



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

Résumés non techniques des projets autorisés (59)

5901. 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 pour la recherche (immunologie, immunohistochimie, biomédicale), en médecine, pour la réalisation de test de diagnostic... Ce projet respecte la réglementation relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques en vigueur.

La production d'anticorps polyclonaux consiste à produire des anticorps par injection à un animal d'un antigène cible, couplé 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. En fin d'étude, les animaux seront euthanasiés afin de récupérer la quasi-totalité du volume sanguin circulant et de respecter le principe de précaution.

La production d'anticorps polyclonaux nécessite l'utilisation d'animaux puisqu'il n'existe aucune méthode substitutive pour cette production. Environ dix peptides innovants par an sont à administrer aux lapins et aux poules dans le but de produire des anticorps indispensables à l'avancement de la recherche et de la médecine et le développement de test de diagnostic. Le nombre d'animaux est choisi en fonction des volumes de sang que l'on peut prélever et des connaissances sur l'antigène à administrer. Afin d'obtenir une quantité d'anticorps satisfaisante et de favoriser la réussite du projet sans porter atteinte au bien-être de l'animal, deux animaux seront immunisés par étude. Ainsi, deux lapins et deux poules seront immunisés par étude et 10 études par an pourront être réalisées d'où l'utilisation de 100 lapins et de 100 poules 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. Tout au long de leur hébergement, les animaux disposeront de conditions d'hébergement adaptées et optimales (logement, environnement, alimentation, apport en eau, soins). Afin de les maintenir, ces paramètres d'ambiance seront vérifiés quotidiennement. D'autre part, les animaux seront hébergés collectivement 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.

5902. Les troubles du spectre autistique constituent un groupe hétérogène de troubles neurodéveloppementaux ayant pour caractéristiques des altérations de la communication sociale. De récentes recherches émettent l'hypothèse d'une implication du système de récompense dans ces troubles. Ce système cérébral, dont le rôle est de motiver à réaliser des actions en vue d'obtenir une récompense tel que les récompenses naturelles, comme la nourriture, mais aussi les interactions sociales. Un dysfonctionnement du système de récompenses, et donc de la motivation à interagir socialement, pourrait ainsi être à la base de l'altération du comportement social typique. Quels sont les mécanismes sous-jacents à certains dysfonctionnements du système de récompenses sociaux ?

Le gène FOXP2 (Forkhead box P2) a été le premier gène impliqué spécifiquement dans une pathologie du langage. Des patients porteurs d'une mutation dans le gène FOXP2 ont des problèmes d'articulation (dyspraxie). Le rôle de FOXP2 dans le développement et la fonction du cerveau reste mal connu. La séquence et le profil d'expression de ces gènes sont très conservés chez les mammifères. Différentes lignées de souris transgéniques déjà existantes permettent d'étudier la fonction de FOXP2 chez l'animal, soit en reproduisant les mutations observées chez les patients, soit en inactivant le gène FOXP2.

Ce projet vise à comprendre les rôles de Foxp2 dans la fonction du système de récompense, chez la souris, grâce à des analyses anatomiques et de comportement. Ces travaux permettront d'apporter un éclairage nouveau sur les mécanismes associés aux mutations de FOXP2 chez l'humain. Cette connaissance pourrait aider à détecter les premiers problèmes dans le développement de la communication sociale en utilisant l'imagerie cérébrale et d'identifier les patients qui pourraient bénéficier de thérapies comportementales précoces basées sur l'apprentissage par renforcement.

L'objectif est de caractériser le système de récompense dépendant de FOXP2 en utilisant des tests comportementaux dans les animaux transgéniques. Pour une analyse robuste du système de récompense, nous allons utiliser la substance psychoactive cocaïne. Cette substance addictive s'empare des circuits et les mécanismes neuronaux qui ont évolué pour les récompenses naturelles. Nous utiliserons pour cela des protocoles classiques déjà établis depuis plusieurs années.

Nous utiliserons sur 2 ans un total de 96 souris. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ; 3) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes ; le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude.

5903. Le cancer figure parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde, avec une incidence qui n'a cessé de croître depuis 1980. En 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a recensé 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés à la maladie. En cancérologie, les traitements sont actuellement dominés par la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Depuis quelques années, des recherches sont entreprises afin de développer des approches thérapeutiques plus ciblées, présentant l'avantage d'être plus efficaces et moins toxiques. Parmi les différentes pistes thérapeutiques envisagées, une société de biotechnologies tente d'évaluer l'activité tumorigène des récepteurs de chimiokine. Les chimiokines sont des cytokines chimio attractantes, produites par de nombreux types cellulaires dont les cellules hématopoïétiques, épithéliales et endothéliales. La fonction principale des chimiokines est le chimiotactisme, qui correspond à l'orientation des cellules au sein de l'organisme notamment au cours de la réponse immunitaire. Elles participent également à de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la production de cytokines et la mort cellulaire. De nombreuses études scientifiques ont démontré l'implication des chimiokines en cancérologie. Elles ont notamment été décrites pour moduler l'angiogenèse, la prolifération, l'invasion, l'apoptose et l'infiltration leucocytaire au sein de la tumeur. Le développement d'outils ciblant ses acteurs constitue donc un intérêt conséquent.

Dans le cadre de cette approche, cette société a demandé à notre processus de production d'assurer la génération d'anticorps monoclonaux contre l'un des récepteurs à chimiokine. La finalité de ce projet est de déterminer si le ciblage de cette protéine avec un anticorps monoclonal bloquant, peut s'avérer être une approche thérapeutique efficace.

L'approche envisagée consiste à injecter la protéine d'intérêt à des souris modifiées génétiquement pour sous exprimer cette molécule, afin de permettre la production, par des lymphocytes B, d'anticorps contre cette molécule qui est reconnue dans ce modèle murin comme du « non-soi ». Le temps d'immunisation des souris sera d'environ 3 mois.

Les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire *in vitro* des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'anticorps monoclonal synthétisé par son lymphocyte parental. Les hybridomes générant des anticorps spécifiques d'un déterminant antigénique (épitope). L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre une structure protéique particulière, une quantité de 20 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

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

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petites tailles et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 20 souris (2 x 10).

La période minimum d'immunisation des souris est de 43 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation ne nécessitant pas l'ajout d'adjuvant est de degré de gravité légère.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur socialisation.

5904. Les pathologies impliquant les mitochondries (fournisseurs de l'énergie cellulaire à travers la chaîne respiratoire) sont fréquentes et sévères. Elles possèdent une prévalence de 1 personne sur 4300. La dysfonction de l'organite affecte le système nerveux central, le muscle, le cœur, le pancréas, le foie, le rein et les organes sensoriels. Les interventions thérapeutiques sont peu nombreuses et inefficaces entraînant l'évolution inexorable des symptômes et une morbidité élevée. Depuis une dizaine d'années l'implication de la mitochondrie dans des pathologies neurodéveloppementales est étudiée en particulier pour les troubles du spectre autistique (TSA), la schizophrénie et les troubles bipolaires.

Le projet de recherche que nous développerons consiste à utiliser les souris Harlequin, comme modèle génétique d'une pathologie mitochondriale (déplétion de la protéine Apoptosis Inducing Factor) afin de comparer les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de leurs cervelets avec celles des souris knock-out (KO) *Fmr1*, modèle du syndrome de l'X fragile. Ce syndrome est la cause la plus fréquente de déficience intellectuelle héréditaire. Il est aussi inclus dans les TSA due à la co-occurrence des symptômes de l'autisme chez des patients atteints de l'X fragile.

Notre objectif est double : (1) déterminer si l'atrophie cérébelleuse, due à l'absence de l'AIF et à la dysfonction mitochondriale qui en résulte, chez la souris Harlequin entraîne des troubles cognitifs ; (2) rechercher une corrélation entre les troubles cognitifs de la souris *Fmr1* et des perturbations dans le fonctionnement des neurones du cervelet. Ainsi, nous mettrons en place une thérapie

génique pour permettre l'expression du gène codant la protéine mitochondriale Neuroglobine NGB via l'administration des vecteurs AAV2 car nous avons précédemment montré que cette protéine est capable de protéger de façon pérenne la fonction mitochondriale empêchant ainsi la mort neuronale dans des situations pathologiques.

Nous utiliserons au total 440 souris soit 220 par lignée ; la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement) a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée de manière continue : 1) remplacement, les études *in vitro* à partir des neurones du cerveau ne permettent pas l'examen de fonctions cognitives et motrices complexes. Néanmoins, nous développerons certaines expériences sur des tranches de tissus qui pourraient permettre d'évaluer morphologiquement ces cellules ; en particulier leur dynamique mitochondriale, diminuant ainsi le nombre des souris dédiées à des études histologique ; 2) réduction, nous utiliserons le moins de souris possibles tout en veillant à obtenir des données statistiques significatives ; 3) raffinement, nous veillerons à optimiser les méthodologies pour éviter tout inconfort / douleur / détresse / angoisse aux animaux. Afin de préserver au mieux le bien être d'animaux, une attention constante sera déployée pour assurer la qualité des conditions de transport, d'élevage et d'hébergement des souris (période d'acclimatation, soins, état sanitaire, enrichissement du milieu, qualité de locaux d'expérimentation).

5905. Les vecteurs recombinants Adeno-associés ou rAAV sont des vecteurs de choix pour le traitement de maladies génétiques car ils assurent un transfert de transgènes thérapeutiques sûr et efficace dans différents tissus et organes tels que l'œil, le muscle, le foie ou le cerveau, permettant de traiter un large éventail de maladies. Toutefois, l'administration unique d'un vecteur rAAV induit le développement d'une réponse immunitaire humorale persistante contre la capsid qui compromet une deuxième administration, parfois nécessaire pour assurer une continuité d'expression du transgène dans le temps et l'espace.

Pour pallier cette immunité, des stratégies pharmacologiques, basées sur l'utilisation d'immunosuppresseurs, d'anticorps pour éradiquer les lymphocytes, ou physiques, telles que la plasmaphérèse, ont été développées, mais leur application et leur efficacité sont limitées.

Ainsi, nous avons développé une nouvelle approche pour tester une nouvelle formulation de composés immunomodulateurs (CIM) en injection conjointe avec le vecteur rAAV.

Suite à la réalisation d'une étude pilote chez le primate évaluant la capacité de ces CIM à inhiber le développement d'une réponse immunitaire contre l'AAV dans la cadre d'une double administration CIM/AAV et l'absence de toxicité de cette combinaison, nous souhaitons à présent comparer l'efficacité d'une injection unique et multiple de vecteur rAAV8-FIX en présence d'agents immunomodulateurs chez le macaque.

Six singes (*Macaca fascicularis*) mâles (2-3 ans, 2-4 kg) séronégatifs pour l'AAV8 seront inclus dans l'étude et répartis en trois groupes. Sous anesthésie, selon les groupes, ils recevront soit une double administration CIM/AAV simple, soit une double administration CIM/AAV qui sera répétée 60 jours plus tard, soit une administration simple d'AAV qui sera répétée également 60 jours plus tard, par voie intraveineuse.

Les animaux seront prélevés au niveau sanguin avant l'injection pour vérifier leur statut sérologique et leurs paramètres sanguins. Ensuite, des prélèvements sanguins réalisés tous les quinze jours seront nécessaires à l'étude. A la fin de l'étude (100 jours post-injection) les animaux seront euthanasiés pour une analyse des organes.

Conformité à la règle des 3R :

1) Remplacer : les études réalisées chez le singe apportent les meilleures connaissances transposables à l'homme en termes de toxicité, d'efficacité et d'immunogénicité de l'AAV. La complexité des réactions immunitaires en jeu devant être étudiée ne permet pas le recours à des méthodes substitutives, telles que les études *in vitro* et justifie notre recours à des animaux.

2) Réduire : cette étude inclue un faible nombre d'animaux et ne duplique aucune autre étude déjà réalisée utilisant ces composés immunomodulateurs. Elle fait suite à une étude pilote utilisant des CIM déjà réalisée chez le singe et à des résultats très encourageants obtenus chez le petit animal. Au cours de cette étude, le nombre d'animaux (n=2 animaux par groupe) utilisé est réduit à son minimum pour une exploitation possible des résultats mais ne permettra pas de mettre en place une étude statistique.

3) Raffiner :

L'état général et l'alimentation des animaux seront surveillés quotidiennement par les techniciens animaliers et le vétérinaire du centre. Des protocoles anesthésiques seront mis en place en fonction de la procédure à réaliser. L'administration expérimentale par injection intraveineuse lente se déroulera sous anesthésie générale (anesthésie fixe avec relai gazeux). Les prélèvements sanguins réalisés au cours de l'étude, seront effectués sous protocole anesthésique permettant d'obtenir une anesthésie de courte durée (environ 10 min.). Ces actes étant peu douloureux, aucun protocole analgésique ne sera mis en place d'emblée pour ces 2 procédures.

Pour favoriser les échanges sociaux entre animaux et favoriser leur bien-être, les macaques seront hébergés par groupes de 2 ou 3 dès que possible (hors période de suivi post opératoire par ex.).

Le centre dispose également d'un programme d'enrichissement pour les macaques, qui sont toujours hébergés au moins par deux quand cela est possible. Le programme d'enrichissement regroupe un certain nombre d'activités (qui sont suivies via un cahier d'enrichissement) :

- distribution de fruits frais et secs cachés dans la litière ou déposés en hauteur
- visionnage de films ou autres documentaires animaliers (tous les deux jours)
- mise à disposition de jouets type Lego ND ou autre
- aménagement de l'habitat (cage de 3 m³ (H : 1960 cm, l : 1100 cm, P : 1400 cm) pour un à deux primates) à l'aide de miroirs et de chaînes pour favoriser les déplacements verticaux.

5906. Les mutations de nombreux gènes conduisent à des déficiences intellectuelles qui s'accompagnent de troubles de la communication et des défauts de l'interaction sociale. Ces paramètres comportementaux ne sont souvent pas pris en compte dans la description des modèles alors que ces symptômes sont cruciaux pour les patients et leurs familles. Nous avons établi deux modèles distincts de souris transgéniques représentatifs de deux mutations identifiées dans deux familles et associées à des sévérités différentes de la pathologie.

Pour ce projet, nous utiliseront au total 48 souris, comprenant des souris normales (27) et des souris transgéniques (21) portant l'une ou l'autre des mutations.

Le nombre d'animaux utilisé est réduit au minimum tout en permettant l'exploitation de façon fiable des résultats. Pour cela, l'expérience professionnelle d'une collaboratrice sur la répétabilité des résultats ainsi que des tests statistiques sont mis à profit. De même, pour s'assurer du bien-être des animaux, les milieux seront enrichis et l'isolement des animaux sera réduit au minimum (3 semaines).

Les objectifs scientifiques de ce projet ne sont envisageables que chez l'animal, car ils nécessitent le contrôle de l'environnement complet de l'animal, depuis son développement jusqu'à l'âge adulte. Les fonctions hautement intégratives telles que comportement social et communication acoustique ne peuvent pas être étudiées par des cultures cellulaires, des coupes de cerveau ou des animaux invertébrés car les protocoles comportementaux n'existent pas dans ces modèles. Les fonctions hautement intégratives nécessitent l'existence d'un cortex préfrontal, structure cérébrale qui existe de façon homologue à l'homme chez la souris.

Toutes les méthodes possibles sont utilisées pour limiter le nombre d'animaux et prendre en compte leur bien-être et leur potentielle souffrance. Grâce à ce projet, nous nous attendons à caractériser les défauts de communication et d'interaction sociale associés à des mutations de déficience intellectuelle. Ceci est indispensable pour la compréhension des cas cliniques et le développement de futures approches thérapeutiques.

5907. L'instabilité génétique est une caractéristique des cellules tumorales leur permettant de remanier leur génome à grande vitesse et de s'adapter à des conditions environnementales très diverses *via* l'accumulation de mutations dans des gènes du cancer. Ce phénomène d'instabilité est plus au moins important selon le type de tumeurs et l'équipe focalise son activité à l'étude d'un type tumoral hyper-instable et fréquent (cancer du côlon de type MSI, pour MicroSatellite Instable). Dans ces tumeurs, les gènes contenant des séquences microsatellites de l'ADN (séquences répétées du génome) sont mutées à très hautes fréquences et ces altérations sont sélectionnées ou non au cours du développement tumoral en fonction de leur rôle dans le processus de croissance tumorale.

De manière originale, des données encore non publiées du laboratoire établissent qu'un nombre limité de gènes contenant un microsatellite est exempt de mutations, suggérant une contre-sélection de ces événements dans la tumeur. Le projet vise à étudier plus avant ces gènes et leur activité dans le cancer. L'hypothèse est qu'ils doivent probablement avoir une contribution essentielle pour la survie des cellules tumorales à l'état sauvage puisqu'aucune mutation ne semble compatible avec le développement tumoral chez les patients. Nous réaliserons des cribles fonctionnels pour valider cette hypothèse de travail afin d'identifier ceux qui sont réellement indispensables au processus tumorigénique.

Enjeux en matière de cancérologie et santé publique : La réalisation de ce projet constitue une nouvelle étape pour progresser dans la compréhension de la physiopathologie du type tumoral MSI et comprendre les limites de ce mode d'instabilité du génome. Sur un plan clinique, il pourrait déboucher sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour une médecine personnalisée de ces cancers.

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 40 souris NMRI-NudeFoxn1(Nu/Nu) pour une durée maximale de 2 ans. Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de projet. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

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

Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

5908. Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par leur instabilité génétique. Ce phénomène d'instabilité est plus ou moins important selon le type de tumeurs. Nous nous sommes intéressé à l'étude du cancer du côlon de type MSI (pour Microsatellite instable). Ces cancers surviennent à la suite du dysfonctionnement du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable du maintien de l'intégrité du génome.

Nous avons identifié une mutation du gène HSP110 dans les cancers colorectaux (CCR) MSI, responsable de l'expression d'une forme mutante de la protéine chaperonne HSP110. Nos résultats démontrent que cette mutation est fréquente dans les cancers MSI

du colon, de l'estomac et de l'endomètre. Par des approches *in vitro*, nous avons démontré que cette mutation sensibilise les cellules tumorales aux agents anti-cancéreux comme le 5-Fluorouracil et l'oxaliplatine. Notre objectif est d'étudier l'impact de cette mutation d'HSP110 dans la chimiotoxicité cellulaire. Pour ceci nous comptons utiliser une souris transgénique pour HSP110 qui reproduit la mutation humaine. Notre hypothèse est que cette mutation pourra induire une sensibilisation des cellules normales aux traitements de chimiothérapie, notamment le 5-Fluorouracile.

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 60 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Les modèles utilisés seront soit des souris commerciales non transgéniques soit des souris transgéniques pour HSP110 de 9 KI/KI (C57BL/6n) qui ne présente pas de phénotype dommageable. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

5909. Nous proposons d'évaluer les effets de l'urbanisation, entre autres, de l'exposition aux polluants atmosphériques et du sol sur des paramètres physiologiques et moléculaires (balance redox, taux d'érosion des télomères et efficacité du système immunitaire) cruciaux pour des traits d'histoires de vie majeurs intimement liés à la santé des individus, à savoir la longévité et la reproduction. Nous effectuons que des prises de sang donc le stress de animaux est minimal.

Notre questionnement scientifique porte sur la faune sauvage donc nous sommes obligés de travailler sur des animaux vivants. Nous utiliserons pour cela un modèle animal sentinelle, la Mésange charbonnière (*Parus Major*) avec 480 jeunes et 80 adultes pour obtenir des résultats tangibles, soit 640 oiseaux par an et donc 3200 sur 5 ans sans que notre projet entraîne de souffrance pour les animaux ou leur mort. Ce projet est réalisé entièrement en milieu naturel dans la plaine alsacienne.

5910. L'effet anti-tumoral de cette approche d'immunothérapie cellulaire, appelé effet GVL est le plus souvent associé au développement d'une réponse T cytotoxique dirigée contre les tissus sains du receveur. Cette réaction est appelée maladie du greffon contre l'hôte (GVH) et est responsable de lésions cutanées et digestives qui peuvent se compliquer d'une morbidité et mortalité élevées. Ces lésions, notamment les lésions cutanées de GVH n'engendrent pas de façon systématique de la douleur chez l'animal, elles sont plus le reflet d'un conflit immunologique.

L'objectif des projets de recherche dans le domaine de la greffe de CSH allogénique est de déterminer des stratégies qui pourraient permettre de séparer les effets GVH et GVL. Nombreux travaux de recherche ont considéré l'immunomodulation de la GVH par la thérapie cellulaire. Certaines voies de recherche ont montré des résultats prometteurs sur l'immunomodulation de la GVH, mais aucune n'a à l'heure actuelle permis de séparer l'effet GVH de GVL. Nos travaux de recherche sont axés sur la détermination de nouvelles approches d'immunomodulation permettant de contrôler l'effet GVH sans impacter sur la GVL ni la prise de greffe.

