermatite atopique (également appelée eczéma), l'asthme, la rhinite allergique et les allergies alimentaires, sont des maladies inflammatoires complexes, impliquant différents sites du corps, avec des caractéristiques

communes. Le terme "marche atopique" fait référence à la séquence naturelle des manifestations atopiques, qui montre que la dermatite atopique précède le développement des autres maladies atopiques, et que la sévérité de la dermatite atopique influence le cours de l'allergie respiratoire. Une meilleure compréhension des mécanismes de la marche atopique est cruciale afin de développer des stratégies de préventions efficaces et le traitement des maladies atopiques.

Nous avons développé dans notre laboratoire un modèle murin mimant les caractéristiques de la marche atopique mettant en œuvre une rupture mécanique de la barrière cutanée suivie de l'application d'un allergène (l'ovalbumine). Afin de raffiner ce protocole, nous souhaiterions tester une nouvelle technologie permettant de générer des micropores dans l'épiderme. Cette technologie est quasi indolore et est utilisée dans la sphère médicale. La génération des micropores sera suivie de l'application de l'ovalbumine afin de générer une dermatite atopique et de provoquer une sensibilisation de l'animal à l'ovalbumine. Trois semaines après la sensibilisation, nous allons effectuer des instillations intra-nasales d'ovalbumine, pour générer une réponse allergique au niveau des poumons des animaux, similaire à un phénomène asthmatique.

Une analyse de différents paramètres de la réaction immunitaire sera effectuée après la sensibilisation des animaux. Un autre groupe d'animaux sera analysé après la génération de l'asthme expérimental: les mesures seront alors effectuées au niveau des poumons. Ce protocole expérimental d'induction d'un phénomène de marche atopique sera appliqué à 5 lignées de souris génétiquement modifiées afin de caractériser les rôles de différentes molécules et cellules de la réponse immunitaires. Nous espérons identifier ainsi des cibles thérapeutiques potentielles qui permettraient de prévenir le phénomène de marche atopique.

Remplacement: Les phénomènes à l'œuvre dans la marche atopique mettent en jeu différents organes et des réseaux impliquant plusieurs types cellulaires. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences in vivo pour comprendre ce phénomène et identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques.

Réduction: Ce protocole sera appliqué à un total de 5 lignées de souris génétiquement modifiées afin d'identifier les rôles de différentes molécules et cellules de la réponse immunitaires pour un nombre maximal de 513 animaux. Cet effectif nous permettra d'avoir des résultats statistiquement interprétables pour les différentes phases de la réponse allergique étudiées et pour les différents paramètres mesurés.

Raffinement: La rupture de la barrière épidermique par génération de micropores est quasiment indolore et ce qui constitue donc un raffinement important en comparaison de la méthode traditionnelle nécessitant des applications successives de ruban adhésif. L'application topique de l'ovalbumine nécessite simplement une anesthésie gazeuse légère. L'instillation intra-nasale de l'allergène s'effectue sous anesthésie générale légère, ce qui nécessite une injection intra-péritonéale de la solution d'anesthésie. Après l'instillation, les animaux dorment durant une quinzaine de minutes, allongés sur le dos sur un plan incliné, et sont surveillés jusqu'au réveil. La surveillance des animaux aura lieu tous les jours durant la phase de challenge. La surveillance sera dans un premier temps visuelle, avec un suivi de l'aspect général de l'animal, sa posture et son comportement. Si l'animal présente un dos voûté, un pelage hérissé ou est inactif après stimulation, il sera retiré de l'étude et pourra bénéficier de soins après l'avis du vétérinaire. Si le cas est plus grave (blessure importante par exemple), l'animal sera euthanasié immédiatement.

5089. Le projet de l'équipe est de comprendre les mécanismes physiopathologiques des déficiences intellectuelles associées à des changements du nombre de copie (par exemple : trisomie 21 ou syndrome de Down) ou autres syndromes (ex : Ring14) ainsi que des mutations sur des gènes associés à des déficiences intellectuelles. Ces maladies rares induisent des pertes d'autonomie importantes avec des conséquences pour les familles et la société.

Nous nous intéressons plus particulièrement aux syndromes de microdélétion (syndrome de Koolen De Vries) et de microduplication de la région 17q21.31 qui comprend 6 gènes dont MAPT, KANSL1 et CRHR1. Le syndrome de Koolen De Vries se caractérise par une déficience intellectuelle, un comportement amical et des malformations congénitales. Le syndrome de microduplication de 17q21.31 est associé à un retard psychomoteur et une faible interaction sociale. De plus cette région du chromosome 17 a été associée à deux types de démence : la forme tardive de la maladie d'Alzheimer et la dégénérescence lobaire fronto-temporale.

Nous avons généré des modèles murins porteurs de la délétion ou de la duplication pour la région homologue à la région 17q21.31 et révélé d'intéressants phénotypes au niveau de la coordination motrice, de la mémoire à court terme, de l'apprentissage et de la sociabilité, proches des déficiences observées chez l'Homme. Nous avons également étudié la contribution des gènes MAPT et KANSL1 à ces déficiences et montré que le gène KANSL1 pouvait en être le principal responsable.

Notre étude nécessite 330 animaux pour répondre à trois objectifs :

- 1) Définir la fonction de KANSL1 dans les neurones excitateurs en inactivant une copie de KANSL1 dans les neurones glutamatergiques.
- 2) Définir la contribution du gène CRHR1 au phénotype engendré par la délétion et la duplication de la région 17q21.31.
- 3) Etudier le phénotype de souris porteuses de délétion et/ou duplication de la région homologue à 17q21.31 au cours du vieillissement dans le but d'étudier le lien entre ces syndromes de délétion/duplication et les démences (maladie d'Alzheimer tardive et dégénérescence lobaire fronto-temporal).

Ainsi cette étude permettra d'une part de mieux comprendre la physiopathologie des syndromes de délétion/duplication 17q21.31 et d'identifier des gènes candidats (objectifs 1 et 2) et d'autre part d'anticiper les risques de démences chez les patients porteurs de modifications de la région 17q21.31 (objectif 3).

Pour cette étude, la règle des 3R est respectée :

- Remplacement : nous ne pouvons pas remplacer le modèle animal par un autre modèle car nous avons comme objectif d'évaluer les capacités cognitives et le comportement des souris porteuses de modifications génétiques, ce qui nécessite d'utiliser comme modèle d'étude un organisme entier.

- Réduction : le nombre d'animaux utilisé est le nombre minimal permettant d'obtenir de bonnes interprétations statistiques des résultats. Nous utiliserons comme approche statistique un test ANOVA avec test de Tukey en post hoc. Un minimum de 10 animaux par groupe de même génotype et même sexe est nécessaire et 15 est optimal pour pouvoir avoir une analyse statistique valable. Les études comportementales seront effectuées sur les mâles et les femelles sur 2-3 cohortes pour éviter les effets de lots. Nous utiliserons donc au maximum 330 souris, réparties en 5 génotypes pour un premier objectif, 2 génotypes pour un deuxième objectif et 4 génotypes pour un 3ème objectif.

- Raffinement : les tests utilisés sont choisis en fonction des phénotypes décrits dans la pathologie humaine associée au modèle et de sorte à être le moins invasifs possibles afin de respecter le bien-être animal.

En effet, chaque modèle de souris passe dans une série des tests comportementaux dont le "champ ouvert" qui est un test d'exploration d'arène, la "reconnaissance du nouvel objet" qui est un test d'exploration d'objet, "l'activité circadienne" qui est un test visant à observer le comportement de l'animal durant un cycle jour/nuit complet, "l'interaction sociale" qui vise à explorer le comportement sociale de l'animal, la "piscine de Morris" qui est un test utilisé pour l'étude de l'apprentissage spatial et de la mémoire, et le test de "peur conditionnée" visant à évaluer la mémoire émotionnelle associée à un contexte environnemental. Ces tests sont non-invasifs et engendrent un stress modéré (activité circadienne, conditionnement à la peur), léger (piscine de Morris) voire aucun stress (champ ouvert, reconnaissance du nouvel objet, interaction sociale). De plus, les souris bénéficieront d'un suivi quotidien et si un animal présente des signes de douleurs ou de mal-être, il sera écarté des tests et sera traité de manière à soulager, guérir son état.