Type d'animaux : Souris femelles de différentes souches commerciales (Balb/c, C57BL/6j, 129S2/SvPasCrl, et CB6F1).

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 180 souris femelles Balb/c, 300 souris femelles C57BL/6j, 60 souris femelles 129S2/SvPasCrl et 180 souris femelles CBAF1 soit un total de 720 animaux pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de la GVHD aiguë. Il n'est pas possible de créer *in vitro* la complexité du système immunitaire avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

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

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. De plus, l'arrêt précoce des expériences en cas de pic aiguë de GVHD est réalisé. Un score est établi pour chaque souris au cours du temps, selon la méthode décrite dans la présente demande.

5911. Le vieillissement de la population et le besoin de thérapies toujours plus efficaces poussent à développer de nouveaux traitements médicaux. Certains traitements sont basés sur de nouvelles molécules ou combinaison de molécules mais aussi sur des thérapies géniques. Lorsqu'un traitement médicamenteux semble prometteur, il entre en phase de recherche préclinique, pendant laquelle il est d'abord testé *in vitro* (par exemple sur des cellules) avant d'être testé *in vivo*, sur des animaux de laboratoire. Cette procédure indispensable selon la loi européenne en vigueur permet notamment d'assurer la sécurité des premiers essais sur l'homme et d'évaluer l'efficacité des nouveaux traitements. Un certain nombre d'études nécessite de mesurer, sur des rongeurs de laboratoires (en général souris et rats), l'activité et les paramètres physiologiques de ces animaux, ceci de manière précise et sur de longues périodes expérimentales. Pour fiabiliser les résultats, comme pour répondre à des exigences éthiques, ces mesures gagnent à être réalisées dans des conditions de vie « normale » des animaux, c'est à dire sur des animaux non contraints, libres de leurs mouvements et hébergés en groupes et non pas isolés dans des cages individuelles. Les biais potentiellement induits par l'isolement des sujets évalués sont significatifs et atténuent la fiabilité des évaluations sur la durée. Des solutions commerciales partielles sont actuellement disponibles, mais elles n'offrent malheureusement pas les performances et la flexibilité requises. C'est dans ce cadre que plusieurs partenaires académiques et industriels ont décidé de développer ensemble une instrumentation innovante pour effectuer, *in vivo*, la mesure de paramètres tels que l'activité et la localisation instantanée des animaux. Ces mesures permettent d'une part d'évaluer l'état physiologique de l'animal mais aussi de quantifier différents indicateurs d'activité: distance parcourue, activité diurne, activité nocturne, vivacité, sociabilité. Notre solution, composée d'un implant inséré dans l'animal et d'un détecteur extérieur à sa cage, allie un plus grand respect de l'animal et une meilleure fiabilité des résultats par rapport aux solutions existantes. Un traitement antalgique systématique sera administré aux animaux après implantation du dispositif. La douleur sera évaluée grâce à une échelle standardisée deux fois par jour pendant la première semaine.

Ce projet vise à valider une première version de puce développée pour le rat afin de vérifier son innocuité pour l'animal et sa pertinence métrologique. Cette validation sera menée sur 10 rats Sprague-Dawley. Ce nombre d'animaux a été optimisé afin de tenir compte de la règle des 3R. L'étude ne nécessite pas de modèle statistique à ce stade.

Une première version du dispositif a été validée. Lors de cette étude, l'absence d'effets délétères sur l'animal a été prouvée. Quelques limitations métrologiques ont cependant été soulevées. Quelques expérimentations complémentaires doivent être conduites afin de valider une seconde version de puce développée pour le rat afin de tester les améliorations métrologiques apportées. Cette validation sera menée sur 4 rats Sprague-Dawley.

5912. Nous étudions l'organisation et le développement des circuits du système nerveux central des mammifères : comment deux populations de neurones s'interconnectent entre elles et dans quelle mesure leur connectivité est remaniée pendant le développement postnatal? Nous utilisons comme modèle la projection auditive binaurale du tronc cérébral, impliquée dans la localisation des sons, qui présente des synapses de grande taille (calices de Held) identifiables par microscopie optique. Nous employons la souris, modèle vertébré de plus petite taille possédant une organisation du circuit binaural similaire à l'homme. Nous marquons les neurones qui composent ce circuit par deux approches transgéniques et virales complémentaires qui nous permettent d'étudier la manière dont les axones et synapses binauraux sont agencés et comment leur connectivité change au cours du développement postnatal. Pour cela nous observerons post-mortem les cerveaux des souris, par microscopie optique sur coupes sériées ou après transparençation. Pour l'ensemble du projet, un nombre global de 319 animaux est nécessaire : 249 pour les approches de marquage transgénique et 70 pour les injections de vecteurs viraux.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des carrés de cellulose et des bâtons à ronger. 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 ».

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de projet.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

5913. Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes à l'origine des conséquences délétères de l'hypoxie intermittente chronique (HIC), un modèle du syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) et de proposer un traitement pour les contrer. Cette pathologie touche 5 à 20% de la population et est associée à de nombreuses autres pathologies parmi lesquelles, les pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle et l'infarctus du myocarde.

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

Particulièrement, nous nous intéressons au métabolisme de la citrulline, un acide aminé, connue pour son rôle bénéfique contre le remodelage vasculaire, l'athérosclérose ou encore l'HTA. Pour réaliser ce projet, nous avons donc besoin d'exposer des rats dont la nourriture est supplémentée ou non en citrulline pendant leur exposition à la normoxie ou à l'HI. Dans une première série d'expériences, nous réaliserons un bilan biologique et un bilan d'évaluation de cet acide aminé (n=8, par groupe pour 4 groupes). Dans une deuxième série d'expériences, nous mesurerons la pression artérielle et la taille de l'infarctus (n=12, par groupe pour 4 groupes).

Nous avons choisi de travailler avec 80 rats Wistar exposés à la normoxie ou à l'HIC pour plusieurs raisons. L'utilisation des rats est encouragée par des travaux précédents qui d'une part, valident le modèle comme modèle de trouble cardiovasculaires associés à l'HI et qui, d'autre part, valident les techniques d'investigation de la voie de la citrulline. Nous sommes dans l'obligation d'utiliser diverses techniques (prélèvement, *in vivo*, *ex vivo*) pour tester notre hypothèse.

Enfin, concernant le bien-être des animaux, ils seront hébergés selon les règles de bien-être des animaux dans une animalerie adaptée et autorisée. Les animaux ne seront jamais manipulés dès leur arrivée dans l'animalerie mais uniquement après 8 jours de stabulation. Les animaux seront observés quotidiennement dans leur cage d'hébergement pour s'assurer qu'ils ne soient pas stressés et qu'ils aient accès à l'eau et à la nourriture.

Conformément à la règle des 3 R, ce projet vise à :

« Remplacer » : les réponses physiologiques à l'hypoxie intermittente, à ce stade de recherche, sont à prendre en compte pour l'organisme entier. Ici, la souche de rats utilisée est en adéquation avec les publications précédentes du groupe de recherche.

« Réduire » : le nombre d'animaux a été calculé à minima en tenant compte du nombre final nécessaire pour la réalisation des tests statistiques appropriés.

« Raffiner » : il s'appuie sur des points de mesure bien décrits et validés dans la littérature concernant l'évaluation du métabolisme des acides aminés, de la citrulline et de la taille de l'infarctus. Les rats seront tous anesthésiés avant les manipulations.

5914. L'inhalation de particules atmosphériques (PM) induit une réaction inflammatoire pulmonaire. De nouvelles données mettent aussi en évidence un impact de l'inhalation de PM au niveau intestinal. Le microbiote joue un rôle crucial dans l'élaboration de la réponse immunitaire et le dialogue entre les tissus pulmonaires et intestinaux. Ce projet vise à étudier les conséquences de l'inhalation de PM sur les réponses immunitaires dans les muqueuses pulmonaire et intestinale chez la souris. Les objectifs sont : 1) l'étude transcriptomique de la réponse des muqueuses pulmonaires et intestinales aux PM par microarray. 2) l'étude mécanistique de la réponse des muqueuses pulmonaires et intestinales aux PM, essentiellement par immunophénotypage par cytométrie en flux et quantification de l'expression des cytokines et chimiokines par PCR en temps réel. 3) l'évaluation de l'impact de l'exposition aux PM sur les microbiotes pulmonaire et intestinal analysés par pyroséquençage.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 360 souris.

Pour réduire au minimum le nombre d'animaux: les expérimentations seront effectuées sur un nombre de 5 souris par groupe dans un premier temps, et seront renouvelées pour atteindre le seuil de significativité uniquement si cela est nécessaire et uniquement si les données préliminaires sont encourageantes.

Pour réduire la douleur, la souffrance et l'anxiété infligées: les souris seront acclimatées progressivement à la chambre d'inhalation. Les souris seront placées dans la chambre d'inhalation pour une durée maximale de 4 h par jour.

Les analyses statistiques seront effectuées *via* le test Mann Whitney qui est adapté au nombre d'échantillons faible.

5915. La fibrose hépatique est la résultante commune aux maladies chroniques du foie. Sa progression conduit généralement à la cirrhose. Le diagnostic et l'évaluation du degré de la fibrose hépatique, requis pour la prise en charge des patients, repose essentiellement sur des tests sanguins et la ponction-biopsie hépatique, particulièrement invasive.

Dans ce contexte, nous proposons de développer et d'évaluer un diagnostic non-invasif de la fibrose hépatique chez le lapin par une imagerie ultrasonore: classement des différents foies selon leurs stades d'évolution (léger à sévère) par imagerie ultrasonore des microstructures tissulaires. L'imagerie ultrasonore sera effectuée avec deux types de sondes ultrasonores. Nous souhaitons corrélérer les tailles et les concentrations des structures tissulaires estimées par imagerie ultrasonore à celles observées en histologie sur des ponctions hépatiques. Cette méthode d'imagerie ultrasonore pourrait alors être un outil prometteur pour classer les cirrhoses hépatiques de façon non-invasive.

La prise en compte de la règle des 3R se décline par:

Remplacement: Dans une première approche expérimentale, nous avons réalisé des expériences de simulations dont les résultats sont particulièrement encourageants et nécessitent d'être validés avec un modèle préclinique pertinent. Par conséquent, à cette étape du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un autre modèle d'étude *in-vitro* ou *in-silico*.

Réduction: Une première étude a permis de valider notre modèle *in-vivo* de fibrose hépatique chez le lapin et les résultats obtenus sont prometteurs. Le nombre restreint d'animaux examinés dans chacune des classes de pathologie induite permettra de mettre en évidence la faisabilité de nos approches en montrant qu'une corrélation existe entre les paramètres que l'on extrait et la nature des tissus (nombre total de lapins: 30). Selon les résultats obtenus, une étude de plus grande ampleur pourra ultérieurement être mise en place.

Raffinement: Les lapins seront hébergés individuellement en présence d'un objet d'enrichissement (morceaux de carton). Les animaux atteints d'une fibrose hépatique seront observés deux fois par jour.

5916. Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par leur instabilité génétique. Ce phénomène d'instabilité est plus au moins important selon le type de tumeurs. Nous sommes intéressés à l'étude du cancer du côlon de type MSI (pour Microsatellite instable). Ces cancers surviennent à la suite du dysfonctionnement du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable du maintien de l'intégrité du génome. Il est connu que les cancers de type MSI sont de meilleurs pronostic par rapport aux tumeurs de type non MSI (ou MSS pour Microsatellite Stable) caractérisés par une instabilité chromosomique.

Nous avons identifié une mutation du gène HSP110 dans les cancers colorectaux (CCR) MSI, responsable de l'expression d'une forme mutante de la protéine chaperonne HSP110. Nos résultats démontrent que cette mutation est fréquente dans les cancers MSI du colon, de l'estomac et de l'endomètre. Par des approches *in vitro*, nous avons démontré que cette mutation sensibilise les cellules tumorales aux agents anti-cancéreux comme le 5-Fluorouracil et l'oxaliplatine. Notre objectif est d'étudier le rôle de la mutation d'HSP110 dans la tumorigénèse MSI. Pour ceci nous comptons utiliser une souris transgénique pour HSP110 qui reproduit la mutation humaine. Notre hypothèse est que la mutation d'HSP110 pourrait induire une amélioration de la réponse à la chimiothérapie et modifier le tableau clinique (ralentissement du phénotype tumoral, augmentation de la survie). Les souris MSH2KO HSP110 seront donc comparées aux souris MSH2 KO pour vérifier notre hypothèse.

Ce projet impliquera l'utilisation de 60 souris transgéniques pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment. Il repose sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

5917. Depuis plusieurs années, l'intérêt s'est porté sur les propriétés régulatrices des acides aminés. Plus particulièrement, différents travaux, ont montré que la citrulline, un acide aminé n'entrant pas dans la production des protéines, était un puissant activateur de la production de protéines musculaires. De telles propriétés pourraient être mises à profit dans la prise en charge de pathologies atteignant la fonction musculaire.

Dans l'organisme, la citrulline est produite de façon quasi exclusive par l'intestin au cours de régimes alimentaires dépourvus ou pauvres en protéines. Pour maintenir une production de protéines minimale, nous proposons donc que l'intestin produirait de la citrulline afin de préserver l'intégrité de l'organisme.

Notre hypothèse de travail est que la citrulline d'origine intestinale serait essentielle au maintien de la fonction musculaire et qu'un défaut de sa production pourrait être pallié par un apport de cette citrulline par voie orale.

Pour répondre au mieux à nos hypothèses, nous travaillerons sur une lignée de souris génétiquement modifiée nous permettant d'inactiver spécifiquement la production intestinale de citrulline et d'en évaluer les conséquences sur la fonction musculaire.

Dans un premier temps, nous validerons l'inhibition de notre gène d'intérêt à court et long terme (respectivement 3 mois et 1 an) ainsi que les conséquences sur la fonction musculaire.

Dans un deuxième temps, nous évaluerons chez ces souris la capacité d'un régime alimentaire enrichi en citrulline à restaurer une fonction musculaire normale.

Dans un troisième temps, nous évaluerons les conséquences de l'invalidation de ce gène sur le métabolisme protéique musculaire à jeun et après une re-nutrition.

Le protocole a été établi pour satisfaire au mieux la règle des 3R :

Remplacer : L'objectif étant de mieux comprendre le rôle de la citrulline dans la régulation de la balance protéique au niveau corps entier, une étude *in vivo* est indispensable. Aussi, le modèle murin a été choisi pour cette étude car il est le seul connu permettant d'obtenir les modifications génétiques nécessaires à notre étude.

Réduire : Au vu d'études préliminaires et dans le but d'obtenir une puissance statistique suffisante nous permettant de répondre de manière pertinente aux questions posées par l'étude, un minimum de 6 individus par groupe et par sexe a été établi, soit un total de 432 animaux pour l'ensemble des procédures.

Raffiner : L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long des procédures afin d'intervenir de manière rapide et appropriée au moindre signe clinique de douleur. De même des points limites seront établis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus.

5918. Dans les pays occidentaux, l'accident vasculaire cérébral (AVC) est une cause majeure de handicap acquis de l'adulte, la deuxième cause de démence après la maladie d'Alzheimer et la troisième cause de mortalité. L'insuffisance rénale chronique

(IRC) favorise la survenue d'AVC et est à l'origine de complications neurologiques et d'affections cognitives qui appauvrissent la qualité de vie des patients et sont associées à un risque accru de mortalité. Les atteintes peuvent être motrices, sensitives, sensorielles et cognitives (avec notamment des troubles de la mémoire) et sont souvent associées à des syndromes dépressifs. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement de l'AVC en dehors de la thrombolyse et des traitements administrés en prévention secondaire. La prévention et le traitement des atteintes ischémiques conséquentes à la survenue de l'AVC sont donc des considérations importantes dans la prise en charge de personnes atteintes d'IRC. Le diabète et l'hypertension artérielle sont les causes les plus fréquentes de maladie rénale chronique. Ainsi, en France, 30 % des patients dialysés chroniques sont diabétiques. Des études menées par notre laboratoire montrent que la metformine, une molécule utilisée dans le traitement du diabète de type II pour ses effets normoglycémiant, présente des effets neuroprotecteurs suite à la survenue d'un AVC dans un contexte d'IRC. Nous nous attachons actuellement à identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces phénomènes.

Le présent projet a pour but d'identifier les mécanismes par lesquels la metformine réduit la sévérité des atteintes ischémiques post-AVC chez la souris au cours de l'insuffisance rénale chronique (IRC).

Pour répondre à cet objectif nous travaillerons sur des souris C57BL6J atteintes d'IRC (souris IRC) ou des souris contrôles (souris SHAM), traitées ou non par la metformine (200mg/Kg, dilué dans l'eau de boisson). Les souris seront donc réparties en quatre groupes : SHAM contrôle (n=19), SHAM metformine (n=19), IRC contrôle (n=23), IRC metformine (n=23). Après six semaines d'exposition à la metformine, les souris subiront un AVC. Trois jours après l'AVC, les ARN messagers (ARNm) seront récupérés à partir des cerveaux de souris afin d'étudier les effets de la metformine sur la régulation des gènes impliqués dans la sévérité de l'ischémie cérébrale.

La complexité des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'IRC et les AVC ne permet pas d'obtenir des données mécanistiques complètes en passant par des études *in vitro*, *ex vivo* ou *in silico*. En effet, les mécanismes de récupération post-AVC impliquent l'activation et l'action coordonnées de diverses cellules résidentes du cerveau (neurones, astrocytes, microglies, neuroblastes), qu'il nous est impossible de co-cultiver simultanément. Nous étudions par ailleurs les effets de l'IRC sur la récupération post-AVC, ce qui nécessiterait de reproduire *in vitro* le microenvironnement auquel sont confrontées les cellules résidentes du cerveau lorsque l'IRC et l'AVC surviennent simultanément (Conséquence d'une exposition au sérum urémique, altérations hémodynamiques globales, inflammation, ...), aspect qu'il nous est impossible de reproduire en laboratoire par des études *in vitro*, *ex vivo* ou *in silico*. Notre choix s'est porté sur l'utilisation d'un modèle animal car notre laboratoire possède une grande expérience des modèles d'IRC et d'AVC chez la souris. Ces modèles ont fait l'objet de plusieurs publications internationales et sont reconnus par la communauté scientifique.

Le nombre d'animaux nécessaire à l'étude (n=84) est maintenu au minimum pour permettre une analyse statistique des résultats et éviter une impossibilité de conclure par manque d'animaux dans des groupes expérimentaux.

Toutes les précautions d'usage en termes d'analgésie et d'anesthésie seront prises afin de soulager et limiter la douleur des animaux lors des différentes expériences. Ainsi, après chaque chirurgie, les souris recevront une injection sous cutanée d'un antalgique opiacé et seront placées sur une couverture chauffante jusqu'à leur réveil. L'administration de l'antalgique sera répétée 6 à 8 heures après la première administration si les animaux montrent des signes de douleurs. La plus grande attention sera portée afin d'éviter la survenue de douleurs et de stress chez les animaux tout au long du protocole. Ainsi, après chaque chirurgie, l'état général des souris sera surveillé par une pesée (journalière dans la semaine post-chirurgie puis semi-hebdomadaire) et la recherche de signes de souffrance (observation visuelle, sept jours sur sept).

5919. Le rôle de la flore intestinale sur la santé de l'homme est maintenant largement reconnu. La flore intestinale est composée de nombreuses et diverses souches de bactéries qui participent à la dégradation des aliments (par exemple la fermentation des fibres alimentaires), permettent la synthèse de vitamines (vitamine K) ou encore protègent contre les infections par d'autres bactéries virulentes qui provoqueraient des maladies intestinales. La composition de cette microflore est importante car celle-ci agit sur le développement des défenses immunitaires, et jouerait un rôle dans certaines maladies inflammatoires chroniques (comme les rectocolites hémorragiques, maladies de Crohn), l'obésité ou encore le diabète et le cancer.

Nous étudions l'une des bactéries commensales, c'est à dire considérée comme inoffensive, présente naturellement dans la flore intestinale dès les premières heures après la naissance puis persistant toute la vie de l'individu. De nombreuses études montrent cependant que certaines de ces bactéries produisent des substances appelées toxines dont l'impact sur notre santé reste encore inconnu. Nos études visent à comprendre leur rôle dans le développement ou la protection vis-à-vis de certaines maladies.

Ces études mettront en œuvre un modèle de souris transgénique particulièrement sensible à certaines maladies pro-inflammatoires et digestives. Ces souris déclenchent naturellement des rectocolites ulcéreuses dont les caractéristiques sont similaires aux colites ulcéreuses humaines, et des complications associées comme le cancer colorectal. Nous étudierons le rôle de différentes bactéries (produisant ou non des toxines) présentes dans la flore intestinale. Les animaux traités oralement par les bactéries d'intérêt seront ensuite examinés pour déterminer la localisation des bactéries dans le tube digestif, la production de toxines et leur impact sur le tissu intestinal, les recto-colites et symptômes inflammatoires et le développement du cancer colorectal.

La règle des 3R est respectée:

Remplacer : Nous avons au préalable fait des études en utilisant des cellules de mammifères en culture permettant d'élucider comment agissent les toxines produites par les bactéries étudiées. Cependant, le recours à l'animal est irremplaçable car aucun autre modèle ne permet d'évaluer, au niveau d'un individu, les répercussions de cette bactérie au sein de la flore intestinale et de ses toxines sur la santé.

Réduire : le nombre de souris utilisées est de 270. Plusieurs paramètres seront analysés et suivis dans le temps sur le même animal vivant (poids, score clinique, nombre de bactérie, prélèvements de fèces) et lors de l'euthanasie (appareil digestif, nœuds mésentériques, foie, rate et sang).

Raffiner : Chez l'animal adulte, une perte de poids supérieure à 20 % du poids initial nous conduira à sortir l'animal du protocole expérimental et à l'euthanasier.

5920. La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune du système nerveux central qui résulte d'une destruction progressive de la gaine de myéline qui protège les fibres nerveuses et qui est nécessaire à la conduction des influx nerveux. Cette destruction est causée par le système immunitaire, qui réagit de manière indésirable contre cet élément du soi.

La SEP représente ainsi la première cause de handicap chez les jeunes adultes. Elle est généralement diagnostiquée entre 20 et 40 ans, elle touche 2,5 millions de personnes dans le monde, environ 80 000 patients en France, et atteint deux fois plus les femmes que les hommes.

Les cellules NK (Natural Killer) et ICL3 (Innate Cells Lymphoid) font partie des sentinelles de l'immunité innée, des cellules qui constituent la première ligne de défense de l'organisme contre les microbes et certaines cellules anormales (tumoraux ou infectées).

L'implication des cellules NK et des ICL3 dans la régulation de l'inflammation dans le système nerveux central (cerveau + moelle épinière) est mal connue. Cependant des données chez les patients indiquent que ces cellules peuvent limiter la sévérité de la sclérose en plaques. Des données dans le modèle murin de la sclérose en plaques suggèrent qu'il puisse en être de même.

Pour comprendre le rôle des cellules NK, nous disposons de modèles de souris génétiquement modifiées dépourvues de cellules NK.

Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 300 souris sur 5 ans.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet, comme détaillé ci-dessous :

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

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

Raffinement : Les souris sont hébergées dans des cages à 20-24°C et 30-50% d'hygrométrie, en portoirs ventilés (dans des cages d'une superficie de 500cm²), avec une alternance jour/nuit de 12h/12h. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Le change de la litière est réalisé 1 fois par semaine. Du coton ou du sopalin sont ajoutés pour leur permettre de faire un nid. Les animaux ont une semaine d'acclimatation avant que le protocole ne débute. Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement. Tout animal présentant des signes de douleur, souffrance ou angoisse sera euthanasié.

5921. La santé et la durée de carrière des vaches laitières sont des préoccupations majeures dans les élevages à la fois pour le bien-être animal, la production de produits de qualité et la rentabilité économique pour l'éleveur. La santé des vaches laitières est en partie basée sur l'efficacité de la réponse immunitaire face à divers agents pathogènes. De nombreuses études ont établi les bases génétiques de la réponse immunitaire à une infection, permettant d'envisager une sélection des animaux les plus résistants à une maladie donnée (mammites par exemple) en fonction de leur patrimoine génétique. Néanmoins, cette démarche peut s'avérer insuffisante dans le cas de survenue de nouveaux pathogènes. De plus, une grande variabilité de l'efficacité de la réponse immunitaire est aussi observée. Le parcours de vie des animaux (stade physiologique, âge, expositions préalables, état général,...) et/ou les conditions d'élevage peuvent contribuer à cette variabilité. Par exemple, il est connu que la fréquence et la sévérité des infections mammaires augmentent avec l'âge. Il est donc important de s'intéresser non seulement à l'efficacité de la réponse immunitaire mais aussi au vécu de l'animal le prédisposant ou non à une pathologie. On sait que l'épigénome des cellules immunitaires peut être modifié par ce parcours de vie. Ainsi la réponse immunitaire d'une vache laitière est la résultante de son patrimoine génétique et de son épigénome, lui-même dépendant de ses conditions de vie (conduite d'élevage, nutrition, environnement climatique....). Dans notre étude, nous proposons de contrôler au mieux la composante génétique en utilisant des vaches de race Holstein obtenues par transfert nucléaire (clones). Notre laboratoire possède un ensemble de 16 vaches obtenues par clonage, possédant donc le même patrimoine génétique. Ces vaches sont réparties en 2 groupes d'âges variables (8 vaches de 6 ans et 8 vaches de 12 à 15 ans), ce qui permet d'étudier le vieillissement à génétique constante. Notre projet a pour objectif d'identifier les modifications de l'épigénome à l'origine des variations de la réponse immunitaire induites par le vieillissement chez la vache. En parallèle, en utilisant 9 vaches de génotype variable et connu, nées sur le site de l'Etablissement Utilisateur et élevées dans les mêmes conditions que les vaches clonées, nous pourrions explorer cette fois la variabilité de la réponse immunitaire en fonction de la génétique mais en minimisant les effets de l'environnement. En tirant partie de ce modèle original, nous proposons de caractériser le profil de la réponse inflammatoire *ex vivo* et *in vivo*. La question biologique posée concerne directement l'espèce *bovine*. Il ne peut être envisagé de mettre en œuvre uniquement une méthode alternative *in vitro* puisqu'il est primordial de se placer sur un plan systémique afin de prendre en compte l'animal dans son intégrité ainsi que son vécu. Néanmoins, l'essai *ex vivo* permet à partir d'un prélèvement de sang (5 ml, réalisé par un vétérinaire) d'évaluer *in vitro* une large gamme de réponses à diverses molécules inflammatoires. L'essai *in vivo* vise à analyser les toutes premières réponses du système immunitaire dans le cas d'une inflammation systémique accompagnée de fièvre transitoire (au plus pendant 24h). Un suivi des vaches (température ruminale, fréquences cardiaque, et respiratoire) ainsi qu'une étude du comportement des vaches avant et après le test *in vivo* seront

réalisés et permettront d'établir des critères d'évaluation de l'influence d'un état inflammatoire transitoire sans effet majeur, sur l'activité des vaches et sur leurs interactions avec l'éleveur. Cet essai ne met en aucun cas en péril la santé et l'avenir des animaux. Le nombre d'animaux est limité (n=25 répartis en trois groupes). Nous tirons parti de la possibilité d'analyser les résultats avant et après épreuve inflammatoire avec un test statistique apparié non paramétrique (chaque vache étant son propre témoin). Enfin, notre cheptel de vaches clonées a bénéficié d'un suivi exceptionnel, avec enregistrement de toutes les caractéristiques des animaux (croissance, courbe de poids, aptitude à la reproduction, pathologies, thérapies,...). Le raffinement de ce protocole est dû au modèle original, à la possibilité d'acquérir des données *in vivo* et *ex vivo* sur les mêmes individus, aux analyses statistiques des données, à la connaissance du vécu des animaux depuis leur naissance et enfin à leur suivi émotionnel. Les vaches sont hébergées en groupe dans une stabulation libre sur aire paillée avec un espace de plus de 30m² par vache, ce qui leur assure un parcours libre assez important; l'alimentation est distribuée le matin à heure fixe et repoussée deux fois par jour et elles ont accès à l'abreuvoir librement. Des pierres à sel sont aussi à disposition.

Notre étude va contribuer à mieux évaluer les possibilités de prolongement de carrière des vaches laitières tout en préservant l'efficacité de leur défense naturelle dans un souci de bien-être animal et de qualité des produits.

5922. Aujourd'hui nous faisons face à une véritable pandémie en ce qui concerne le développement des maladies métaboliques telles que le diabète de type 2 et l'obésité. Une étude a quantifié cette pandémie en prévoyant pour 2030 un taux de développement de 72% pour les Etats Unis et même supérieur à 150% pour les Pays en cours de développement tels que l'Asie et l'Afrique. Les impacts des facteurs génétiques et les mauvaises habitudes alimentaires (régimes riches en graisse et pauvres en fibre) n'expliquent que 10% de cette augmentation. Dans le but de comprendre ce qui favorise cette pandémie métabolique, un nouvel acteur du contrôle du métabolisme a été identifié, c'est le microbiote intestinal, l'ensemble des microorganismes de l'intestin. Des altérations du microbiote, dites dysbioses, ont été associées à la survenue des pathologies métaboliques, sans encore en avoir identifié tous les mécanismes moléculaires responsables. De plus, il a été montré qu'un régime diabétogène/obésogène induit des dysbioses favorisant les infections à entérobactéries, des bactéries qui colonisent l'intestin des nouveau-nés dès la naissance. Ces souches transmises par la mère sont des bactéries qui persistent dans l'intestin toute la vie de l'individu. Cependant, certaines souches d'entérobactéries sont aussi pathogènes, responsables de diarrhées, méningites, septicémies ou encore infections urinaires. Certaines de ces souches pathogènes produisent des toxines (génétoxines) capables de provoquer des dommages à l'ADN dans les cellules intestinales. On retrouve aussi des souches exprimant cette génotoxine dans 25% de la population générale, et ceci ainsi que dans une souche probiotique, c'est-à-dire une souche bénéfique pour la santé.

Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes moléculaires qui favorisent les infections à entérobactéries dans le contexte des maladies métaboliques d'origine nutritionnelle et comprendre pourquoi ces infections sont plus sévères dans un contexte de diabète de type 2 et obésité. Pour réaliser ce projet nous envisageons l'utilisation de souris sauvages rendues obèses/diabétiques par voie nutritionnelle avec du régime gras à 60% de matière grasse. Ces souris seront colonisées par des souches d'entérobactéries produisant la génotoxine colibactine et par des souches mutantes sur différents gènes impliqués dans la production de la colibactine. Ensuite, nous réaliserons des tests clés du métabolisme glucidique comme le test de tolérance au glucose, à l'insuline ou au pyruvate, un précurseur du glucose. Nous étudierons les organes clés du métabolisme glucidique comme le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique. Nous étudierons également l'impact du microbiote sur le système immunitaire.

Nous comptons utiliser un total de 400 souris (*Mus musculus*), soit 10 souris en fonction du régime (normal ou gras), de la classe de la souche bactérienne (classe 1 ou 2), du protocole régime/colonisation ou colonisation/régime, de fond génétique C57Bl/6J âgées de 4-5 semaines au moment du début du projet.

Si les études avec des cellules ont permis d'identifier et caractériser les dommages à l'ADN provoqués par les génotoxines, le recours à l'animal est irremplaçable car aucun modèle cellulaire ne permet de récapituler les processus de la colonisation intestinale bactérienne, de la translocation (c'est-à-dire la diffusion) des bactéries vers les autres organes, ni d'évaluer, au niveau de l'individu, la physiopathologie de cette colonisation par des bactéries produisant des génotoxines et ses répercussions sur la santé.

Le chiffre de 400 souris nous permettra d'atteindre un seuil statistiquement valable et donc de pouvoir interpréter les résultats obtenus. Cela permettra donc de ne pas répéter les expérimentations tout en respectant la réduction du nombre d'animaux employés (règle de 3 R). En ce qui concerne les points limites (critères d'interruption) pour le raffinement des protocoles, les procédures de colonisation n'ont pas été rapportées pour induire de douleur chez l'animal et sont bien tolérées sauf avec certaines souches pathogènes. Pour ces souches spécifiquement, le temps d'expérimentation sera réduit afin de minimiser la mortalité. Une perte (non attendue) du poids initial supérieure à 20% ainsi que des éventuels états de prostration ou isolement nous conduiront à sortir l'animal du protocole expérimental et à l'euthanasier. Nous envisageons d'utiliser de souris mâles, dont la littérature montre une vaste gamme de données du microbiote intestinal.

Les animaux colonisés sont ensuite examinés pour déterminer aussi la localisation des bactéries, la production des toxines et leur impact sur l'intestin, et dans le développement de pathologies (extra)digestives. Cette évaluation est nécessaire pour comprendre l'impact des entérobactéries sur la santé et dans les pathologies telles que les septicémies, le cancer, les maladies inflammatoires, l'obésité, le diabète et les diarrhées.

5923. Nos cellules ferment au sein de leur milieu intérieur ou cytosol plusieurs compartiments appelés organites, chacun spécialisé dans certaines fonctions cellulaires, par exemple le noyau qui contient le matériel génétique. Les organites spécialisés dans l'utilisation des ressources énergétiques sont les mitochondries. Un de leurs rôles est la dégradation oxydative (car elle

nécessite de l'oxygène) des substrats comme les glucides et lipides pour les convertir en énergie utilisable par la cellule. En cas de stress métabolique intense, la mitochondrie peut devenir le chef d'orchestre de la mort cellulaire. Concernant le cœur, l'importance des mitochondries est renforcée car ce muscle se contracte régulièrement, adapte sa force aux besoins de perfusion de l'organisme en consommant l'énergie produite par les mitochondries et car les cellules cardiaques ont un potentiel de renouvellement très faible voire nul.

Notre équipe a récemment identifié une protéine importante pour la régulation des fonctions mitochondriales. Par des outils génétiques et pharmacologiques originaux, nous avons montré, dans un modèle cellulaire, que la délétion ou l'inhibition de cette protéine limite le stress oxydant, le stress métabolique et la mort cellulaire. Ce rôle prometteur a également été observé, chez l'animal, dans un modèle murin de stress cardiaque, l'ischémie/reperfusion comparable à la situation clinique d'infarctus aigu traité par désobstruction de l'artère coronaire impliquée. Les objectifs de ce projet sont de compléter et d'étendre ces résultats par : 1) l'étude de l'implication de cette protéine dans un autre type de stress, le stress cardiaque métabolique tel qu'il est observé chez les individus obèses et diabétiques. En effet, la proportion d'individus touchés par l'obésité et le diabète est telle que la communauté médicale parle d'épidémie. Les complications cardiovasculaires sont les premières causes de mortalité chez ces patients. Il se développe entre autres une atteinte spécifique du muscle cardiaque nommée cardiomyopathie diabétique. 2) l'étude des rôles de cette protéine en fonction de son compartiment cellulaire c'est à dire de sa localisation mitochondriale ou cytosolique. En effet, une fois synthétisées, les protéines cellulaires sont adressées dans différents compartiments. Ce lieu de résidence, dépendant d'étiquette portée par la protéine, peut être modifié avec des outils génétiques. Cette étude sera réalisée dans 2 modèles de pathologie cardiaque, l'ischémie/reperfusion et la cardiomyopathie diabétique. Cette étude est la première étape d'un projet qui vise à identifier les partenaires moléculaires de la protéine d'intérêt dans le but d'interférer pharmacologiquement de manière spécifique avec ses rôles délétères.

Dans le cadre de ce projet, l'application de la règle des 3Rs se décline comme suit :

Remplacement : Seul un système intégré, l'animal, peut reproduire les différentes composantes des pathologies humaines mimées. En effet, l'insuffisance cardiaque, aboutissement d'un stress cardiaque, est la conséquence d'un processus de remodelage cardiaque induit par de multiples systèmes (immunitaires, neuronaux, endocriniens, rénaux, ...) dont les actions et leurs composantes ne peuvent être étudiées que chez l'animal. Le développement de l'obésité et du diabète induit par un régime riche en graisse n'est possible que chez l'animal. De plus l'utilisation d'un mammifère est un gage d'une meilleure transposition vers la clinique dont le besoin de nouveaux traitements est urgent. D'autre part, les outils génétiques dont nous disposons ne sont présents que chez la souris.

Ainsi, les expériences seront réalisées chez la souris en l'absence d'alternative possible.

Réduction : Lors des études, chaque animal est utilisé pour mesurer plusieurs caractéristiques (physiologiques, anatomiques, histologiques, biochimiques et moléculaires) du développement de la pathologie lorsque les techniques sont compatibles. Ainsi, le nombre d'animaux est réduit au nombre strictement nécessaire pour évaluer le critère de dysfonction cardiaque mais chaque animal est aussi utilisé pour des mesures complémentaires de caractérisation de la pathologie. Cette démarche permet d'une part de limiter le nombre des animaux à celui nécessaire pour répondre à la question scientifique et d'autre part d'éclairer sur les mécanismes et permettre de générer de nouvelles hypothèses grâce aux corrélations qui peuvent être faites entre les différentes mesures. Par ailleurs, ce projet est original ; l'implication de la protéine d'intérêt n'a jusqu'à présent jamais été testée dans ces pathologies.

Le projet original et comprenant 2 modèles de dysfonction cardiaque nécessite l'utilisation de 236 animaux dont 64 sont conditionnées aux résultats obtenus avec un premier lot.

Raffinement : Au cours des expérimentations, pour éviter anxiété ou douleur, des anesthésiques et des analgésiques sont utilisés lorsque c'est nécessaire. Il est à noter cependant, qu'en dehors d'une intervention chirurgicale unique de mise en place d'un des modèles envisagés, le développement de l'atteinte cardiaque n'est pas douloureux. Un suivi quotidien des animaux est mis en place et leur état de santé apparent est observé (comportement, état du pelage, isolement). De plus, le suivi régulier de la fonction cardiaque par imagerie permet d'estimer de manière objective et précoce (avant l'apparition de signes cliniques) les animaux nécessitant une attention particulière. Toute intervention jugée nécessaire (soins, euthanasie) est réalisée par un personnel compétent. Les conditions d'hébergement correspondent aux standards réglementaires et les animaux organisés en groupes sociaux ont un accès ad libitum à l'eau et à la nourriture.

5924. Ce projet a pour objectif d'évaluer la toxicité de formulations vaccinales produites à partir de la bactérie *Bordetella pertussis*. Le test qui sera mis en place, recommandé par l'OMS (WHO TRS 941, 2007, Annexe 6, A.3.3.6.), est le test de perte de poids chez la souris (Mouse Weight Gain test ou MWGT). Ce test permettra de caractériser différents lots de formulations produits à un stade Recherche.

Les lots à évaluer auront été au préalable sélectionnés comme ayant une faible toxicité dans un test *in vitro* sur des cellules en culture par le dosage de cytokines marqueurs de toxicité telles l'IL6 et l'IL1b. Seuls les lots avec une toxicité faible seront sélectionnés pour être injectés à l'animal.

Le test MWG consiste à relever le poids des souris, après administration par voie intrapéritonéale, intramusculaire, intraveineuse, sous-cutanée ou orale de formulations spécifiques. Il est décrit qu'une faible perte ou une absence de perte de poids est corrélée à une faible toxicité.

Aucune méthode *in vitro* alternative ne permet le remplacement des animaux utilisés pour étudier la toxicité éventuelle du produit injecté dans l'organisme. Le nombre d'animaux utilisés dans ces procédures (3000 souris au maximum sur 5 ans, pour l'évaluation complète de différentes formulations) est déterminé comme étant le minimum nécessaire pour obtenir des résultats scientifiquement et statistiquement fiables.

Aucun effet secondaire grave n'est attendu suite aux administrations, mais les animaux seront surveillés et observés tous les jours, et pesés régulièrement. Les procédures exécutées ne provoqueront qu'un inconfort passager et ne nécessiteront qu'une contention légère.

Durant l'étude, tout sera mis en œuvre pour minimiser le stress auquel les animaux sont soumis. Les animaux seront hébergés en groupe (sauf animaux incompatibles), et des éléments d'enrichissement du milieu seront mis à disposition : blocs à ronger, litière papier pour la confection de nids, etc....

5925. L'insuffisance cardiaque est une maladie fréquente (environ 500 000 personnes en France) et de mauvais pronostic malgré les progrès réalisés ces dernières années. En effet, même si les thérapeutiques disponibles améliorent les symptômes et diminuent la morbidité, elles n'ont pas d'impact réel sur l'évolution inéluctable de la maladie vers l'aggravation. Ceci souligne que les mécanismes lésionnels intimes des cellules contractiles du cœur, les cardiomyocytes (CM), conduisant à l'insuffisance cardiaque sont encore incomplètement compris. La mise en évidence récente de lésions spécifiques et très précoces de la membrane latérale du CM (disparition des mitochondries sub-sarcolemmales ou SSM) au décours de l'ischémie myocardique laisse supposer qu'il s'agit de lésions fondamentales favorisant la nécrose cellulaire et conduisant à terme à l'insuffisance cardiaque.