5090. Le syndrome de Gordon est une hypertension (augmentation de la pression artérielle) modérée familiale. Des mutations génétiques ont été identifiées chez les sujets atteints. Ces mutations provoquent l'absorption importante de sodium au niveau du rein provoquant une acidose métabolique (déséquilibre du pH sanguin). La compréhension du mécanisme est essentielle pour envisager de nouvelles thérapeutiques pour ces patients.

Ces mutations impliquées dans cette pathologie ont été reproduites sur des modèles cellulaires rénales et sur un modèle d'œufs de grenouille (Xénope) démontrant leur importance au niveau du mécanisme.

La compréhension fine du mécanisme physiologique du syndrome de Gordon nécessite d'avoir recours à un organisme complet de type mammifère. Le modèle rongeur et en particulier la souris répond parfaitement à cette attente.

La pression artérielle de la lignée murine concernée par ce projet a été mesurée de façon non invasive à l'aide d'un brassard placé sur la queue des souris mais les différences de pression artérielle et de fréquence cardiaque étant faibles entre les animaux mutés et sauvages cette mesure reste imprécise et devrait être reproduite sur un grand nombre d'animaux (50 à 100) pour un résultat significatif.

Nous souhaiterions donc utiliser la télémétrie beaucoup plus précise et utilisant peu d'animaux (14 dont 7 de génotype sauvage et 7 de génotype muté).

Le projet sera réalisé sur des animaux adultes (4-5 mois) de même sexe pour que les résultats soient comparables. Les mesures télémétriques seront réalisées pendant une semaine puis les animaux seront traités par un diurétique pour étudier les variations de la pression artérielle.

Pour répondre à la réglementation européenne nous pourrions par ce projet réduire le nombre d'animaux produits, le nombre d'animaux utilisés a été déterminé afin d'obtenir des résultats significatifs exploitables.

Le remplacement a déjà été réalisé par l'utilisation des modèles cellulaires mais l'utilisation d'organisme vivant pour la physiologie et les traitements thérapeutiques est devenue indispensable.

Le raffinement sera respecté par une période d'adaptation à l'hébergement en zone de mesure télémétrique, l'utilisation d'analgésique post-opératoire et une période d'une semaine de repos avant les mesures et la mise sous diurétique. Les points limites seraient une souffrance post opératoire éventuelle pour laquelle la dose d'antalgique sera augmentée. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie.

5091. La manipulation d'actinides, émetteurs alpha tels que le plutonium ou l'américium, par les travailleurs de l'industrie électronucléaire engendre un risque de contamination. Des contaminations internes suite à des blessures ont été signalées depuis la généralisation de l'utilisation de ces composés dans le monde. Les actinides ne traversent pas ou faiblement la première barrière de la cornée stratifiée d'une peau saine. Toutefois, une perte d'intégrité de cette barrière par blessure mécanique, chimique ou thermique, permet l'entrée de ces composés. Le type et la localisation de la blessure ainsi que les propriétés physico-chimiques du contaminant conditionnent leur comportement dans l'organisme.

Le DTPA (acide diéthylène triamine penta acétique) est le seul traitement des actinides recommandé et disposant de l'autorisation de mise sur le marché à ce jour. L'efficacité de decorporation par le DTPA dans le cas des actinides dépend du protocole du traitement et repose sur 2 points essentiels: le délai entre la contamination par blessure et le traitement d'une part et le type d'administration du traitement (local ou systémique) d'autre part. En concertation avec les médecins impliqués dans le traitement des travailleurs contaminés par des actinides, nous allons tester chez les rongeurs différents protocoles de traitement avec le DTPA après contamination d'une plaie par plusieurs actinides seuls ou en combinaison. Nous allons expérimenter, soit une intervention médicale très rapide, soit plus longue dans le cas d'une plaie contaminée. Ces approches ont également un intérêt dans le cas des actes de malveillance.

Le présent projet permettra une amélioration de la prise en charge des personnes après contamination par blessure par des actinides. Ce projet ne peut pas être réalisé à l'aide des modèles cellulaires car les actinides sont retenus par différents organes

cibles (os, foie) selon la nature du contaminant. Ce projet fait appel à 520 rongeurs, l'espèce pour laquelle le laboratoire possède déjà de nombreuses données permettant ainsi d'effectuer des comparaisons. Ce nombre a été réduit au minimum nécessaire. Il a été déterminé en fonction des différents protocoles de traitement à tester pour les différents contaminants. Le nombre d'animaux par groupe (6) a été obtenu d'après l'analyse des données du laboratoire afin d'avoir une puissance statistique acceptable.