Les questions posées concernent 1/ la cinétique de disparition des SSM après ischémie: si elle est complète à 72h, ce phénomène débute sans doute immédiatement après l'installation de l'ischémie 2/ la répartition exacte des anomalies car la perte précoce des SSM semble survenir dans tous les compartiments cardiaques, y compris à distance de la zone ischémique, et 3/ la nature du processus conduisant à la disparition des SSM et ses conséquences sur les CM du tissu non ischémié : des résultats préliminaires après ischémie chez la souris suggèrent que les membranes des CM présentent des bourgeonnements formant des vésicules retrouvées dans l'espace intercellulaire et que les CM meurent progressivement par nécrose.

Il n'existe pas de moyen alternatif pour l'étude de l'impact de l'infarctus du myocarde sur l'architecture du tissu cardiaque, nous répondrons donc à ces questions chez 6 cohortes de 12 souris. Dans chaque cohorte 6 souris subiront sous anesthésie et analgésie une ischémie cardiaque par ligature coronaire et 6 souris auront uniquement une thoracotomie. Après euthanasie à différents temps après la chirurgie (30 min, 6h, 24h, 72h, 7 jours et 15 jours), le tissu cardiaque et le sang périphérique seront prélevés. La disparition des SSM et la distribution tissulaire des anomalies seront analysées par microscopie électronique. La mort des CM par nécrose sera quantifiée en étudiant la fluorescence liée à la pénétration cellulaire d'iodure de propidium (une injection 10 mg/kg ip réalisée une heure avant l'ischémie). Dans le sang, nous rechercherons la présence de vésicules issues des CM et qui pourraient servir de biomarqueur de l'insuffisance cardiaque.

La règle des 3R sera appliquée dans ce projet :

- L'organisation de l'expérience permet de réduire au maximum le nombre d'animaux. Ainsi, la taille initiale des 6 cohortes (12 animaux) pourra être portée à 18 (9 contrôles et 9 subissant une ischémie cardiaque) uniquement si besoin. Compte tenu du taux de mortalité liée à l'ischémie cardiaque (50%) et à la chirurgie dans le groupe contrôle (environ 15%), le nombre maximum d'animaux utilisés dans ce projet sera de 138.
- L'expérimentation fait l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux adaptés à l'expérience et des potentiels effets indésirables des procédures sur leur état de santé.

5926. Le syndrome d'apnées-hypopnées obstructives du sommeil (SAHOS) se caractérise par la survenue, pendant le sommeil, d'épisodes anormalement fréquents d'interruptions de la ventilation (apnées), ou de réductions significatives de la ventilation (hypopnées). Il est lié à un collapsus répété des voies aériennes supérieures au cours du sommeil. Les épisodes d'apnées et d'hypopnées entraînent une hypoxémie et des micro-éveils.

Les conséquences du SAHOS sont nombreuses pour le patient. Elles s'expriment sur le court-terme et sur le long-terme.

Les manifestations sur le court-terme sont les suivantes : somnolence diurne, baisse de vigilance, difficulté à conduire (risques d'accidents de la route), difficulté à exécuter des tâches (risques d'accidents du travail), problèmes de mémoire et de concentration, difficultés d'apprentissage (particulièrement chez les enfants), troubles de l'humeur. Au final, il y a une altération de la qualité de vie du patient.

Le SAHOS entraîne également des conséquences sur le long-terme : un lien entre SAHOS et morbi-mortalité cardiovasculaire a été exploré par plusieurs études de cohorte.

La ventilation nasale par pression positive continue (PPC) est considérée comme le traitement de référence du SAHOS. Près de 490 000 patients ont bénéficié d'une PPC en 2012 en France (doublement du nombre de patients traités depuis 2006). A ce jour un nombre important de patients arrêtent le traitement par PPC conséquence de l'inconfort du système actuel et du bruit généré par les turbine et le masque de respiration.

Ce projet vise à développer un traitement non invasif de l'apnée du sommeil à base d'ondes acoustiques basses fréquences. Ce traitement repose sur la réalisation d'un dispositif en rupture totale avec les dispositifs actuellement commercialisés.

L'objectif est d'améliorer le confort du traitement en remplaçant le masque de réparation par un collier vibrant, réduisant ainsi l'inconfort au niveau de la bouche et le nez, et supprimant le bruit.

Les résultats attendus sont de :

- Valider un nouveau dispositif de traitement du SAHOS avec des vibrations basses fréquences, permettant ainsi de lever l'obstruction de voies aériennes supérieures et d'augmenter le débit respiratoire.
- Eliminer l'inconfort des dispositifs actuels, augmentant ainsi le nombre de patients éligibles à un traitement.
- Réduire l'impact économique de ces traitements

Ce projet utilise le modèle animal porcin et huit porcs maximum seront utilisés afin d'atteindre les objectifs fixés.

Ce nombre d'animaux a été réduit au maximum sans compromettre l'interprétation des résultats. La faible invasivité du traitement testé, une surveillance adaptée des animaux et une définition précise des points limites permettent une classification des procédures expérimentales en classe légère.

5927. La mise en évidence de biomarqueurs sanguins pourra permettre une discrimination plus précoce entre les patients répondeurs et réfractaires à l'efficacité des traitements anticancéreux. Nous venons de breveter et publier une nouvelle classe de biomarqueurs sanguins, dosable directement pendant la radiothérapie. Dans une étude clinique de phase II, l'augmentation de la céramide plasmique, un sphingolipide pro-apoptotique, a été corrélée pendant la radiothérapie avec la régression de métastases hépatiques ou pulmonaires observée plus tardivement par imagerie médicale.

Nos résultats prometteurs peuvent permettre de faire évoluer la pratique clinique des oncologues en adaptant la dose de radiation ou en réorientant les patients vers d'autres traitements en fonction de leur réponse. Suite à ces premiers résultats, nous devons mieux comprendre les mécanismes de sécrétion de ces biomarqueurs en fonction de la dose de rayonnements utilisée. Ceci n'étant pas possible lors d'études cliniques, nous proposons de transplanter des tumeurs cérébrales L9 dans 140 rats de type Fischer CDFTM. Les tumeurs engendrées seront irradiées à des doses utilisées en clinique (de 2 à 20 Gy) et des prélèvements de sang seront réalisés régulièrement pendant 15 jours afin de doser ces sphingolipides. Ces travaux suivent la règle des 3 R en nécessitant un nombre limité de rats, en utilisant des points limites précis (nombre défini de prélèvements sanguins à des temps donnés, suivi du volume tumoral sur moins de 3 mois) et ne peuvent être remplacés par des études sur un modèle *in vitro*. Leur application clinique est importante car ces travaux permettront de déterminer la validité de cette nouvelle classe de biomarqueurs sphingolipidiques et son application aux nouveaux protocoles de radiothérapie.

5928. Ces dernières années, la thoracoscopie s'est développée comme la voie d'abord de première intention dans la prise en charge des lésions pulmonaires au sein des équipes de chirurgie thoracique pédiatrique et adulte, du fait d'une morbidité considérablement moindre en comparaison à la voie d'abord classique, par thoracotomie. L'utilisation de la chirurgie mini-invasive reste cependant limitée dans le traitement des lésions parenchymateuses profondes par l'incapacité à localiser ses lésions en per opératoire. La prise en charge de ces lésions, qu'elles soient tumorales ou malformatives, nécessite le recours à la thoracotomie pour effectuer une palpation parenchymateuse ou d'effectuer une résection anatomique (lobectomie ou segmentectomie) emportant une quantité de parenchyme sain plus importante que nécessaire.

L'utilisation de l'échographie pulmonaire endoscopique per opératoire est une des techniques qui pourrait permettre de guider le geste chirurgical en thoracoscopie et ainsi effectuer une chirurgie mini-invasive d'épargne pulmonaire. Cette technique présente l'avantage d'être peu voire non morbide et est la seule technologie utilisée en per opératoire à avoir montré son efficacité dans plusieurs études internationales. Pour autant, la faible puissance de ces études ne peut en faire une technique de référence.

L'objectif principal est de montrer que l'échographie per opératoire est une technique fiable et d'efficacité similaire à la palpation parenchymateuse dans le repérage des lésions pulmonaires profondes, non visibles à l'œil nu.

Les objectifs secondaires sont les suivants :

- Définir les conditions idéales pour obtenir une image échographique de qualité sur laquelle pourra s'appuyer une décision thérapeutique
- Concevoir un modèle animal reproductible
- Contribuer au développement d'une sonde échographique endoscopique de 5 mm de diamètre pour permettre son utilisation en thoracoscopie pédiatrique

Nous réaliserons une étude expérimentale sur animal vivant comparant 2 techniques dans le repérage de nodules profonds : l'échographie pulmonaire per opératoire et la palpation parenchymateuse. Le critère de jugement principal sera le nombre de lésions mises en évidence. La précision des informations apportées, la durée de chaque procédure et l'existence d'éventuels effets secondaires seront également évalués.

Cette étude inclura 8 porcs au maximum et se décomposera en 2 phases.

Une phase de faisabilité sera conduite sur 3 porcs maximum afin de tester le protocole chirurgical et anesthésique et de s'assurer de sa bonne tolérance. L'efficacité de l'échographie pulmonaire, le protocole de création des lésions (développé sur modèle *ex vivo*) et les conditions nécessaires à son utilisation devront là aussi être confirmées

Après validation de sa faisabilité, une étude sera réalisée sur 5 porcs afin de comparer en aveugle l'efficacité de l'échographie pulmonaire et celle de la palpation parenchymateuse dans la détection de lésions pulmonaires profondes.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum sans compromettre l'interprétation des résultats. La mise en place d'une étude de faisabilité préliminaire, une surveillance adaptée des animaux durant les procédures, leur déroulement sous anesthésie générale et l'euthanasie de chaque animal à la fin de la procédure permettent de réduire au minimum l'impact de ces procédures sur les animaux.

5929. La chirurgie reste la plupart du temps, le seul moyen curatif d'un cancer. Les progrès des techniques chirurgicales et des radio-chimiothérapies ont permis d'élargir les indications opératoires au prix d'un geste de plus en plus fréquent.

Les adhérences post-opératoires sont la cause de complication la plus fréquente à long terme. Cela peut engendrer des douleurs chroniques, une infertilité chez les femmes, des occlusions intestinales impliquant un risque de ré-intervention et l'augmentation de la morbidité liée. Cela affecte la qualité de vie de millions de personnes et cause un surcoût lié aux soins de plus de 2 MD\$ par an rien qu'aux USA.

Un nouveau dispositif a été développé pour agir comme une barrière anti-adhésion intrapéritonéale résorbable. Ce nouveau dispositif peut être une arme de plus contre le fléau causé par les adhérences postopératoires.

Des tests *in-vitro* ont été réalisés et il est nécessaire à ce stade de procéder à une évaluation *in-vivo* du produit sur un modèle chirurgical afin de démontrer l'innocuité et le potentiel protecteur de ce produit. Cette étude, est une étape fondamentale qui permettra de valider la pertinence du dispositif étudié en conditions chirurgicales avant d'envisager de poursuivre son développement.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'efficacité et l'innocuité du produit au cours d'une opération chirurgicale. Le produit est administré à une partie des animaux, l'autre partie des animaux ne recevant pas le produit et servant à comparer l'efficacité (observations cliniques, macroscopiques, développement des adhérences et analyses histologiques).

La conception de ce projet (nombre d'animaux, doses sélectionnées et voies d'administrations) est basée sur les informations disponibles issues des études *in vitro* et *in vivo* précédentes, des données bibliographiques ainsi que sur l'utilisation clinique ultérieure prévue.

Toutes les précautions seront prises pour réduire au minimum la souffrance et le stress des animaux tout au long de l'essai.

Grâce à une bonne standardisation des essais le nombre d'animaux est optimisé tout en évitant de compromettre l'objectif du projet. Ainsi, un total de 12 lapins sera utilisé au cours du projet.

5930. La douleur aiguë est un processus physiologique nécessaire à la survie. Lorsqu'elle devient chronique ou persistante, à la suite d'une inflammation (douleur inflammatoire) ou d'une lésion nerveuse (douleur neuropathique), la douleur n'offre plus aucun avantage mais provoque au contraire détresse et souffrance. Les traitements disponibles ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Il faut donc découvrir de nouveaux médicaments, et pour ce faire, étudier les mécanismes responsables d'une douleur chronique. L'un des symptômes douloureux les plus fréquents est l'allodynie mécanique.

Au cours des dernières années, notre connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires de la douleur s'est considérablement accrue. Pourtant, aucune avancée thérapeutique majeure n'est intervenue. Une des raisons à cet échec est qu'il n'y a pas une mais des douleurs. En effet, qu'elles soient inflammatoires ou neuropathiques, les douleurs chroniques se manifestent par plusieurs symptômes : douleurs spontanées, continues ou paroxystiques, et douleurs provoquées par des stimulations normalement non douloureuses (allodynie) ou normalement déjà douloureuses (exagération de la douleur ou hyperalgésie). Chacun de ces symptômes dépend de mécanismes distincts. Aussi, un médicament efficace sur les douleurs spontanées ne le sera pas nécessairement, par exemple, sur l'allodynie et inversement. D'où la nécessité de traitements spécifiques pour chacun de ces symptômes. Avec les douleurs spontanées et l'hyperalgésie, l'allodynie fait partie des symptômes cliniques fréquemment rencontré à la suite d'une inflammation ou une lésion du système nerveux périphérique ou central.

Lors de ce projet, nous nous intéresseront plus particulièrement à la douleur neuropathique. C'est une douleur liée à une lésion ou une maladie affectant le système somato-sensoriel. L'atteinte du système somato-sensoriel peut survenir dans un contexte neurologique évident (douleur survenant après un zona, neuropathie diabétique douloureuse, douleur central survenant après un accident vasculaire cérébral...). Elle survient aussi fréquemment dans un contexte non neurologique comme les suites post-opératoires, la chirurgie (même bénigne) étant souvent responsable de lésions nerveuses. La douleur neuropathique répond aux critères suivants :

- Autonomie douloureuse : c'est à dire douleur sans facteur nociceptif déclenchant ;

Celle-ci peut être lancinante (brûlure, pression) ou paroxystique, à type de décharge (« électrique » ou « en coup de poignard »)

- Allodynie : c'est à dire douleur déclenchée par des stimuli normalement non nociceptifs. Cliniquement, elle est définie comme statique quand elle est déclenchée par un simple toucher, et dynamique quand elle est déclenchée par un frottement Une allodynie déclenchée par le froid est également décrite.

- Hyperalgésie : c'est à dire sensation douloureuse exacerbée à un stimulus nociceptif. Ceci est possible pour les stimuli mécaniques ou thermiques, de façon variable selon le mécanisme.

Plusieurs modèles animaux de traumatismes sont utilisés pour reproduire la douleur neuropathique. Pour notre projet de recherche, nous effectuerons la ligature de nerf infra orbitaire droit chez le rat. Nous évaluerons l'allodynie mécanique statique à l'aide d'une stimulation avec un filament de von Frey et l'allodynie mécanique dynamique avec l'application de jets d'air dans la région des vibrisses.

On sait maintenant que les informations tactiles sont transmises des couches profondes du SnC/corne dorsale aux neurones de la couche I via un circuit exciteur polysynaptique. Ce circuit comporte des interneurons particuliers de la couche III exprimant la sous-unité gamma de la protéine kinase C (PKC γ). Les neurones PKC γ jouent un rôle clé dans l'allodynie mécanique : l'inactivation, génétique ou pharmacologique, de la PKC γ supprime et son activation, au contraire, produit une allodynie. Cependant, quel est le rôle exact de la PKC γ ? Est-elle nécessaire à l'induction et/ou au maintien des changements neuronaux (plasticité neuronale) dans le SnC/corne dorsale responsables de l'allodynie mécanique ? Pour cela, nous utiliserons un antagoniste spécifique de la PKC γ afin d'évaluer son rôle dans l'allodynie mécanique dans le cadre de la douleur neuropathique.

Aucune méthode alternative ne permet de remplacer ce protocole. Il est nécessaire de réaliser ces études *in vivo*, car l'intégration de la douleur implique de nombreuses régions du système nerveux central et périphérique (fibres). Il est donc nécessaire de réaliser les observations comportementales chez l'animal. Des études comportementales sont nécessaires pour mettre en évidence l'installation de l'allodynie mécanique. Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum. Ce nombre tient compte des animaux qui ne répondraient pas aux tests mais reste suffisant pour détecter un effet significatif entre traitements (analyse de variance et tests post hoc paramétriques ou non). Les animaux seront stabulés dans des pièces ventilées, thermorégulées (22 ± 1 °C) avec hygrométrie contrôlée et accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*). Pour les études de

comportement, les animaux seront soumis à des séances d'habituation pendant 4 jours avant l'expérience afin de diminuer les stress liés à un nouvel environnement et à la manipulation par l'expérimentateur. Les jours suivants la ligature, l'animal sera surveillé (alimentation, boisson et mouvement) pour s'assurer de son bon état sanitaire. Si un changement de comportement (réduction d'activité, pelage mal entretenu, animal prostré dans un coin de la cage, perte de poids) est observé, l'animal sera euthanasié. La douleur sera diminuée à son maximum lors de l'évaluation de la sensibilité cutanée car les stimulations seront de faible intensité et de courte durée.

Au total 28 rats seront utilisés dans ce projet. Deux lots de 7 rats seront utilisés dans une étude pilote afin de valider le modèle et le temps d'installation de l'allodynie mécanique suite à la ligature, dont un contrôle sans ligature. Deux lots de 7 rats seront utilisés dans l'étude complète pour évaluer l'action de l'antagoniste de la PKC γ , dont un lot recevra le véhicule. Ils seront mis à mort à la fin des procédures par overdose d'anesthésique.

5931. Tous les individus ne sont pas égaux devant la consommation d'alcool. 10 à 20 % des personnes commençant à consommer de l'alcool, perdurent ou amplifient ce comportement en dépit des graves répercussions. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, l'alcool est responsable de 3,3 millions de morts chaque année. L'identification des personnes à risques chez qui une consommation d'alcool entraînera une addiction est une voie de recherche pour prévenir l'alcoolisme, en s'attachant tout particulièrement aux facteurs génétiques. Un travail récent a montré qu'une sensibilisation infraliminaire à l'alcool peut être déjà suffisante pour entraîner la dépendance. L'objectif du projet est d'évaluer sur une douzaine de lignées de souris consanguines leur prédisposition à l'addiction avec une unique dose infraliminaire. A terme, ce travail permettra de sélectionner des lignées d'intérêts dans le but d'identifier les gènes sous-jacents à cette prédisposition. On ne peut pas remplacer la souris par des modèles computationnels ou *in vitro* dans ce projet car le test met en jeu des processus d'apprentissage et de préférence de position dans un test comportement moteur. L'emploi de la souris est motivé pour les raisons suivantes : 1/ la souris est un bon compromis entre sa capacité d'apprentissage et le degré de supériorité de l'espèce ; 2/ ce travail suit un travail initial réalisé sur la souris ; 3/ ce travail vise à terme à identifier des gènes et l'espèce souris est la plus appropriée pour les travaux à visée génétique. La taille de l'effet attendu est telle qu'un nombre de 8 souris par sexe et par lignée est suffisant pour caractériser la variabilité interlignée en tenant compte d'un possible effet du sexe.

Nous testerons 16 souris par lignée et nous testerons 12 lignées de souris consanguines, soit un total de 192 souris, c'est le nombre nécessaire d'animaux pour obtenir des résultats tangibles. Lors de ce projet, il n'est pas attendu de souffrance de l'animal autre que celle possiblement induite par les injections intrapéritonéales d'alcool.

5932. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la première cause de morbidité et la deuxième cause de mortalité chez l'homme dans les pays industrialisés. Le tribut à payer à cette pathologie reste très lourd : 10 à 12 % de l'ensemble des décès après 65 ans ainsi que des séquelles physiques, cognitives ou psychologiques chez plus de la moitié des victimes. En conséquence, le retentissement socio-économique des AVC est très important. La majorité (80 %) des AVC sont de type ischémique, causés par une occlusion artérielle. En dépit des efforts de recherche expérimentale et clinique déployés dans ce domaine et hormis la thrombolyse dont l'efficacité sur une grande échelle reste discutée, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de thérapeutique contre cette pathologie en clinique.