Tous les animaux proviennent d'élevages reconnus et sont nés et élevés en captivité. L'incision et la contamination du muscle de la patte arrière pourraient engendrer des souffrances ; un traitement antalgique (anti-inflammatoire non stéroïdien) est administré systématiquement pendant les trois premiers jours. Les animaux sont suivis quotidiennement et des protocoles d'anesthésie et d'euthanasie ont été définis et validés par l'équipe vétérinaire. Les animaux bénéficient des enrichissements dans leur cage, de support nutritionnel et de l'application des critères d'arrêt tout le long de la procédure expérimentale afin de veiller à leur bien-être.

5092. L'hypertension pulmonaire est une maladie progressive grave qui touche les petits vaisseaux sanguins des poumons et dont le symptôme principal est l'essoufflement à l'effort. Ces vaisseaux transportent le sang à partir du cœur vers les poumons, où il se charge en oxygène (O₂) pour alimenter tout l'organisme. Il est estimé de 15 à 25 cas pour un million d'habitants et le pic de fréquence se situe entre 30 et 40 ans. L'évolution naturelle de cette maladie varie fortement d'un individu à l'autre, mais elle conduit à une insuffisance cardiaque droite responsable du décès du patient seulement quelques années après la déclaration de la maladie. De nombreux médicaments permettent de réduire les symptômes de l'hypertension pulmonaire, cependant aucuns permettent à ce jour un traitement complet de la maladie. Lorsque l'hypertension pulmonaire menace la vie du patient, ces patients peuvent subir une greffe cœur-poumon. Ainsi, la découverte de nouveaux médicaments apparaît primordiale afin de lutter ou diminuer le développement de cette maladie. Avant de tester ces molécules thérapeutiques chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire, il est crucial d'appréhender au préalable la posologie et l'efficacité de ces molécules sur un modèle animal. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont sacrifiés en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés ainsi que des études sur cellules isolées seront effectuées en parallèle afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress. Le nombre total de rats utilisés sera de 150 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal. Le but de ce projet étant de tester des candidats-médicaments ciblant des protéines préalablement identifiées afin de limiter l'hypertension pulmonaire.

5093. Ce projet consiste à utiliser les ovocytes de xénope (*Xenopus laevis*) synchronisés à des stades de la division méiotique ou mitotique que nous choisissons afin d'étudier les mécanismes impliqués dans la division des cellules. Ces ovocytes sont pondus par la femelle xénope et les ovocytes sont récupérés pour réaliser des extraits cellulaires à partir desquels les expériences sont effectuées. Ces ovocytes sont utilisés depuis de nombreuses années car ils nous permettent de mettre en place des expériences sur des extraits d'ovocytes qui ont conservés les propriétés physiologiques de l'ovocyte intact. Cela concerne les questions que les chercheurs se posent sur les mécanismes impliqués dans la division cellulaire. Lors d'une ponte nous récupérons environ 2000 à 3000 ovocytes qui nous permettent d'obtenir deux à trois millilitres d'extraits. Cette quantité d'extrait est aliquotée et conservée à -80°C. Tous ces aliquots sont semblables, synchronisés et nous permettent de réaliser de nombreuses expériences comparables les unes aux autres grâce aux propriétés énoncées de ces extraits. Le nombre d'animaux que nous souhaitons acheter au cours de ces 60 prochains mois est de 120. En effet, ces 120 femelles xénope nous permettront de réaliser la totalité de nos expériences. Après la ponte ces animaux sont mis au repos pendant 6 mois ou plus en fonction des besoins avant de les remettre en situation de ponte. Cette ponte est provoquée par l'injection au jour J d'une solution d'HCG (Human Chorionic Gonadotropin) (0,5ml). Au jour J+1 les œufs pondus sont collectés et les femelles sont mises au repos pendant 6 mois. Concernant la règle des 3R. Nous nous sommes placés en construisant cette nouvelle animalerie dans les meilleures conditions possibles pour que les animaux soient le moins stressés avec un appareillage neuf et spécifique de chez un fournisseur agréé, dans de très bonnes conditions de stockage, 2 pièces climatisées, isolées pour éviter que l'expérimentation interfère avec les longues phases de repos, des animaliers formés et dédiés à l'animalerie aquatique, qui peuvent soigner lorsque cela est nécessaire. Un service d'astreinte journalier fonctionnel et un raffinement spécifique pour les xénopes: les tuyaux PVC de 50mm ainsi qu'un complément alimentaire contenant des vers.