Durant les 30 dernières années, plusieurs modèles animaux ont été développés, essentiellement chez les rongeurs, pour étudier la physiopathologie et la thérapie de l'ischémie cérébrale. Un grand nombre d'interventions thérapeutiques contre l'ischémie cérébrale se sont ainsi montrées efficaces chez ces espèces. Cependant, chez l'Homme, ces interventions se sont révélées sans effet bénéfique. Ainsi, des comités d'experts ont recommandé l'utilisation de modèles animaux se rapprochant le plus possible de la clinique humaine, notamment en utilisant des espèces animales plus proches, phylogénétiquement, à l'Homme. Dans ce contexte, nous avons développé au laboratoire un modèle original d'ischémie cérébrale par voie intraluminale chez le marmouset (*Callithrix jacchus*) dans lequel nous souhaitons tester l'efficacité d'une intervention thérapeutique ayant montrée des effets bénéfiques chez le rongeur. Cette étape dans le développement de cette stratégie thérapeutique est nécessaire avant de réaliser des tests chez le patient.

Dans tout le projet, la règle des 3R sera suivie et les conditions de travail et d'hébergement seront raffinées. Le personnel participant au projet est formé et les inspections du bien-être des animaux seront réalisées quotidiennement.

Le nombre estimé d'animaux utilisés est de 20 marmousets d'élevage; ce nombre correspond au minimum pour permettre une puissance de résultats suffisante pour réaliser des statistiques concluantes. Le projet sera également basé sur l'utilisation de techniques d'investigation non invasives (imagerie IRM, tests comportementaux).

5933. Ce protocole d'expérimentation animale a pour but de valider de nouvelles géométries de lésions produites dans le foie par ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU en anglais). Le but est d'enrichir le panel thérapeutique mis à disposition des chirurgiens lors des traitements des métastases hépatiques par HIFU. Ces nouvelles lésions doivent permettre d'épargner davantage de foie sain par rapport aux traitements réalisés actuellement sans compromettre l'efficacité de destruction tissulaire. Pour cela, quatre ablations HIFU de volumes et de positions différents seront à valider tout en assurant des marges de sécurité d'au moins 5 mm dans toutes les directions. Le premier volume d'ablation doit permettre le traitement, d'une métastase située à la surface du foie de 20 mm de diamètre en une seule exposition ultrasonore. Deux autres volumes d'ablation devront permettre de traiter une métastase de 15 mm de diamètre situés à des profondeurs comprises entre 5 et 20 mm. Le dernier volume lésionnel devra permettre de traiter une métastase de 10 mm de diamètre située à des profondeurs comprises entre 12 et 22 mm.

24 lésions (6 par séquence) seront nécessaires pour s'assurer de la reproductibilité des résultats.

S'agissant d'études à visée chirurgicale, il est nécessaire de pouvoir valider ces lésions sur modèle animal avant de pouvoir les reproduire chez les patients.

D'après notre expérience, il devrait être possible de réaliser entre trois et quatre lésions HIFU par animal. En conséquence 8 porcs seront nécessaires au maximum mais l'étude sera stoppée dès que le nombre de lésions nécessaires sera atteint.

Enfin, toutes les mesures seront prises pour réduire au maximum la souffrance animale dans la mesure où les expérimentations se dérouleront selon des procédures similaires à celles utilisées pour les interventions chez l'Homme.

5934. Le microbiote intestinal (ensemble des micro-organismes - bactéries, virus, parasites, champignons non pathogènes, dits commensaux présents dans l'intestin) joue un rôle majeur dans le fonctionnement de l'organisme. Néanmoins, il est également considéré comme un réservoir de pathogènes opportunistes, appelés pathobiontes. Les pathobiontes sont des bactéries inoffensives chez un individu sain qui deviennent pathogènes suite à des changements au sein du microbiote intestinal ou dysbiose. *Klebsiella pneumoniae* (Kp) est une bactérie naturellement présente dans le tube digestif et dans l'appareil respiratoire de l'homme et des animaux en tant que commensale. Kp est également un pathogène opportuniste important, en particulier chez les personnes immunodéprimées. L'émergence de souches multi-résistantes aux antibiotiques est une préoccupation majeure dans notre société. En effet, ces bactéries multi-résistantes et notamment Kp ont la propriété de résister à la majeure partie sinon toutes les molécules disponibles en thérapeutique humaine. En plus du surcote important pour les établissements de soin, une hausse de la mortalité est associée à ces microorganismes. De récentes études ont montré que la diffusion de Kp multi-résistantes est liée à la diffusion de certaines souches de cette espèce à haut pouvoir épidémique. L'exemple-type est la diffusion de la carbapénémase KPC liée à la souche Kp-ST258. Les carbapénémases sont des enzymes ayant une activité hydrolytique (de dégradation) vis à vis des carbapénèmes, une classe d'antibiotiques. Notre projet sera donc centré sur l'étude de cette souche.

Les recherches actuelles de notre équipe portent sur l'étude de la pathogénie d'*Enterococcus faecalis*, un autre pathobionte intestinal présentant des similitudes avec Kp en termes de physiopathologie et de conditions d'infection. Nous avons développé pour *E. faecalis* des modèles murins permettant d'analyser les étapes de colonisation et de traversée de la barrière intestinale par la bactérie. Ces modèles seront appliqués à Kp afin de caractériser les mécanismes communs aux 2 pathobiontes et d'identifier les particularités de chaque espèce. L'objectif principal de la présente demande concerne l'étude de l'étape de colonisation par Kp, en particulier des mécanismes de régulation mis en place par Kp lors de la colonisation intestinale de souris axéniques c'est à dire exemptes de microbiote. Nos travaux seront centrés sur l'impact de 2 traitements antibiotiques sur l'émergence, l'adaptation et le développement de Kp.

Deux souches de Kp (Kp-ST258 et de Kp-control) seront testées. Les 328 souris impliquées dans le projet seront inoculées par l'une ou l'autre de ces deux souches de Kp par gavage-oro-gastrique. Cet acte sera réalisé par du personnel qualifié et expérimenté, Les deux lots expérimentaux (2 x112 souris) recevront chacun l'un des deux antibiotiques testés à raison d'une injection quotidienne sous cutanée pendant 3 jours. Le lot témoin (102 souris) ne recevra pas d'antibiotique. Des prélèvements de fèces seront effectués pour réaliser l'étude de l'implantation et de la persistance des souches par numération de Kp-ST258 et de Kp-control dans les fèces des souris pendant la durée de l'étude (21 jours). A la fin de l'étude, les 328 souris seront euthanasiées et différents organes seront prélevés afin d'étudier la dissémination de Kp dans l'organisme.

L'utilisation d'un modèle murin gnotobiotique (à microbiote connu et contrôlé, dans notre étude utilisant uniquement de la bactérie Kp qui sera inoculée aux souris) permettra d'intégrer la complexité des interactions entre l'hôte et un pathobionte issu du microbiote dans un contexte où le pathobionte peut être isolé. A ce jour, aucune approche *in vitro* n'est disponible pour remplacer ce type de modèle et « mimer » ces interactions. Néanmoins, plusieurs expériences seront réalisées *in vitro* en amont du modèle murin pour définir les conditions les plus pertinentes pour la réalisation des expérimentations chez la souris.

Afin de réduire le nombre d'animaux impliqués dans l'étude, nous porterons une attention particulière à la validation du modèle et à l'établissement des conditions expérimentales. Nous veillerons à ce que la réalisation de ce projet soit conforme aux exigences de raffinement liées à l'expérimentation animale. Les souris seront hébergées en petit nombre, ne seront pas soumises à des périodes de jeûne pendant la durée de l'expérience et seront inoculées avec des doses sous létales. Kp est un pathogène opportuniste, il est très peu probable que dans nos conditions expérimentales un point limite soit atteint. Néanmoins, nous porterons une attention quotidienne à la surveillance des souris. Le cas échéant, si les points limites sont atteints, poil ébouriffé (ou hérissé), yeux clos, léthargie et dos courbé les animaux concernés seront sortis de l'étude.

5935. Le but de la présente saisine est de déterminer la toxicité osseuse de composés administrés par voies parentérales ou orale chez le rongeur.

Plus précisément, les principes actifs seront appliqués selon les schémas thérapeutiques spécifiques aux principes actifs étudiés. De même, un produit de référence pourra être utilisé et choisit pour correspondre au mieux aux principes actifs étudiés. Il sera appliqué selon le schéma thérapeutique spécifique au produit de référence choisit. Des prélèvements sanguins peuvent être réalisés en cours des protocoles à raison d'un prélèvement par semaine au maximum afin de mesurer le taux de principe actif dans le sang et d'évaluer la quantité de marqueurs du remodelage osseux et/ou du métabolisme phosphocalcique (i.e. CTX-I, PINP, Calcium, Phosphate,...). La durée des protocoles varie en fonction des procédures et des principes actifs étudiés allant de 15 jours à 6 mois. Les animaux peuvent être euthanasiés à différents points de cinétiques au cours du protocole, déterminés selon la nature des principes actifs étudiés. A chaque euthanasie, une analyse macroscopique des animaux euthanasiés et des os long (tibias + fémurs) à prélever sera réalisée. Une analyse histopathologique sera réalisée sur les os long afin d'observer et de scorer les éventuelles lésions histologiques. En parallèle, une analyse scanner des os longs permettra d'évaluer les lésions au niveau de l'architecture

osseuse et de mettre en évidence une éventuelle perte osseuse ou la présence d'anomalies osseuses telles que des ostéophytes par exemples.

Ces études s'incluront dans le panel d'études toxicologiques précliniques préliminaires ou concomitantes aux études de toxicologies cliniques.

Un total de 2000 animaux (rats ou souris) maximum sera susceptible d'être utilisé sur les 5 ans du projet.

Quelle que soit la procédure, les animaux sont suivis cliniquement tout au long du protocole.

Ces études seront menées dans le respect de la règle des 3R. Les principes actifs sont généralement testés *in vitro* au préalable mais le passage chez l'animal reste indispensable afin de vérifier les interactions avec l'organisme et notamment le système osseux (Remplacement). Le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'avoir des résultats exploitables, permettant de conclure de manière certaine, sans nécessité la réalisation d'une deuxième étude pour confirmer les résultats obtenus au cours du présent projet (Réduction). Les points limites ont été définis afin d'éviter toute souffrance inutile. Si les points limites sont atteints, les animaux concernés seront exclus du protocole et euthanasiés.

Les animaux seront stabulés en groupe dans des locaux adaptés (Raffinement) permettant de maintenir les animaux dans un environnement adéquat et n'induisant pas de stress. Ils seront suivis quotidiennement afin de détecter tout signe de détresse et/ou de douleur. Si tel est le cas un traitement médicamenteux choisit selon la nature de la détresse, sera appliqué.

5936. Depuis toujours l'homme a observé les animaux car sa survie dépendait de la connaissance de leur comportement. Aujourd'hui, l'étude comportementale d'espèces protégées aide les biologistes de la conservation à réduire les dégâts involontaires causés aux espèces. De plus, la meilleure connaissance du comportement animal permet de limiter la perte de temps et d'argent due à la mise en œuvre de plans de conservation mal adaptés. Notre projet propose d'étudier les mécanismes par lesquels des signaux et des indices parviennent à un individu receveur et en modifient le comportement. En effet ces signaux et indices pourraient être involontairement changés ou brouillés à cause des actions de l'homme (des bons exemples sont représentés par les changements climatiques ou l'introduction d'organismes exogènes). Les signaux proviennent d'autres individus et interviennent dans la communication, notamment dans la formation des couples (sélection sexuelle). Les indices proviennent de l'environnement et interviennent dans la perception du milieu et sont notamment impliqués dans la navigation et le mouvement dans l'espace. Les signaux sont ces impliqués dans la communication entre individus (exemple communication acoustique ou olfactive).

Les modèles biologiques concernés par notre projet sont essentiellement les pétrels nichant dans des terriers souterrains et les manchots royaux. L'originalité de ce projet réside dans le fait que les différentes modalités sensorielles (olfaction, audition, vision), impliquées dans la perception des signaux et indices externes, seront abordées séparément mais aussi en synergie. Ce volet concerne les travaux prévus chez les pétrels, le volet concernant les manchots sera présenté comme demande séparé. S'agissant d'études comportementales sur la faune sauvage évoluant dans leur milieu naturel, il n'est pas possible de passer à des modèles *in vitro* ou *in silico*. Les exigences de remplacements, réduction et raffinement ont été prises en compte, sachant que les modèles d'étude sont des espèces sauvages. Pendant les 4 ans du projet 75 pétrels bleus par an et 20 prions de la désolation par an seront soumis à des actes identifiés comme « expérimentation animale ». Le nombre total d'animaux utilisés (420) est réduit au minimum permettant une analyse statistique adéquate. Nos études visent à obtenir des réponses comportementales naturelles, autrement dit, non biaisées par le stress ou la manipulation. Par conséquent la manipulation de tous les sujets est rapide (15 min environ) et tout est mis en jeu pour que l'animal relâché soit dans un état qu'on pourrait définir comme « normal » c'est-à-dire, comme s'il n'avait pas été manipulé.

5937. Les insecticides néonicotinoïdes sont suspectés d'être à l'origine du déclin massif des populations d'insectes pollinisateurs, notamment les abeilles. L'Etat français vient de les interdire, après en avoir restreint drastiquement l'utilisation. Ces insecticides sont des molécules de synthèse qui exercent des effets neurotoxiques aigus en jouant le rôle d'agonistes des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine au niveau du système nerveux central des insectes. Cependant, ce type de récepteurs étant également présents dans les circuits cholinergiques centraux et périphériques du système nerveux de mammifères, il est envisageable que les néonicotinoïdes exercent également des effets délétères chez les mammifères. Plusieurs études *in vitro* suggèrent en effet ce type d'effets.

Nous avons montré au laboratoire que plusieurs néonicotinoïdes agissent en stimulant la sécrétion *in vitro* de catécholamines à partir de glandes médullo-surrénales de rat. Elles favorisent également cette sécrétion lorsqu'elle est induite par la nicotine. Il est bien établi que la synapse neuro-médullo-surrénaliennne est de nature cholinergique, avec un rôle majeur des récepteurs de type $3\beta 4$. Nous avons donc testé deux molécules néonicotinoïdes : la clothianidine et l'acétamipride sur ces récepteurs $3\beta 4$ de rat exprimés dans des ovocytes de xénope et nous avons montré qu'ils exercent un effet agoniste sur ces récepteurs, moins puissant et moins efficace que les agonistes de référence, acétylcholine et nicotine.

Le but du projet est de mettre en évidence les conséquences *in vivo* d'une intoxication aiguë chez le rat wistar male de 2 mois avec des insecticides néonicotinoïdes, de manière à évaluer leurs effets sur le circuit du stress. Nous envisageons de doser dans le sang la concentration en catécholamines de rats intoxiqués, de mesurer les conséquences des effets des néonicotinoïdes sur les réseaux cholinergiques périphériques, notamment la fonction cardiovasculaire (pression artérielle et rythme cardiaque). Nous administrerons à des rats des doses croissantes de néonicotinoïdes et évaluerons ces paramètres post-injection. Nous formulons l'hypothèse que ces insecticides agissent de manière chronique en perturbant le système neurovégétatif qui innerve les organes viscéraux et plus particulièrement la médullo-surrénale, le cœur et les vaisseaux. Ces perturbations pourraient se traduire par une modification du rythme cardiaque et de la pression artérielle des animaux intoxiqués.

Chaque animal est manipulé calmement afin de ne pas l'effrayer et régulièrement pour favoriser le contact avec l'expérimentateur. Les rats sont placés à 4 ou 3 par cage avec eau et aliment à volonté ainsi qu'un milieu d'enrichissement. Concernant le nombre d'animaux utilisés, les études de réactivité vasculaire précédentes montrent qu'il faut un minimum de 10 animaux par groupe pour aboutir à une significativité si une différence devait apparaître (analyse ANOVA 2 voies).

Nous appliquons la règle des 3 R:

REEMPLACER Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle *in vitro*,

REDUIRE Nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Le nombre d'animaux par groupe est de 10 car l'intoxication aiguë peut induire des décès.

RAFFINER Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 3 et au maximum par 4) suivant l'âge et le poids des animaux. Les cages sont enrichies par des jouets (rouleau sopalin, copeaux). Les animaux sont surveillés au quotidien par le personnel de l'animalerie et le poids est suivi 2 fois par semaine.

L'ensemble du projet nécessite d'utiliser 60 rats males wistar de 2 mois pour une durée de 3 ans avec deux séries d'animaux de 30 animaux chacune qui sont répartis en 3 groupes de 10.

5938. Les acides gras présents dans les matières grasses alimentaires servent à satisfaire non seulement une partie de nos dépenses énergétiques mais également nos besoins en acides gras essentiels que sont les acides gras polyinsaturés (AGPI). Il existe deux familles d'AGPI, respectivement nommés oméga 3 et oméga 6. Il est aujourd'hui bien admis que les AGPI présents dans notre alimentation, de par leur nature et leur abondance, influencent la santé de l'homme et jouent un rôle dans l'apparition d'un grand nombre de pathologies et notamment les maladies métaboliques comme l'obésité. Ainsi, la littérature montre qu'une consommation excessive d'oméga 6 aurait des effets plutôt négatifs pour la santé comparée à celle d'oméga 3 qui aurait des effets plutôt anti- bénéfiques.

Par ailleurs, de plus en plus d'études montrent que le microbiote intestinal est lui aussi impliqué dans le développement de ces maladies métaboliques. Notre hypothèse est que le microbiote intestinal contribue aux effets bénéfiques des oméga 3 sur la santé.

Pour tester cette hypothèse nous allons utiliser des souris génétiquement modifiées (*fat-1*), capables de transformer les oméga 6 en oméga 3, qui ne développent pas d'obésité lorsqu'on leur administre un régime riche en lipides. Afin de déterminer si la capacité à résister au développement de l'obésité peut être transmise via le microbiote, nous allons transférer le microbiote de ces souris *fat-1* à des souris conventionnelles C57Bl/6.

Quatre groupes de 12 souris receveuses (C57Bl/6 et *Fat-1*), et deux groupes de 12 souris donneuses (C57Bl/6 et *Fat-1*), seront nécessaires pour l'ensemble de l'expérimentation. Le microbiote de souris *fat-1* sera transplanté à des souris C57Bl/6 et *fat-1* qui recevront ensuite le régime riche en lipides ; et le microbiote de souris C57Bl/6 sera transplanté à des souris C57Bl/6 et *fat-1* qui recevront ensuite le régime riche en lipides.

Le seul traitement imposé aux souris est une alimentation riche en lipides. Elles seront pesées hebdomadairement et une étude de prise alimentaire sera effectuée. Durant l'expérimentation nous collecterons des fèces (défécation naturelle à la préhension de la souris). Une semaine avant l'euthanasie nous ferons un test de perméabilité intestinale : un produit inerte sera administré par gavage et nous collecterons du sang au niveau submandibulaire quatre heures plus tard. Le dernier jour avant l'euthanasie nous ferons un test de tolérance au glucose (mesure de la glycémie sanguine suite à l'administration par gavage d'une solution de glucose).

L'étude de la contribution du microbiote intestinal sur les effets protecteurs des oméga 3 sur l'obésité nécessite le recours à l'animal, en particulier pour des expériences de transplantations fécales (remplacement). Une étude statistique préalable a permis de réduire au plus juste le nombre d'animaux nécessaires au regard de nos objectifs (réduction). Chaque cage sera enrichie par ajout de sopalin, pour nicher (raffinement). Les gavages (microbiote, produit pour mesurer la perméabilité, glucose) seront réalisés par une personne formée et compétente réalisant ce geste depuis des années. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

Cette étude nécessitera un total de 72 animaux.