5094. Le but de notre équipe est de créer et/ou de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines (myopathies) et de tester l'éventuelle amélioration du phénotype grâce à différentes approches thérapeutiques. Notre travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles. Pour comprendre comment les mutations génétiques sont responsables de ces pathologies, nous avons dans un premier temps utilisé des modèles cellulaires. Nous planifions maintenant d'utiliser des souris pour comprendre à la fois la physiologie et la pathophysiologie in vivo. Dans le but de mieux comprendre les fonctions des protéines impliquées dans ces pathologies et leurs interactions, nous prévoyons d'utiliser 4 modèles murins pour les myopathies congénitales. L'utilisation de souris est indispensable pour comprendre la physiopathologie in vivo.

Ainsi, les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines chez les souris, et de mieux comprendre leur développement. Les souris seront analysées in vivo / in situ / in vitro et les tissus seront prélevés pour des

expériences in vitro ultérieures (REPLACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum une /jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 15 souris / groupe seront utilisées pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité scientifique de l'étude. Afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, les souris seront surveillées quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront retirés de l'étude, prématurément si nécessaire) (RAFFINEMENT).

Un maximum de 2880 souris sera utilisé (720 souris / lignée, 4 lignées).

5095. La progression du Lymphome à Cellules du Manteau (LCM) est associée à une dissémination précoce résultant en une croissance tumorale au sein de plusieurs microenvironnements. L'implication de ces derniers dans la physiopathologie du LCM est peu documentée mais nos données préliminaires montrent un rôle déterminant du microenvironnement immunitaire dans la survie et la prolifération des cellules primaires de LCM ex-vivo. A présent, afin d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires dans un système dynamique plus complexe, intégrant la mobilité des cellules tumorales ainsi que différentes localisations physiologiques in vivo, nous proposons l'utilisation du modèle murin NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG). Nous allons ainsi déterminer l'implication des cellules immunitaires autologues ou encore l'impact d'une humanisation préalable (NSG-CD34+), ce qui permettra d'identifier les interactions supportant la croissance tumorale et de développer de nouvelles thérapies intégrant le rôle central de l'environnement tumoral. Le nombre de souris nécessaires pour réaliser ce projet est estimé à 90 avec une marge d'erreur de +10% (Tableau I) soit 99 souris. Afin de répondre à la règle des 3 R, les souris sont suivies quotidiennement selon une grille de score permettant d'évaluer le degré de douleur et d'y remédier avec un traitement analgésique approprié. Par ailleurs les souris sont groupées de 3 à 5 par cage avec des petits morceaux de papiers leur permettant de faire un nid.

5096. La consommation mondiale en produits animaux est en augmentation. Un des challenges actuels est de pouvoir répondre à cette demande sans provoquer une compétition entre les ressources alimentaires destinées à l'homme et aux animaux. C'est dans cet objectif que des recherches sur l'utilisation de nouveaux aliments en élevage sont développées. L'évaluation de l'effet de ces nouveaux aliments sur les animaux et sur la qualité des produits issus de ces animaux est primordiale.