5939. Le projet vise à évaluer en laboratoire la tolérance et l'efficacité d'additifs alimentaires minéraux vétérinaires destinés aux volailles en répondant aux prescriptions de la réglementation européenne (European Food Safety Authority, technical guidance: Tolerance and efficacy studies in target animals). L'objectif est d'établir la marge de sécurité du produit étudié, et dans la mesure du possible, d'identifier les effets indésirables en cas de surdosage par rapport aux conditions d'utilisation prévues. Le projet répondant à des exigences réglementaires, il n'y a pas d'alternatives à l'utilisation d'animaux (espèce de destination du produit). Globalement, l'évaluation de l'innocuité générale passe par l'administration du produit vétérinaire aux volailles à différentes doses. Le choix de ces doses, s'il n'est pas guidé par des caractéristiques pharmacologiques et toxicologiques particulières du produit étudié, est indiqué dans la ligne directrice : 1 lot d'animaux contrôle négatif, 1 lot d'animaux traité à la dose maximale prévue, et un à deux lots d'animaux traités à des multiples de la dose maximale prévue (selon toxicité connue; par défaut, 10 fois la dose). Il est possible de comparer l'additif alimentaire à un additif de référence aux mêmes doses. Dans ce cas, le produit de référence est administré aux mêmes doses que le produit testé (plusieurs groupes témoins positifs). La durée de traitement pour ces groupes est fixée dans la ligne directrice (minimum 35 jours). L'évaluation de l'innocuité repose ensuite sur l'enregistrement sur animal vivant de différents critères révélateurs de potentiels effets indésirables du produit administré (examens cliniques des animaux, performances zootechniques, examens complémentaires sur prélèvements réguliers de sang). Un examen post-mortem est recommandé sur animaux morts pendant l'étude pour déceler d'éventuelles lésions macroscopiques et éventuellement

histologiques sur différents organes. Le minéral est dosé dans plusieurs tissus de l'animal, dont ceux susceptibles d'être consommés (muscle, reins, foie, peau et graisse), ainsi que dans les tissus dans lesquels le minéral est susceptible de s'accumuler. Le nombre d'unités statistiques (lots d'animaux) est fixé de manière à ce que la puissance statistique des évaluations atteigne 80%. Le nombre de lots d'animaux utilisés variera en fonction de l'additif alimentaire mais par défaut, il faut considérer en moyenne 6 lots de 12 animaux par groupe. A trois doses testées sur un produit test et un de référence, contre groupe témoin, le nombre d'animaux nécessaires à une étude sera fixé à 504 (7 groupes de 6 lots de 12 animaux). Considérant que le nombre moyen d'études envisagées par an est de 1 nous tablons sur un nombre « enveloppe » de 2520 animaux maximum sur une période de 5 ans. Les conditions d'hébergement des animaux doivent se rapprocher des conditions en élevage. Dans la mesure du possible, ces conditions pourront être modifiées pour les rendre plus adaptées aux besoins physiologiques des animaux et pour leur permettre d'exprimer le plus possible leur gamme normale de comportements. La contention des animaux vise à limiter au maximum le stress des animaux. Le bien-être des animaux est évalué quotidiennement par le personnel en charge des animaux : animaliers et vétérinaires.

5940. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les maladies cardiovasculaires sont à l'origine de 30% de la mortalité mondiale totale. Les causes de mortalité par maladies cardiovasculaires et accidents vasculaires cérébraux représentent à elles deux quatre décès sur cinq dans le monde. Il est possible de prévenir ce type de pathologies en intervenant sur les facteurs de risques (hypertension artérielle, diabète, obésité, dyslipidémie, tabagisme...). Ces maladies cardiovasculaires et ces facteurs de risque associés peuvent être étudiés au laboratoire grâce aux modèles précliniques chez l'animal qui vont permettre de comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'apparition de la maladie et de son évolution. Ainsi, l'identification de nouvelles cibles permettra de proposer aux patients de nouvelles thérapies.

Dans la plupart des projets de recherche, les tests réalisés en première intention concernent des lignées cellulaires. Mais dans le domaine cardiovasculaire, les lignées disponibles ne possèdent pas toutes les voies de signalisation des cellules primaires. En effet, ces lignées présentent des modifications phénotypiques comme une capacité accrue de prolifération associée ou non à des changements de structure, de connexions cellulaires ou de voies métaboliques. Ainsi, on comprend bien l'importance de travailler sur les cellules primaires puis, sur des cellules maintenues dans leur environnement tissulaire (analyse des communications intercellulaires) et enfin, avec un organe (cœur et rein) dans lesquels différents types cellulaires doivent œuvrer pour lui permettre d'assurer sa fonction. Dans le domaine cardiovasculaire, des études sur des cellules primaires, tissus et organes isolés sont ainsi indispensables pour réussir à améliorer la prise en charge des patients atteints de maladie cardiovasculaire. L'efficacité de candidats médicaments est tout d'abord évaluée à l'issue d'une série de tests *in vitro* en réalisant des analyses biochimiques, des tests cellulaires ou des expériences sur organes isolés. Ces études *in vitro* seront ensuite suivies de d'évaluations pharmacologiques *in vivo* dans des organismes entiers pathologiques ou sains.

Les expériences de ce projet vont permettre de vérifier non seulement l'efficacité de la molécule sur sa cible, mais également son innocuité.

Ce projet peut être réalisé sur plusieurs espèces : souris, rat, cobaye et lapin.

Les espèces peuvent, pour certaines (rats et souris en particulier) et selon les besoins expérimentaux, présenter des facteurs de risque génétiques (animaux génétiquement altérés) tels qu'hypertension, diabète, obésité ou athérosclérose reproduisant tout ou partie des pathologies humaines.

L'espèce, la souche et l'âge sont sélectionnés en fonction de la cible, du type de mesures à effectuer et/ou de la pathologie à étudier.

La souris offre la possibilité de déléter ou de surexprimer des gènes d'intérêt, ce qui en fait un excellent modèle pour l'étude des pathologies cardiovasculaires.

Le rat est également un excellent modèle pour l'étude des pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension ou le diabète. Modèle de criblage facile à utiliser et bien décrit dans la littérature. Il est de ce fait largement étudié. Il sera privilégié pour les expériences nécessitant la préparation de cellules cardiaques, de la réactivité vasculaire, rénale et cardiaque, la souris pour la réactivité vasculaire ou cardiaque.

Le cobaye est l'espèce qui possède un couplage excitation-contraction cardiaque le plus proche de l'homme le rendant indispensable pour l'évaluation des effets de produits sur l'activité électrique cardiaque.

Le lapin, lagomorphe, présente un métabolisme des lipides, glucides et protides différent de celui des rongeurs. La taille de cet animal permet l'accès à divers organes en quantité suffisante pour tester, en parallèle, de nombreux produits ce qui pour de plus petits animaux tels que le rat, le cobaye et la souris nécessite de grandes cohortes.

Tous les animaux bénéficient de conditions d'hébergement enrichies spécifiquement pour chaque espèce, favorables à l'expression de leurs instincts (nidification, jeu, fouissage, ...) et adaptées à leurs besoins.

Sur 5 ans, il nécessitera l'utilisation 150 lapins, 300 cobayes, 3000 souris et de 7500 rats.

5941. Ce projet a pour objectif l'évaluation de l'activité des immunosérums produits sur animaux et destinés à être utilisés chez l'homme, selon les normes d'efficacité / activité, d'innocuité et de sécurité réglementaire. Les immunosérums sont utilisés pour le traitement de personnes exposés à la rage, au tétanos et à certains venins et sont dans la plupart des cas « life saving products » c'est-à-dire permettant de sauver des vies. Les tests d'activité incluent également la fabrication et la calibration/validation des solutions antigéniques utilisées pour la séroneutralisation des sérums, en accord avec les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).

Ces tests d'activité consistent à administrer à des souris le sérum testé, préalablement mélangé à une quantité fixe d'une solution antigénique (virus, venin, toxine), afin de réaliser une séroneutralisation *in vitro*. Après administration du mélange, les animaux sont ensuite hébergés pendant la période nécessaire pour observer les effets cliniques afin de déterminer le niveau de protection des animaux contre les effets de l'antigène.

Ce projet représente l'ensemble des essais menés systématiquement sur chaque lot de produits fabriqués. Suite à l'injection du mélange séroneutralisé les animaux peuvent présenter des signes cliniques. Dans certains cas des points limites spécifiques sont définis à partir desquelles les animaux sont euthanasiés de façon anticipée. La prise en charge d'un animal présentant des signes cliniques de maladie non attendus est réalisée sous la responsabilité d'un vétérinaire.

Le degré de sévérité de ce projet est considéré comme modéré à sévère.

Ce projet peut nécessiter l'utilisation de 231 000 souris pour une durée de 5 ans.

Ce projet contribue au contrôle de lots de produits afin d'assurer leur fiabilité et leur conformité aux spécifications et aux textes de référence en vigueur et d'autre part, d'assurer le niveau de formation / qualification du personnel requis pour chacun de ces tests conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication.

Suite à l'atteinte du point limite ou en fin de test, la majorité des animaux utilisés est euthanasiée selon les méthodes recommandées par la réglementation, par la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux et approuvées par le Comité d'Ethique. Une petite partie des animaux peuvent être réutilisés pour des besoins de formation dans le respect des exigences réglementaires.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement : Ces tests sont en cours de remplacement progressif par des tests *in vitro* de type ELISA.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés au total est calculé au plus juste de façon à répondre aux exigences réglementaires et aux besoins de tests sur la période. Le nombre d'animaux par groupe est défini par la réglementation ou par une étude statistique. Il ne peut être réduit au-delà.

Raffinement : Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des enrichissements dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires (ETS 123), et suivis par un personnel spécifiquement formé. En cas de signes cliniques, dans les meilleurs délais, les animaux bénéficient des soins vétérinaires ou sont euthanasiés selon les méthodes recommandées.

5942. Le projet a pour but d'étudier l'effet protecteur de polyphénols végétaux antioxydants contre l'impact délétère de l'hyperglycémie dans le contexte de l'ischémie cérébrale.

Le diabète de type 2 se caractérise par une hyperglycémie chronique liée à une insulino-résistance et par le dépôt de sucre et de gras au niveau vasculaire. Dans ce contexte, la sur-activation de voies métaboliques à caractère pro-oxydant et pro-inflammatoire conduit à la perte de fonctionnalité des cellules endothéliales qui tapissent la paroi des vaisseaux sanguins. Ce dysfonctionnement endothélial s'accompagne notamment de l'altération des jonctions serrées chargées de maintenir l'intégrité de l'endothélium. Au niveau cérébral, les cellules endothéliales constitutives de la barrière hémato-encéphalique (BHE) perdent leur sensibilité à l'insuline et aux facteurs vasodilatateurs, augmentant le risque d'hyperperméabilité de la BHE et d'accident vasculaire cérébral (AVC) associé à des complications hémorragiques.

Ce projet permettrait d'explorer les mécanismes physiopathologiques menant au développement de complications vasculaires cérébrales chez le patient diabétique et d'évaluer une stratégie thérapeutique innovante dans le contexte de l'AVC couplé à l'hyperglycémie aiguë.

En effet, un intérêt croissant est accordé aux produits végétaux riches en polyphénols. Les polyphénols végétaux exercent des effets antioxydants, hypoglycémisants, hypolipémiants, anti-inflammatoires et anti-athérogènes qui pourraient rendre compte de leur action protectrice contre l'ischémie cérébrale. Des travaux du laboratoire ont permis d'identifier la plante médicinale *Antirhea borbonica* (Bois d'Osto), inscrite à la Pharmacopée Française, comme une source abondante en polyphénols. Ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et sa non-cytotoxicité ont été démontrées sur des cellules endothéliales et adipeuses. Cependant, il n'existe aucune donnée concernant son potentiel vasculo-protecteur, dans le cadre de la lutte contre les complications vasculaires cérébrales liées au diabète. Nous souhaitons donc explorer les possibles capacités protectrices d'un extrait riche en polyphénols issus ainsi qu'un de ses polyphénols majoritaires, à savoir l'acide caféique. Nous souhaitons déterminer si les polyphénols pourraient protéger le cerveau et la BHE de l'altération du statut redox, inflammatoire et des dommages cérébraux majeurs faisant suite à un AVC. Pour mener à bien ce projet, le modèle animal est indispensable car il est nécessaire de prendre en compte le contexte physiopathologique. L'approche expérimentale consistera à utiliser 70 souris C57BL/6 placées en état d'hyperglycémie et recevant une dose d'extrait végétal ou d'acide caféique avant de subir un AVC expérimental. Les groupes seront constitués de 15 souris pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Les avantages du projet seront une meilleure compréhension mécanistique de la physiopathologie de l'AVC chez le patient en phase d'hyperglycémie pour mieux évaluer l'effet protecteur d'un traitement par les polyphénols. Les inconvénients résident dans la sévérité de l'AVC expérimental. Grâce à l'injection intra-péritonéale simultanée de glucose et de polyphénols, nous pourrions réduire le nombre d'intervention chez l'animal. Par ailleurs, les souris bénéficieront d'un enrichissement de leur environnement afin de limiter leur stress et anxiété. En terme de raffinement, les souris recevront une dose d'analgésique en pré-opératoire et en post-opératoire si nécessaire. Elles bénéficieront d'un accès facilité à la nourriture et à l'eau. Les salles d'hébergement seront contrôlées sur divers facteurs d'ambiance (hygrométrie, température, alternance jour/nuit).

5943. Le but de cette saisine est de mettre au point un modèle d'ostéodystrophie consécutive à une insuffisance rénale chronique chez le rat, puis d'évaluer l'efficacité de différents principes actifs administrés par voies parentérales ou orale. De plus il a été

montré que l'Adénine est responsable du développement d'insuffisance rénale et que l'insuffisance rénale se caractérise par une accumulation de microcristaux calcifiés dans les reins et dans les urines.

Ce projet est divisé en deux étapes :

Procédure expérimentale n°1 : Dans un premier temps 100 rats seront utilisés pour la mise au point du modèle. Trois groupes seront constitués avec un régime alimentaire différent. Le premier sera constitué de 20 rats avec un régime enrichi en phosphore et en calcium (nourriture de base) pendant un maximum de 10 semaines. Le deuxième sera constitué de 40 rats qui auront le même régime alimentaire mais supplémenté en Adénine 0.75% pendant un maximum de 10 semaines. Le troisième sera composé de 40 rats qui auront un régime alimentaire supplémenté en Adénine 0.75% pendant 4 semaines puis ils seront alimentés avec la nourriture de base pendant un maximum de 6 semaines.

Des prélèvements sanguins seront réalisés toutes les 2 semaines afin de doser les marqueurs de déficience rénale, thyroïdiens, du métabolisme phosphocalcique et du remodelage osseux.

Les reins et les membres inférieurs seront prélevés pour évaluer les lésions microscopiques par analyses histologiques et micro scanner. Les urines seront également prélevées pour évaluer la présence de microcristaux calciques.

Cette étude permettra de définir l'apparition des premiers signes pathologiques et la durée maximum du modèle. Elle permettra également d'affiner les points limites qui seront déterminés selon les données de la littérature pour cette première étude.

Procédure expérimentale n°2 : Une fois, le modèle validé, différents principes actifs en comparaison à un produit de référence seront étudiés et appliqués selon les schémas thérapeutiques. Des prélèvements sanguins seront réalisés, à raison d'un prélèvement par semaine afin de mesurer le taux de principe actif dans le sang et d'évaluer la quantité de marqueurs listés ci-dessus. La durée des protocoles variera en fonction des principes actifs étudiés allant de 3 à 10 semaines. Les animaux pourront être euthanasiés à différents points de cinétiques au cours du protocole, déterminés selon la nature des principes actifs étudiés. A chaque euthanasie, une analyse macroscopique et histopathologique des reins et des os longs seront réalisées. En parallèle, une analyse micro scanner des os longs permettra d'évaluer les lésions au niveau de l'architecture osseuse.

Pour cette deuxième partie, un total de 2000 animaux seront utilisés sur les 5 ans du projet.

Au total, 2100 animaux sont inclus dans la présente saisine.

Ces études seront menées dans le respect de la règle des 3R. Le modèle d'ostéodystrophie rénale faisant intervenir plusieurs organes, il est impossible à reproduire par d'autres techniques que par des études *in-vivo* (Remplacement). Le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'avoir des résultats exploitables, permettant de conclure de manière certaine, sans nécessiter la réalisation d'une deuxième étude pour confirmer les résultats obtenus au cours du présent projet (Réduction). Les points limites ont été définis afin d'éviter toute souffrance inutile et seront affinés lors de la phase de mise au point. Si les points limites sont atteints, les animaux concernés seront exclus du protocole et euthanasiés. Les animaux seront stabulés en groupe dans des locaux adaptés permettant de maintenir les animaux dans un environnement adéquat et n'induisant pas de stress. Ils seront suivis quotidiennement afin de détecter tout signe de détresse et/ou de douleur (Raffinement). Si tel est le cas, un traitement médicamenteux choisit selon la nature de la détresse, sera appliqué. Si le traitement médicamenteux est susceptible d'interférer avec le mode d'action du principe actif étudié, les animaux ne pouvant être traités seront euthanasiés et exclus du protocole.

5944. La Sclérose en Plaques (SEP) est la maladie démyélinisante du système nerveux central la plus fréquente chez l'adulte. Son étiologie est inconnue et il n'existe pas de traitement curatif. Les lésions altèrent la gaine de myéline, qui entoure et protège les axones (prolongements des neurones), et détruisent les oligodendrocytes (OL) qui la synthétisent. La réparation (remyélinisation) des lésions est, pour des raisons incomplètement identifiées, insuffisante, conduisant à une dégénérescence neuronale et à un handicap permanent.

L'une des stratégies thérapeutiques neuroprotectrices explorées est d'augmenter la remyélinisation en stimulant la différenciation des précurseurs d'OL encore présents dans ou à proximité des lésions et qui apparaissent bloqués à un stade non myélinisé au cours de la SEP. Divers agents de ce type appelés « proremyélinisants » ont été identifiés (ex. neurotrophines, PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes) ...) mais tous ne sont pas utilisables actuellement car ils ne franchissent pas la barrière hématoencéphalique (sang/cerveau) et/ou ils ne ciblent pas les OL – cette spécificité étant une condition nécessaire pour éviter les effets collatéraux néfastes -. Fréquemment leur stabilité chimique est également réduite.

Des nanoparticules sur lesquelles seraient adsorbées des ligands ayant une affinité préférentielle pour les OL pourraient permettre à ces molécules de franchir la barrière hématoencéphalique et/ou de cibler spécifiquement les OL. De telles approches utilisant des nanoparticules constituées de PLGA (poly(lactide-co-glycolide)) appliquées à des injections stéréotaxiques de LIF (leukemia inhibitory factor) ont amélioré la remyélinisation chez l'animal. Des nanoparticules lipidiques sont ainsi élaborées au laboratoire pour servir de cargos aux molécules-médicaments potentielles. Leur structure chimique diffère des précédentes, elles sont constituées de triglycérides (cœur) et d'une enveloppe de phospholipides et de solutol.

La recherche de molécules favorisant la remyélinisation et celle de LNC appropriées pour les délivrer *in situ* constitue donc une des voies thérapeutiques actuelles pour la SEP. Il n'existe pas de lignées d'OL reproduisant les phénomènes de démyélinisation/remyélinisation, aussi nous utiliserons des cultures d'OL de rats nouveau-nés qui autorisent une analyse détaillée des effets des molécules étudiées sur le développement des OL ainsi que leur rôle dans la remyélinisation grâce à l'utilisation d'un toxique (lysophosphatidylcholine (LPC)) permettant de modéliser la démyélinisation.

Grâce à notre modèle de cultures d'OL nous avons précédemment identifié certains facteurs de croissance (PDGF, neurotrophine 3 par exemple) ainsi que des protéines et peptides du cytosquelette axonal comme des agents proremyélinisants. Nous avons montré que l'un de ces peptides (NFL-TBS.40-63) est internalisé (par endocytose) dans les OL et favorise leur survie et leur maturation. De plus ce peptide - adsorbé sur les LNC - favorise leur pénétration spécifiquement dans les OL. Ainsi il

convient d'analyser le potentiel de LNC vectorisées avec NFL-TBS afin d'apporter spécifiquement, et à concentration élevée, à ces cellules les molécules susceptibles d'augmenter la remyélinisation.

Tout est mis en œuvre pour respecter la règle des 3 R et limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés (populations réduites mais qui doivent permettre de dégager une significativité statistique). L'utilisation d'une autre source de cellules, ou la modélisation informatique, ne sont pas envisageables. L'utilisation de rats nouveau-nés dont le système nerveux est incomplètement développé – en particulier les voies de la douleur -, et d'une procédure d'euthanasie instantanée permet d'éviter au maximum la douleur pour ces animaux. Nous utiliserons au total 600 animaux.

5945. Les chats sont régulièrement utilisés dans la recherche préclinique dans le domaine de la santé animale (espèce cible). Ils sont notamment inclus dans des études de tolérance (locale ou générale) qui ont pour but de mettre en évidence des réactions locales au site d'application (tolérance locale) ou l'éventuelle toxicité du médicament vétérinaire dans les conditions normales d'emploi chez l'animal (tolérance générale sur espèce cible).

Dans ce type d'étude, un suivi du produit dans l'organisme entier (détection dans le sang/plasma, détection dans les urines, détection dans les tissus) ou/et un suivi des modifications hématologiques, biochimiques et ou enzymatiques est également possible.

Aucune méthode alternative ne permet actuellement d'évaluer la tolérance de l'organisme suite à administration d'un produit, il est indispensable de recourir à l'animal entier.