La transmission horizontale d'informations génétiques entre espèces est un point de plus en plus abordé suite, notamment, à la découverte des petits ARN non codants, et plus particulièrement celle des microARN. Ces derniers ont la capacité de réguler l'expression des gènes. Récemment, des études ont montré la présence dans les tissus d'animaux de microARN exogènes provenant de l'alimentation (appelés xénomiR), cependant ces travaux sont source d'une très forte controverse. Si la présence de xénomiR est confirmée, ceux-ci pourraient intervenir sur la régulation de gènes endogènes. Dans le cas des « nouveaux » aliments, les animaux d'élevage risquent d'être en contact avec de nouveaux xénomiR pour lesquels on ne connaît pas les effets sur l'expression de gènes. En nous appuyant sur nos connaissances et nos compétences dans le domaine des microARN, nous proposons de répondre à la question de la présence ou non de xénomiR dans les tissus animaux et produits dérivés. Notre étude s'intéressera à l'apport d'aliment contenant de la farine d'insecte, cette matière première étant au cœur des questions sur la transition alimentaire. Ainsi, nous utiliserons ce type d'aliment pour nourrir des souris et nous rechercherons les xénomiR dans les tissus (glande mammaire, muscle, foie, sang...), mais aussi dans le lait produit par ces souris. Ce projet nécessite l'utilisation de 60 souris femelles et de 20 mâles. 30 femelles recevront un régime enrichi en farine d'insectes et 30 recevront un régime contrôle pendant 9 semaines. Les mâles utilisés pour l'accouplement, seront utilisés plusieurs fois afin de réduire le nombre d'animaux et ensuite ils retourneront dans l'élevage. Les prélèvements seront faits sur les animaux après euthanasie sauf pour le prélèvement de lait qui sera effectué sur des souris anesthésiées et analgésiées afin de prendre en compte le bien-être animal. Le nombre d'individus a été réduit au maximum tout en permettant de générer un nombre de données suffisantes pour effectuer des analyses statistiques fiables. Dans un souci de raffinement les souris seront hébergées à plusieurs par cage afin d'éviter le stress dû à l'isolement. De plus afin d'enrichir leur milieu de vie des morceaux de sopalin seront ajoutés dans leurs cages. Comme nous étudions l'effet d'un aliment sur l'organisme entier, nous sommes obligés d'utiliser l'expérimentation animale.

5097. Afin d'améliorer la durabilité de la production aquacole d'espèces carnivores comme les salmonidés, il est essentiel de réduire la part de farine de poisson, issue des pêches minotières, dans les aliments aquacoles. L'augmentation de la part de sucres digestibles dans l'aliment semble être une bonne option tant d'un point de vue économique qu'environnemental. Toutefois, la truite est considérée comme un carnivore strict, utilisant comme principale source d'énergie les protéines alimentaires et faiblement adaptée à l'utilisation des sucres. Ce type de substitution fait l'objet de nombreuses études chez des animaux en croissance, la nutrition des géniteurs ayant été mise de côté depuis près de 30 ans. En effet, la reproduction des salmonidés répondant aux attentes des éleveurs en termes de quantité et de qualité, les formules des aliments dédiés à ces animaux n'ont jamais fait l'objet de modifications. Ces aliments ne sont pas/plus forcément adaptés aux besoins précis de ces reproducteurs ni aux enjeux sociétaux et environnementaux actuels. En effet, ces poissons, de par leur poids important requis par leur fonction de reproducteurs, consomment les aliments aquacoles en quantité non négligeable. De plus, remplacer une partie de la farine de poisson par des glucides permettrait de diminuer le coût de l'aliment (matière peu onéreuse à produire en grande quantité), permettrait de diminuer les rejets azotés en épargnant les protéines à des fins de croissance.

Les quelques études menées dans les années 90 sur la physiologie des reproducteurs semblent cependant montrer que la production des ovules et des spermatozoïdes requière une forte mobilisation en sucres au niveau des ovaires et des testicules des