Ce projet se déroulera sur plusieurs études et selon plusieurs procédures expérimentales: la procédure d'administration du produit à tester, la procédure de prélèvements sanguins répétés. De plus, des prélèvements d'urine, de différents tissus ou organes seront parfois nécessaires. Les prélèvements de sang seront toujours réduits au minimum et toujours conformes aux bonnes pratiques vétérinaires.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés par groupes ou de façon individuelle (nécessaire pour un suivi de consommation d'aliment ou d'eau, pour des recueils d'urine, par exemple).

Des jouets, tablettes sont présents dans les hébergements pour enrichir le milieu.

Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place permettant l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels effets du produit sur l'animal (observation de l'état de santé général, consommation alimentaire et hydrique...).

Au total, au maximum 500 animaux pourront être utilisés en 5 ans.

5946. L'objectif de cette étude est i) d'évaluer la prévalence des bactéries multi-résistantes chez *Rattus spp* dans des milieux plus ou moins anthropisés ii) d'identifier la proximité clonale des souches d'*Enterobacteriaceae* isolées chez l'homme et les rats afin iii) de mieux caractériser le rôle de *Rattus spp* en tant que potentiel vecteur ou réservoir de bactéries résistantes pour l'homme à la Réunion et Mayotte.

Cette étude implique la capture de rats sauvages, *R. rattus* et *R. norvegicus*. Ces espèces ont été introduites par l'homme et sont considérées comme nuisibles pour l'environnement. Ce modèle ne peut être remplacé en vue de répondre à notre objectif d'évaluation du portage de bactéries multi-résistantes chez les rats urbains et péri-urbains. Un effectif de 1200 animaux est attendu à la Réunion et Mayotte (600 dans chaque territoire avec 15 sites de captures). Ce nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en assurant la représentativité de l'échantillon pour une précision relative de 0.2 avec un portage attendu de 13%, il ne peut être réduit davantage. Les rats seront capturés à l'aide de pièges de type Tomahawk placés en zone ombragée, avec comme appât un quartier de pomme pour hydrater l'animal, et relevés quotidiennement en début de matinée pour éviter l'exposition directe au soleil. Les nouveaux animaux capturés chaque jour seront acheminés au laboratoire en étant maintenus à l'abri de la lumière et du bruit pour minimiser leur stress. Les animaux présentant un niveau de stress élevé et des signes de détresse (ex. hyperactivité, hypoactivité, prostration, tremblement, diarrhée, etc.) seront euthanasiés prioritairement. Néanmoins, l'ensemble des rats nouvellement capturés seront euthanasiés quotidiennement au laboratoire par élévation cervicale selon la réglementation en vigueur. L'étude de la prévalence de bactéries multi-résistantes dans le microbiome des rats implique leur mise à mort pour prélèvement du tractus digestif.

Les données et connaissances générées par ce projet permettront d'évaluer le fardeau des bactéries multi-résistantes chez les populations de rats et d'identifier des zones géographiques avec un portage élevé caractéristique d'une circulation importante de bactéries résistantes ou de résidus d'antibiotiques dans l'environnement.

5947. Les pathologies broncho-pulmonaires, cancer pulmonaire et bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), sont des maladies respiratoires graves en passe de devenir très prochainement les principales causes de mortalité mondiale. Le principal facteur de risque est le tabagisme mais il a été montré récemment qu'une mutation particulière, présente sur certains récepteurs à la nicotine, est fortement associée à l'incidence de ces pathologies pulmonaires. Le but de notre projet est ici d'étudier, chez les souris portant cette mutation, les remaniements histologiques au niveau pulmonaire et leur conséquence sur la fonction pulmonaire.

Notre projet, visant à étudier les remaniements tissulaires pulmonaires associés à cette mutation, est conditionné par l'utilisation de souris transgéniques exprimant la mutation d'intérêt. Ce projet ne peut être réalisé sur des cultures de cellules pulmonaires. En particulier, l'étude des remaniements histologiques pulmonaires, de la réaction inflammatoire et de la fonction respiratoire ne peut être réalisée qu'*in vivo* (Remplacement).

Nous avons restreint au minimum le nombre d'animaux utilisés. La plupart des protocoles expérimentaux envisagés sont maîtrisés par le laboratoire depuis plusieurs années. Nous en connaissons donc la variabilité expérimentale, et le nombre d'animaux à inclure dans chaque protocole est réduit au minimum. Les tests d'analyse statistique non paramétriques, adaptés aux échantillons faibles, sont systématiquement utilisés (Réduction). Ce projet sur 5 ans nécessite l'utilisation de 252 souris C57BL/6J issues des mêmes portées, dont 84 souris non mutées, 84 souris homozygotes pour la mutation $\alpha 5D398N$ et 84 souris hétérozygotes pour la mutation $\alpha 5D398N$.

Les protocoles ont été systématiquement discutés avec un vétérinaire ; des anesthésiques et analgésiques seront utilisés lorsque nécessaires et les animaux seront surveillés au moins une fois par jour pour observer tout comportement anormal témoin d'une souffrance. Les animaux seront euthanasiés dès lors que l'un des points limites sera atteint. Une attention particulière est portée à l'enrichissement du milieu : sélection de litières propices à l'aménagement, utilisation en simultané ou en alternance de solutions d'enrichissement du milieu, eau et nourriture à volonté (Raffinement).

5948. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les maladies cardiovasculaires sont à l'origine de 30% de la mortalité mondiale totale. Les causes de mortalité par maladies cardiovasculaires et accidents vasculaires cérébraux représentent à elles deux quatre décès sur cinq dans le monde. Il est possible de prévenir ce type de pathologies en intervenant sur les facteurs de risques (hypertension artérielle, diabète, obésité, dyslipidémie, tabagisme...). Ces maladies cardiovasculaires et ces facteurs de risque associés peuvent être étudiés au laboratoire grâce aux modèles précliniques chez l'animal qui vont permettre de comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'apparition de la maladie et de son évolution. Ainsi, l'identification de nouvelles cibles permettra de proposer aux patients de nouvelles thérapies.

Dans la plupart des projets de recherche, les tests réalisés en première intention concernent des lignées cellulaires. Mais dans le domaine cardiovasculaire, les lignées disponibles ne possèdent pas toutes les voies de signalisation des cellules primaires. En effet, ces lignées présentent des modifications phénotypiques comme une capacité accrue de prolifération associée ou non à des changements de structure, de connexions cellulaires ou de voies métaboliques. Ainsi, on comprend bien l'importance de travailler sur les cellules primaires puis, sur des cellules maintenues dans leur environnement tissulaire (analyse des communications intercellulaires) et enfin, avec un organe (cœur et rein) dans lesquels différents types cellulaires doivent œuvrer pour lui permettre d'assurer sa fonction. Dans le domaine cardiovasculaire, des études sur des cellules primaires, tissus et organes isolés sont ainsi indispensables pour réussir à améliorer la prise en charge des patients atteints de maladie cardiovasculaire. L'efficacité de candidats médicaments est tout d'abord évaluée à l'issue d'une série de tests *in vitro* en réalisant des analyses biochimiques, des tests cellulaires ou des expériences sur organes isolés. Ces études *in vitro* seront ensuite suivies de d'évaluations pharmacologiques *in vivo* dans des organismes entiers pathologiques ou sains.

Les expériences de ce projet vont permettre de vérifier non seulement l'efficacité *in vitro* de la molécule sur sa cible mais également son innocuité sur des systèmes isolés avant son évaluation finale chez l'animal *in vivo*.

Les études, objet de ce projet, sont réalisées chez le porc, en second temps, après la démonstration d'efficacité effectuée en préalable chez des modèles *in vitro* de rongeurs. Le système cardiovasculaire du porc proche de celui l'homme en fait un modèle préclinique incontournable pour la sélection de candidat médicament.

Dans le cadre de ce projet, les organes prélevés sont utilisés pour différentes études *in vitro* tels que l'analyse de la fonction des vaisseaux, soit isolée soit maintenus dans un organe, des analyses biochimiques sur les échantillons sanguins, l'extraction de cellules primaires à partir de tissus, l'analyse des expressions et fonctions de protéines d'intérêt, l'étude de canaux membranaires ou encore des prélèvements d'autres organes pour d'autres structures internes.

Pour ce faire, après anesthésie générale de l'animal, les organes (vaisseaux, cœur, rein...) ou le sang sont prélevés et constituent une procédure sans réveil.

Tous les porcs bénéficient de conditions d'hébergement enrichies, adaptées à l'expression de leurs instincts (jeu, fouissage, maintien en groupes sociaux ...).

Sur 5 ans, le projet nécessitera l'utilisation de 2000 porcs.

5949. La prématurité est la principale cause de décès et de handicaps chez les nouveau-nés. Dans les pays industrialisés, en raison de l'amélioration des soins intensifs néonataux, le nombre des nourrissons de très faible poids de naissance qui survivent au-delà de l'enfance est en hausse. Cependant, le cerveau de ces prématurés reste extrêmement vulnérable. Les lésions diffuses de la substance blanche constituent la principale forme de lésion cérébrale du prématuré. L'inflammation périnatale que subissent une grande majorité des enfants prématurés et la grande vulnérabilité des cellules cérébrales en développement à ce stress inflammatoire est à l'origine de l'apparition de la plupart de ces lésions. Elles induisent des handicaps moteurs, des déficits cognitifs et des troubles comportementaux qui persistent à l'âge adulte. Malheureusement, aucune thérapie spécifique de ces lésions diffuses n'existe à ce jour. L'amélioration du pronostic de cette pathologie repose donc la compréhension des mécanismes de développement de ces lésions dans le but d'élaborer de nouvelles stratégies neuro-protectrices. Les objectifs de ce projet visent donc à comprendre les mécanismes impliqués dans l'apparition de ces lésions cérébrales dans deux souris génétiquement modifiées pour sous-exprimer les gènes *Ctnnb1* et *Fmr1*.

Le choix de la souris pour ce projet est lié à la facilité avec laquelle on peut générer des mutations dans cette espèce.

(1) Les souris génétiquement modifiées pour sous-exprimer le gène *Ctnnb1* (beta-caténine) dans la microglie développent spontanément des lésions de la substance blanche similaires à celles des enfants prématurés et n'induit pas de phénotype dommageable chez la souris. Ce modèle constitue donc un outil de choix pour la compréhension de ces lésions.

(2) Les données de la littérature suggèrent également que Fmr1 jouerait un rôle majeur dans le développement cérébral. Nous analyserons ici les effets cumulés d'un stress environnemental (l'inflammation) et de la mutation du gène Fmr1 sur le développement cérébral. Il sera donc analysé chez la souris contrôle et la souris mutée pour le gène Fmr1, l'évolution des processus neuroinflammatoires, des altérations du développement cérébral et des déficits cognitifs.

Une partie des travaux de ce projet a déjà été réalisée *in vitro* sur des cultures cellulaires. Cependant, les mécanismes impliqués dans ces lésions cérébrales mettent en jeu l'interaction de plusieurs types cellulaires au cours du développement qu'il est impossible de reproduire *in vitro*. Il est donc indispensable d'associer, aux études *in vitro*, des études de ces lésions chez l'animal entier. Pour réaliser cette étude, le stress inflammatoire sera provoqué par des injections intra-péritonéales d'interleukine 1 beta chez le souriceau. Ces injections induisent des lésions cérébrales qui reproduisent la pathologie humaine de l'enfant prématuré. Ce modèle publié et déjà validé par le comité d'éthique est de sévérité légère ou modéré selon le fond génétique utilisé et n'induit pas de phénotype dommageable pour la souris. La bonne reproductibilité et le très faible taux d'échec (5%) de ce modèle expérimental permettent de limiter le nombre d'animaux par groupe. La mise en place de points limites (anémie, absence de prise de poids, déshydratation, lésions) ainsi que l'observation régulière du comportement des animaux permettront d'identifier toute souffrance et douleur. Pour ce projet les analyses seront réalisées chez 680 souris. Les tests statistiques utilisés dépendront des analyses et des comparaisons : test de Student ou analyses de variances suivi d'un post-test de Bonferroni.

5950. De très nombreuses études prospectives montrent que le niveau de consommation des protéines animales des pays les plus riches ne pourra pas se généraliser à l'échelle planétaire en l'état actuel des ressources. Dans ce contexte, le maintien de la part des protéines dans l'alimentation nécessite de développer de nouveaux régimes et pratiques alimentaires qui viseront à augmenter la part relative des produits végétaux. L'évaluation de la qualité des protéines issues de ressources alternatives est une étape essentielle lors du développement d'ingrédients protéiques à haute valeur ajoutée. Plusieurs critères rendent compte de la qualité protéique. Parmi eux, le coefficient d'efficacité protéique (CEP), le bilan azoté et le score de digestibilité des acides aminés indispensables (DIAAS).

Le CEP consiste à évaluer chez le rat en croissance la capacité d'une protéine à couvrir les besoins pendant la croissance. D'un point de vue pratique, des rats en croissance sont nourris pendant un mois avec un régime contenant l'ingrédient à tester. Le CEP est le gain de croissance observé sur un mois divisé par la consommation cumulée de protéines sur cette même période. A la fin de l'étude, les animaux sont euthanasiés afin d'évaluer leur composition corporelle (proportion des tissus gras et maigres) et le poids de différents organes, et de mettre en évidence d'éventuelles différences sur la répartition tissus gras / tissus maigres pour un même gain de poids.

Le bilan azoté permet de déterminer l'efficacité de la captation des protéines par les tissus et consiste à calculer la différence entre l'azote ingéré et perdu (dans les fèces et l'urine) chez les rats nourris avec le régime contenant la protéine à tester.

Le DIAAS est le nouveau score recommandé par la FAO (« Food and Agriculture Organization ») et est basé sur l'analyse de la composition en acides aminés indispensables de la protéine ainsi que leur digestibilité individuelle pour évaluer la capacité de cette protéine à satisfaire les besoins nutritionnels. Pour cela, il faut collecter au niveau de l'intestin grêle terminal et du cæcum les digestats des animaux après l'ingestion d'un repas contenant la protéine à tester. La collection des digestats nécessite l'euthanasie des animaux.

Le rat est un bon modèle pour étudier la digestibilité des protéines car son alimentation et son système digestif sont proches de ceux de l'Homme. De plus il n'existe aucun modèle *in vitro* pour mesurer ces paramètres. Le bilan azoté et le DIAAS peuvent être évalués au cours d'une même étude. Deux études sont ainsi nécessaires pour déterminer les 3 critères de qualité. Nous utiliserons 8 animaux par groupe ce qui est le nombre minimal d'animaux pour avoir une bonne représentation statistique. Pendant les 5 ans du projet, nous envisageons de tester chaque année 5 protéines issues de diverses sources (fraction protéique de légumineuses, de céréales, fractions de protéines de lait, etc.) sur les 3 critères soit au total 400 animaux.

Du fait de la mesure individuelle de la prise alimentaire, les animaux sont hébergés dans des cages individuelles durant la totalité de l'étude. Afin de diminuer le stress, nous enrichissons le milieu avec des tunnels et des anneaux et les cages sont en plexiglass permettant aux animaux de voir leurs congénères. De plus, les rats sont manipulés quotidiennement et le poids et la prise alimentaire sont mesurés quotidiennement ce qui permet un suivi régulier de l'état de chaque animal et limite le stress pouvant être engendré par les manipulations. Mise à part la privation protéique d'une semaine nécessaire à la détermination du bilan azoté, les protocoles expérimentaux utilisés dans ce projet ne sont pas susceptibles d'induire de douleur spécifique.

5951. L'œsophagite à éosinophiles est une maladie inflammatoire de l'œsophage impliquant un flux de cellules immunitaires (les polynucléaires éosinophiles, cellules clés de l'inflammation allergique) due à une intolérance à certains antigènes alimentaires. Elle touche aussi bien les enfants que les adultes et principalement les sujets masculins. Jusqu'à 37% de certaines populations peuvent souffrir de symptômes œsophagiens. En effet, avec les progrès des technologies alimentaires et des disponibilités de produits alimentaires transformés peu coûteux (contenant de nouveaux allergènes), la maladie est de plus en plus fréquente. Aujourd'hui, l'avancée des outils de diagnostic tels que l'endoscopie et la pratique de biopsies ont permis de définir et connaître la physiopathologie bien au-delà de ce qui était connu préalablement. Les traitements disponibles actuels reposent essentiellement sur une modification de régime alimentaire, sur des traitements pour lutter contre l'acidité gastrique ou encore sur l'administration de stéroïdes visant à supprimer les réactions immunitaires inadaptées. Cependant, ces traitements sont symptomatiques, souvent suivis de nombreux effets secondaires avec un retour aux symptômes de la maladie dès l'arrêt du traitement. Il est donc essentiel de pouvoir identifier de nouvelles cibles afin de proposer des thérapies efficaces et sûres.

Les études en cours s'appuient sur l'hypothèse que l'inflammation œsophagienne pourrait être contrôlée en administrant des anticorps dirigés contre des entités secrétées par les globules blancs, appelés interleukines. Ceux-ci sont spécifiquement dirigés contre les récepteurs moléculaires influençant la production, la migration, et l'activation des éosinophiles. Il est probable que la prise en charge future de cette maladie s'oriente de plus en plus vers un traitement de type immunologique. Dans cette optique et pour assurer une sécurité suffisante autour de l'usage d'une nouvelle thérapie chez l'Homme, des tests *in vivo* chez l'animal doivent être obligatoirement menés. Ces derniers sont à l'heure actuelle indispensables pour compléter les données obtenues *in vitro*. Dans ce projet l'utilisation du modèle primate est privilégiée et se justifie par les spécificités des molécules à étudier. En effet, il existe une grande proximité phylogénétique entre le Primate Non Humain et l'Homme et les anticorps humanisés actuellement en développement n'agissent que sur les entités humaines ou de singes.

Le développement d'un anticorps neutralisant l'interleukine-15 (IL-15) a déjà apporté une preuve de concept, dans un modèle de souris transgénique, que la neutralisation de l'interleukine 15 était une approche prometteuse et a obtenu la désignation de médicament pour indication orpheline auprès de l'Agence Européenne du Médicament. De plus, des données préliminaires sur l'administration de l'anticorps chez le macaque cynomolgus sont déjà disponibles.

Ce projet s'appuiera sur une étude préliminaire sur un animal qui a pour but de vérifier la faisabilité de la méthode de prélèvement de biopsies œsophagiennes chez le macaque cynomolgus par endoscopie, utilisé en routine chez l'Homme, ainsi que de valider les méthodes d'identification de marqueurs biologiques sur ces biopsies. En fonction des résultats, la procédure 1 (n=8 animaux) consistera à suivre les bio-marqueurs sur des prélèvements de biopsies œsophagiennes et de peau dans le temps, avant et après traitement avec l'anticorps neutralisant. Si la technique de prélèvement par endoscopie ne se révèle pas satisfaisante, les biopsies seront réalisées uniquement en fin d'étude pour analyse immunohistochimique. Dans le cas de la procédure 2 (n=10), les animaux traités avec l'anticorps seront comparés avec des animaux contrôles. Pour la procédure 1, chaque animal pourra être son propre contrôle (point avant administration). Des prélèvements de sang de volume raisonnable permettront de suivre l'évolution de population de cellules immunitaires dans le sang. Les données recueillies permettront de déterminer l'engagement de la cible visée dans l'œsophage, la peau et le sang et impliquée dans la physiopathologie de la maladie. Elles pourront être directement transposables à l'Homme dans le cadre de prochains essais cliniques.

Pour ce projet, déposé pour une durée de 5 ans, il est prévu d'utiliser au maximum 50 macaques cynomolgus issus d'un élevage agréé : réalisation d'une procédure par an (n=10), ce projet permettra d'évaluer jusqu'à 5 anticorps différents au total. Dans un souci de réduction, le nombre d'animaux utilisés a été réduit au minimum nécessaire à l'obtention des résultats interprétables afin de corroborer, chez l'Homme comme chez l'animal, l'efficacité thérapeutique du composé testé.

Dès leur arrivée, les animaux seront examinés par un vétérinaire pour s'assurer de leur bon état de santé. Ils seront suivis individuellement et quotidiennement afin de détecter tout signe clinique de douleur ou de détresse. Une attention particulière sera accordée à l'enrichissement du milieu de vie des animaux. Le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress pouvant être engendré par les manipulations.

5952. L'obésité est un enjeu majeur de santé publique qui atteint des proportions pandémiques depuis les années 1980. Elle est associée à un état inflammatoire chronique de faible intensité ainsi qu'à des complications (diabète...).

Il est admis qu'une alimentation riche en lipides est associée à une augmentation des lipopolysaccharides plasmatiques (composants membranaires des bactéries intestinales) impliqués dans la genèse de l'obésité. Cette augmentation résulterait d'une altération de la fonction barrière de l'intestin causée par une modification de la composition de la flore intestinale sous l'effet d'un régime riche en lipides.