salmonidés. En l'absence d'apport en sucre par l'alimentation, ceux-ci sont produits par l'animal à partir des protéines notamment qui demande une forte mobilisation énergétique. Ces mêmes études montrent qu'en période de reproduction l'augmentation de la part de sucres dans l'alimentation des salmonidés semblent être mieux acceptée par l'animal sur de longues périodes et qui les utilise pour sa production d'ovules. Afin de réviser les recommandations nutritionnelles actuelles pour les géniteurs de truites arc-en-ciel afin qu'elles répondent mieux aux besoins physiologiques des animaux et aux enjeux environnementaux actuels, nous nous proposons dans ce projet de nourrir des reproducteurs (mâles et femelles) avec un aliment riche en sucres (25%) ou sans sucres et de suivre leur utilisation au cours du cycle reproducteur et les conséquences sur les performances de reproduction et la robustesse des alevins issus de ces reproducteurs. L'analyse des voies métaboliques liées à l'utilisation des sucres et des paramètres zootechniques (taille, poids, composition de divers organes et de la carcasse...) seront menées à 5 étapes clés du cycle de reproduction correspondant au développement des ovocytes et des spermatozoïdes. A chaque étape, 6 femelles et 6 mâles seront prélevés par régime (régime riche en sucres et régime contrôle sans sucres) soit 120 animaux. Le dernier prélèvement s'effectuera en période de reproduction et les ovules et spermatozoïdes seront analysés pour partie (en terme de qualité et de quantité) et une partie servira (la moitié environ) pour la fécondation afin d'évaluer les performances de reproduction (mortalité/malformations des alevins) en croisant les parents ayant reçu les différents régimes. Les alevins seront étudiés avant le premier repas en termes de malformations et de mortalités. Remplacement: les effets physiologiques escomptés (modification du métabolisme des sucres et meilleure utilisation des glucides alimentaires, qualité des pontes) ne peuvent être observés qu'in situ. Raffinement : aucun prélèvement ne se fera sur animaux vivants Réduction : le nombre de poissons prélevés (mise à mort par bain anesthésiant de benzocaïne puis bain euthanasiant) est calculé ad minima compte tenu de la variabilité individuelle observée dans des analyses antérieures. De plus, l'ensemble de l'animal, y compris la carcasse entière, sera analysé.

5098. Les maladies virales transmises par des moustiques figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité pour l'homme et les animaux. Leurs conséquences en santé publique humaine ainsi que leur impact économique sur la production animale sont considérables.

Notre laboratoire étudie les mécanismes contrôlant le développement des virus dans le corps des moustiques après ingestion d'un repas de sang infecté et la capacité des moustiques à transmettre le virus lors d'une piqûre.

Pour permettre le cycle de reproduction des moustiques et leur infection, nous avons mis au point un système de repas sanguin artificiel préparé à partir d'une suspension de globules rouges de lapin et d'une suspension de virus issue de cultures cellulaires, le tout placé dans un réservoir à 37 °C fermé par une membrane biologique à travers laquelle peuvent piquer les moustiques femelles. Ce dispositif est un progrès en termes de remplacement et de raffinement puisqu'il permet de remplacer le repas sanguin naturel par piqûre d'un animal infecté par des moustiques.

Nous utiliserons des lapins comme donneurs de sang en raison de leur taille qui autorise des volumes de prélèvements sanguins adaptés à nos besoins. Pour ce projet, 15 lapins seront utilisés sur 5 ans. Chaque lapin ne sera prélevé qu'une fois par semaine. Le nombre d'animaux nécessaires a été décidé en fonction de nos besoins réguliers en globules rouges (projets sur plusieurs virus et sur différentes espèces de moustiques d'origines variées), tout en limitant le nombre de prélèvements par animal. Le prélèvement de sang qui constitue l'unique procédure sur l'animal, est très bien toléré par les lapins qu'il n'est pas nécessaire d'anesthésier. Cette procédure est donc de classe de sévérité légère. Bien que le rythme des prélèvements ne doive pas induire d'anémie, le poids des animaux sera enregistré chaque semaine pour détecter une éventuelle anémie qui entraînera l'arrêt des prélèvements.

Ce système artificiel nous permet de mimer in vitro les systèmes naturels, tout en maîtrisant les différents paramètres de l'infection (concentration virale du mélange, température, temps de contact).

5099. La sclérodémie est une pathologie rare caractérisée par des problèmes pulmonaires souvent mortels et des troubles de la circulation sanguine, notamment au niveau des doigts, susceptibles d'entraîner des lésions appelées ulcères. La cicatrisation des ulcères chez les patients atteints de sclérodémie est un véritable enjeu médical car il existe un risque important d'amputation d'un ou plusieurs doigts.

Le GRAPHENE est un matériau constitué d'atome de carbone. Particulièrement apprécié pour ses propriétés de légèreté, de flexibilité, de résistance, de transparence et de conduction du courant. Le GRAPHENE est de plus en plus utilisé dans le domaine de la santé et de l'innovation médicale. Récemment, des travaux scientifiques ont montré que le GRAPHENE pouvait être utilisé dans la réparation des tissus lésés, comme la peau, en favorisant le déplacement et le rapprochement des cellules impliquées dans le phénomène de cicatrisation.

Par ailleurs, nous savons depuis longtemps que l'électricité présente aussi des propriétés qui favorisent la cicatrisation. En appliquant un courant à la surface d'une plaie sur la peau il est en effet possible d'accélérer la guérison de celle-ci. Dans certains cas le courant peut aussi être utilisé pour transporter dans la peau des médicaments qui agissent en rétablissant la circulation sanguine et favorisent ainsi la cicatrisation. Cette technique, appelée iontophorèse thérapeutique, est une méthode innovante et prometteuse dans le domaine de la cicatrisation.

Le but de ce projet est d'explorer: 1) l'effet du GRAPHENE seul; 2) l'effet du GRAPHENE utilisé comme conducteur de courant; et 3) l'effet du GRAPHENE comme conducteur de courant pour transporter un médicament, sur la cicatrisation de plaies réalisées sur un modèle animal de sclérodémie.

Ce projet est une étude de tolérance, de preuve de concept et de mise au point d'un pansement permettant l'accélération de la cicatrisation.

Notre étude sera composée de 4 phases :

- Première phase : évaluation du GRAPHENE seul sur souris saines

- Seconde phase : évaluation du GRAPHENE et du courant sur souris saines
 - Troisième phase : évaluation de l'efficacité d'une électrode de GRAPHENE lors de séances d'iontophorèse sur souris saines
 - Quatrième phase : réalisation des 3 phases précédentes sur 2 modèles animaux à retard de cicatrisation : uPAR et BKS.
- Nous avons choisi de travailler sur un modèle de souris car pour ce type d'étude il nous est impossible de remplacer l'animal par un modèle non vivant (cellules cultivées, peau de synthèse, simulation informatique).
- Dans ce projet nous utiliserons environ 640 animaux. Cet effectif a été calculé en fonction de la puissance des tests statistiques prévus et des résultats intermédiaires attendus mais également en tenant compte du risque de perte d'animaux. Le suivi régulier des animaux sera réalisé pour s'assurer de leur bien-être, et l'utilisation d'analgésique sera prévue pour soulager la souffrance.

5100. La pneumonie aigüe communautaire (PAC) est une infection respiratoire acquise en dehors du milieu hospitalier. La PAC est la première cause de mortalité infectieuse dans les pays occidentaux et représente 450 millions de cas/an dans le monde, avec près de 4 millions de décès. Les bactéries *Streptococcus pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que sur le virus de la grippe sont parmi les pathogènes les plus retrouvés dans ces infections.

De nouvelles stratégies thérapeutiques sont donc essentielles pour améliorer le pronostic vital des personnes infectées. De nouvelles molécules utilisées seules ou en association avec certains antibiotiques ont montré des résultats très prometteurs in vitro vis-à-vis (1) de *Streptococcus pneumoniae*, (2) de *Pseudomonas aeruginosa* et (3) du virus grippal. Nous devons à présent démontrer l'efficacité de ces différentes thérapies in vivo vis-à-vis de ces trois pathogènes. Au total 4032 souris seront nécessaires pour tester nos différents traitements (projet sur 5 ans avec 7 expérimentateurs titulaires et 4 expérimentateurs contractuels financés pour le projet).

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

- Remplacement : Jusqu'à présent, aucun système in vitro ne permet de reproduire les caractéristiques d'infections respiratoires et le modèle murin constitue un modèle expérimental pertinent.
 - Réduction : Le nombre d'animaux est optimisé en réalisant un maximum d'analyses sur chaque animal (cellules immunitaires, cytokines, expression des gènes, histologie, évaluation de la charge du pathogène, ...).
 - Raffinement : Les animaux seront élevés en communauté dans des cages enrichies avec du sopalin et fragments de boîtes d'œufs.
- Tout au long du déroulement des expériences, une observation systématique de leur état clinique sera réalisée de façon pluriquotidienne par les animaliers et les expérimentateurs afin de détecter au plus tôt une éventuelle souffrance animale, permettant de mettre en place des mesures antalgiques appropriées.