D'autre part, une alimentation riche en acides gras omega3 peut avoir des effets bénéfiques sur l'obésité et le diabète, comme cela a été montré chez le rongeur.

Selon notre hypothèse, les oméga3 exerceraient des effets bénéfiques lors de l'obésité et de l'inflammation de faible intensité en modifiant favorablement la flore intestinale, améliorant ainsi la fonction barrière de l'intestin. Pour s'affranchir des biais que représente une supplémentation alimentaire en oméga3, nous utilisons un modèle de souris transgéniques (fat-1), capables de convertir les oméga6 en oméga3, permettant ainsi de cibler les effets spécifiques des oméga3 tissulaires.

Notre premier objectif sera de montrer que la souris fat-1 est résistante à l'obésité alimentaire induite par un régime riche en lipides ainsi qu'au diabète associé. Dans un second temps, nous apporterons du LPS afin de caractériser son impact sur la fonction barrière de l'intestin.

Pour répondre au premier objectif, des souris seront nourries avec un régime obésogène.

Nous suivrons les conséquences physiologiques de ce régime sur les souris. Pour le second objectif, l'effet métabolique du LPS sur l'obésité et la perméabilité de l'intestin seront étudiés en ayant recours à des injections de LPS (court terme) ou à l'implantation des pompes osmotiques (long terme) délivrant du LPS en continu avec ou sans régime obésogène.

Cibler l'impact des oméga3 sur l'obésité nécessite le recours à l'animal, en particulier des souris transgéniques. Les études de prise alimentaire et de suivi pondéral sont sans douleur pour l'animal. Afin d'appliquer le principe de remplacement, des cultures de cellules intestinales seront réalisées. Des paramètres sanguins seront mesurés. Le volume prélevé étant faible, un même animal pourra être utilisé plusieurs fois, à 2 semaines d'intervalle (principe de réduction). A la fin de l'expérimentation, les mêmes animaux que ceux utilisés pour les prélèvements sanguins seront euthanasiés et des analyses biochimiques et moléculaires effectuées. Ceci permet une rigueur scientifique et statistique (un animal étant son propre témoin). Le principe de raffinement sera également mis en œuvre. Un enrichissement du milieu d'hébergement des animaux sera effectué et un nombre limité de personnes manipulera les animaux afin de minimiser le stress de la captivité et de l'expérimentation mais également de permettre aux expérimentateurs de se familiariser au mieux avec le comportement des animaux permettant ainsi une détection plus fiable des

signes de stress, de souffrance ou d'apparition de points limites. De plus, l'utilisation d'analgésiques et/ou d'antalgiques se fera dès que nécessaire.

Ces études nécessiteront au total l'utilisation de 176 animaux.

5953. Le diabète est une maladie chronique caractérisée par une augmentation de la glycémie (quantité de glucose dans le sang). Dans le diabète de type 1, le pancréas ne produit plus assez d'insuline à cause de la destruction des cellules pancréatiques par le système immunitaire. Dans le diabète de type 2, l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline produite par le pancréas. La clé thérapeutique pour les diabètes de type 1 et 2 est le contrôle de la glycémie. En 2014, l'Organisation Mondiale de la Santé a estimé le nombre de personnes souffrant du Diabète à 422 millions. Il est prédit qu'en 2030, le diabète sera la septième cause de décès dans le monde. En 2012, l'OMS a estimé que 1,5 millions de décès étaient directement dus au diabète. La prise en charge conventionnelle du diabète de type 2 repose sur des interventions pharmaco-thérapeutiques (antidiabétiques oraux et injections d'insuline) et comportementales (restrictions alimentaires et activités physiques régulières). La prise en charge du diabète de type 1 repose exclusivement sur de multiples injections quotidiennes d'insuline.

Pour ces patients, la maladie est toujours présente dans la vie quotidienne nécessitant des mesures glycémiques, des calculs d'apport en glucides et des injections d'insuline. La réduction de l'autocontrôle du glucose et des injections d'insuline améliorerait énormément la qualité de la vie des diabétiques, en particulier pour les très jeunes patients, les adolescents et les patients âgés qui ont des problèmes avec des thérapies persistantes d'autocontrôle et de vigilances exigeantes.

L'objectif de notre projet est de réduire les contrôles quotidiens et le nombre d'injections d'insuline, en particulier pour les patients diabétiques de type 1 et la réduction des effets secondaires à long terme des thérapies actuelles et des niveaux de glucose incontrôlés.

Notre projet porte sur l'encapsulation d'îlots qui offre une perspective innovante pour éviter l'immunothérapie pendant la transplantation. Notre concept d'encapsulation consiste à enfermer les îlots pancréatiques, en présence d'un ratio de cellules souches dans une sphère composée de biomatériaux dont le rôle est d'appliquer une barrière physique entre les cellules pancréatiques du donneur et le système immunitaire du receveur, pour améliorer la transplantation d'îlots pancréatiques classique, injectés par voie veineuse.

La disponibilité en îlots humains, dépendante du don d'organe à usage scientifique, est extrêmement limitée. Les îlots de rats représentent une alternative à l'utilisation des îlots humains pour la validation *in vitro* du projet et justifie l'utilisation de 210 animaux dans le projet (en respectant la règle des 3R), pour étudier *ex-vivo* l'effet de différents stress (manque d'oxygène et inflammatoire) sur leur fonctionnalité et leur viabilité. En effet, ces 210 animaux sont justifiés par le nombre minimum de groupes (2: manque d'oxygène et inflammatoire) et de conditions nécessaires (2: viabilité et fonctionnalité pour 5 ratios différents de cellules souches, 9 animaux par condition) pour mener à bien notre étude. Il est à noter que parmi les 210 animaux, 30 sont prévus pour la maîtrise et la mise au point de la technique par les différents expérimentateurs.

Dans un souci de respect de la règle des 3R, nous avons:

Remplacé: les lignées de cellules pancréatiques (Min6 ou INS1) sont des cellules bien plus résistantes que les cellules pancréatiques humaines. Dans la problématique de notre projet qui vise à la transplantation humaine d'îlots pancréatiques nous avons recherché un modèle le plus ressemblant. De plus, la disponibilité en îlots humains, dépendantes du don d'organe à usage scientifique, est extrêmement limitée. Les îlots de rats représentent une alternative à l'utilisation des îlots humains pour la validation *in vitro* du projet et justifie l'utilisation des animaux dans le projet.

Réduit au minimum le nombre d'animaux nécessaire pour atteindre la puissance statistique.

Raffiné en améliorant l'hébergement des animaux avec milieu de vie enrichi, observation quotidienne par l'équipe responsable de l'animalerie (comportement, aspect, détection de toute souffrance).

5954. Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme et reste le plus mortel malgré des progrès thérapeutiques basés sur la chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. Ce cancer regroupe plusieurs entités qui varient sur le plan clinique et biologique d'une patiente à l'autre notamment en termes de réponse à un traitement donné. L'évolution parfois très défavorable de la maladie est liée à l'apparition de métastases résistant aux traitements actuels. Le microenvironnement tumoral est un élément important dans la réponse de la tumeur aux traitements et déterminant dans leur efficacité.

Notre projet vise à modéliser l'évolution d'un cancer mammaire humain sur des souris immunodéprimées pour tester l'efficacité de nouvelles molécules anti tumorales sur la tumeur primaire (glandes mammaires) et sur la formation de métastases. Il a pour objectif de valider des cibles thérapeutiques anticancéreuses en prenant en compte l'évolution de la tumeur en présence de cellules non cancéreuses comme les fibroblastes ou les cellules endothéliales connues pour participer au développement tumorale.

Notre projet est basé sur l'utilisation de lignées de cancer du sein d'origine humaine commercialement disponibles. Certaines de ces lignées cellulaires sont capables de quitter le site auquel elles ont été injectées (glande mammaire) et générer des métastases spontanément vers des sites identiques à ceux observés chez les patientes. Des versions génétiquement modifiées pour l'expression de la luciférase, permettent de localiser les cellules cancéreuses de façon non invasive, *in vivo* par imagerie à bioluminescence sur le site primitif (glande mammaire) ainsi qu'au niveau de tout l'organisme. Une injection simultanée au niveau de la glande mammaire des lignées cancéreuses avec des cellules du microenvironnement présentes dans les tumeurs de patientes, permettra l'analyse du rôle de ces dernières dans l'évolution de la tumeur et de sa réponse aux traitements.

En parallèle, du 1er modèle orthotopique décrit ci-dessus, un 2ème modèle métastatique obtenu par l'injection des lignées par voie intraveineuse permettra de générer des métastases de manière systématique. Ce modèle sera utilisé pour une étude d'efficacité de traitement ciblé sur les métastases.

Les tests réalisés *in vivo* se déroulent après une étude préliminaire sur les cellules en culture *in vitro* pour évaluer la sensibilité ou résistance de celles-ci à un traitement donné. Ces modèles précliniques, qui permettent une étude cinétique de l'efficacité des traitements aussi bien au niveau local (glande mammaire) que des métastases, constituent une étape précieuse pour l'évaluation préclinique de nouveaux traitements à visée anticancéreuse et sont des modèles particulièrement appropriés pour l'étude des cancers du sein métastatique qui posent encore des problèmes thérapeutiques majeurs.

Le projet se déroulera en 3 phases :

1) Evaluation de la réponse du modèle de xénogreffe à un traitement donné

Cette étape consiste à injecter des cellules de la lignée de cancer du sein cultivée *in vitro*, au niveau de la glande mammaire ou du système sanguin de souris immunodéficientes pour suivre l'apparition et l'évolution de la pathologie en absence/présence d'un traitement. L'utilisation de lignées de cancer du sein exprimant la luciférase permettra un suivi en bioluminescence. Une exérèse de cette tumeur mammaire sera éventuellement programmée pour le modèle orthotopique pour suivre les métastases tardivement. Cette intervention permettra de mimer la situation clinique la plus fréquente : la tumeur primitive de la patiente est ôtée par chirurgie en première ligne de traitement. D'autre part, le modèle métastatique obtenu par l'injection en intraveineuse des cellules tumorales permettra d'établir un modèle d'étude de la sensibilité des métastases aux traitements étudiés.

Ces modèles permettront de suivre l'évolution d'un cancer mammaire chez la souris pour identifier les cibles potentiellement intéressantes pour bloquer les processus de prolifération, dissémination, résistance aux traitements et enfin tester de nouveaux agents anticancéreux. Il est donc un atout majeur pour la recherche translationnelle en oncologie.

2) Etude du rôle du microenvironnement tumoral au cours d'un traitement donné

Le microenvironnement mammaire contient naturellement des composants gras, fibroblastiques, endothéliaux et lymphocytaires. Ces éléments peuvent soutenir l'évolution de la tumeur, en assurant des contacts cellulaires/facteurs solubles nécessaires à la tumeur et/ou favorisant son oxygénation. Aussi caractériser les interactions qui surviennent entre les cellules cancéreuses et ces composants, est indispensable pour évaluer l'efficacité d'un traitement. Nous procéderons donc à l'injection dans le modèle orthotopique des cellules cancéreuses en association avec des cellules du microenvironnement afin de mimer de manière plus pertinente les tumeurs observées chez les patientes. Cette phase nous permettra d'étudier plus précisément les réponses de ces tumeurs à des agents anticancéreux conventionnels ou innovants et de décrire les mécanismes d'adaptation de la tumeur à ces traitements pour anticiper d'éventuels risques d'apparition de résistance aux traitements appliqués.

3) Etude du rôle de la graisse dans le développement tumoral

L'injection de graisse autologue purifiée est pratiquée en reconstruction mammaire depuis 1993. Chez les souris il a été démontré que les cellules graisseuses pourraient favoriser le développement tumoral et la survenue de métastases. Dans les modèles orthotopiques générés, certains animaux recevront une injection intra-tumorale de graisse humaine provenant de patiente pour voir son effet sur le développement du cancer du sein.

Nous respecterons la règle des 3R :

Je remplace les premiers tests de traitement par des essais *ex vivo* avant toute administration à la souris.

Je réduis le nombre d'animaux utilisés grâce à la formation du personnel aux outils statistiques, l'utilisation de protocoles validés et robustes issus de la bibliographie et la mutualisation des animaux et des techniques.

Je raffine en enrichissant l'habitat et en gérant le stress et la douleur des animaux.

Nombre d'animaux maximum nécessaires sur 5 ans est de 2601.

5955. La préservation de la masse et de la fonction musculaire est le gage d'une bonne santé à long terme. Différents travaux récents suggèrent que la citrulline est impliquée dans la régulation du métabolisme protéino-énergétique plus particulièrement musculaire. Cet acide aminé est un puissant activateur de la synthèse protéique musculaire et il a été montré, en particulier au cours du vieillissement, qu'il permet de préserver la masse protéique musculaire et de diminuer la masse grasse dans différents modèles expérimentaux et plus récemment chez l'homme. Ces effets ont été obtenus lors de l'administration de doses pharmacologiques de citrulline. Or, chez l'homme comme chez le rongeur, la citrulline est naturellement produite de façon quasi exclusive par l'intestin via une enzyme : l'Ornithine TransCarbamylase (OTC). Le rôle de cette production endogène de citrulline dans la régulation physiologique du métabolisme musculaire n'est pas connu.

Notre hypothèse de travail est que l'intestin, *via* la production intestinale de citrulline, participe au contrôle à long terme du métabolisme protéique musculaire. Pour tester cette hypothèse, il est possible, expérimentalement, d'inactiver de façon spécifique, et à un instant déterminé de la vie de l'animal, l'OTC intestinale en utilisant le système de recombinaison Cre-Lox.

L'objectif de ce travail est d'évaluer aux différents stades d'évolution de la fonction musculaire (2, 6, 12 et 18 mois) chez la souris les conséquences de l'inactivation de l'enzyme sur le muscle.

Ce projet sera réalisé chez des souris mâles C57BL/6J portant une inactivation conditionnelle de l'OTC intestinale, l'inactivation étant induite par l'injection de tamoxifène. Dans un premier temps, nous déterminerons chez ces souris la durée de cette inactivation. Dans un deuxième temps, nous évaluerons l'effet de cette inactivation prolongée de l'OTC à différents âges de l'animal sur le muscle. Des animaux non traités par le tamoxifène seront étudiés en parallèle. Enfin, dans un troisième temps, nous déterminerons si l'administration d'un régime enrichi en citrulline permet de corriger les différentes modifications induites par l'inactivation de l'OTC intestinale.

Compte-tenu de la variabilité de nos paramètres principaux de jugement, un effectif de 6 souris pour chaque condition expérimentale sera nécessaire pour l'analyse statistique soit un total de 306 animaux. Au cours de ces travaux, l'environnement des animaux sera enrichi. Une surveillance quotidienne de tous les animaux pendant la semaine suivant l'administration de tamoxifène puis hebdomadaire sera mise en place tout au long de l'expérimentation afin de dépister et le cas échéant de remédier à une

éventuelle souffrance animale. Une prise en charge de la douleur sera mise en place pour les procédures pouvant infliger une douleur. Les mises à mort seront réalisées par dislocation cervicale sous anesthésie.

Ce projet doit permettre d'évaluer l'importance de la synthèse endogène de la citrulline pour maintenir la fonction musculaire au cours de l'avancée en âge.

5956. Le Carcinome Hépatocellulaire (CHC) atteint environ 9000 personnes par an en France. Il s'agit d'un cancer primitif agressif, au 3ème rang des cancers en termes de mortalité, avec un nombre de décès annuels équivalent au nombre de nouveaux cas.

La majorité des cas de CHC se développe sur un foie cirrhotique. Bien que l'étiologie de la cirrhose soit variable, en France 70 à 85% des CHC sont la conséquence d'une maladie alcoolique du foie, elle-même induite par une consommation chronique d'alcool durant plusieurs années.

D'un point de vue thérapeutique, le CHC est très réfractaire à la chimiothérapie cytotoxique, d'où le développement depuis plusieurs années de thérapies dites ciblées. Ces thérapies visent directement les voies de signalisations impliquées dans les phénomènes de cancérogénèse. C'est le cas du Sorafenib, traitement de référence à l'heure actuelle lorsque le traitement à visée curative est contre-indiqué.

Cependant, l'utilisation du Sorafenib n'est indiquée que si la fonction hépatique est conservée tandis que des processus de résistances sont régulièrement décrits par les cliniciens. Face à ces limites et sachant que le Sorafenib est la seule molécule ayant une autorisation de mise sur le marché à l'heure actuelle, de nombreux essais cliniques sont en cours de réalisation pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques : le Regorafenib, la Pravastatine, le Sunitinib, la Doxorubicine Transdrug, ainsi que des anticorps (Ramucirumab, Nivolumab) sont actuellement testés, seuls ou en combinaison, dans le cadre du traitement du CHC.

Notre objectif est d'étudier les conséquences d'une exposition à l'alcool sur la réponse aux différents traitements chimiothérapeutiques du CHC utilisés en clinique, en s'intéressant à divers schémas d'alcoolisation retrouvés chez l'Homme :

- Maintien de la consommation d'alcool suite au diagnostic du CHC.
- Sevrage alcoolique suite au diagnostic du CHC.
- Consommation à risque d'alcool suite au diagnostic du CHC.
- Absence de consommation d'alcool suite au diagnostic du CHC.

Les résultats *in vitro* obtenus au sein de notre laboratoire suggèrent une modulation de l'efficacité du Sorafenib suite à une exposition des cellules cancéreuses à de l'alcool. Il s'agit de vérifier désormais si nos résultats sont retrouvés dans un modèle vivant du CHC, car seul celui-ci nous permettra de prendre en compte la réponse immunitaire et les effets multi-organes de l'alcool et du traitement ciblé. Pour cela nous proposons de travailler sur un modèle de xénogreffe murin de CHC connu dans la communauté scientifique et notre laboratoire.

Nos souris immunodéprimées recevront une injection de cellules de CHC. Cette technique courante dans la littérature permet le développement d'une masse indolore en 2 semaines environ.

Ces souris seront au préalable exposées à des injections d'alcool ou de solution saline durant 15 jours. Puis, suite à la greffe tumorale, de nouvelles injections auront lieu de manière concomitante au traitement. Le traitement correspond à un gavage des molécules effectrices (Sorafenib, Pravastatine, ...), ou de DMSO pour le contrôle.

Pour réduire au maximum la répétition de ces manipulations et donc le nombre d'animaux tout en gardant un effet statistique significatif, chaque groupe sera composé de 10 souris (cages de 5 individus). Chaque traitement sera testé sur un total de 8 groupes (80 souris). Cinq autres souris seront exposées uniquement à l'alcool pour vérifier les effets de l'alcool indépendamment du traitement. Les souris auront un accès illimité à la nourriture et à l'eau. L'enrichissement sera composé de litière foisonnante et d'une roue d'activité motrice.

Dans les conditions choisies, aucune douleur ne sera infligée suite à nos tests. Toutefois la souffrance des animaux sera évaluée 2 fois par semaine à l'aide d'une grille de notation pour s'assurer que celle-ci ne dépasse pas les points limites. En cas de souffrance l'expérimentateur habilité appliquera les soins appropriés, soit une réhydratation par injection de solution glucosée à 5%, ou l'euthanasie de l'animal si nécessaire.

Ce projet nécessite un total de 680 souris pour tester 8 traitements actuellement testés en clinique.

5957. Au cours de la recherche d'un candidat médicament, outre les études effectuées *in vitro* (identification des cibles moléculaires, effets en culture cellulaire ou sur des organes isolés..), un ensemble d'études *in vivo*, utilisant des animaux, est nécessaire pour s'assurer de l'efficacité (dose active sur un organe ou un tissu) et la sécurité d'emploi (dose maximale tolérée..). La réglementation internationale et française impose ces études pour constituer le dossier examiné par les autorités de santé, et elles doivent être obligatoirement conduites au moins dans deux espèces animales, dont une « non rongeur », avant toute étude clinique chez l'homme. L'objectif de ce projet est la réalisation des études de toxicologie et de pharmacologie, en vue d'une administration unique ou répétée d'un candidat médicament, chez les Primates non Humains.

Les statistiques d'utilisation des animaux montrent que peu d'études sont effectuées chez les Primates non Humains, pour respecter l'exigence de remplacement. Néanmoins ces animaux sont indispensables pour obtenir des résultats fiables pour la transposition à l'espèce humaine, lorsque l'organe ou le mécanisme physiologique ciblé par le médicament présentent des particularités propres aux Primates, qu'on ne trouve pas chez les autres espèces non rongeurs comme le porc ou le chien. Le concepteur de l'étude analysera la bibliographie et les données scientifiques préalables pour vérifier que le Primate non Humain est nécessaire, en particulier le macaque (*Macaca fascicularis* ou *Macaca mulatta*).

Les animaux seront soumis à des études qui respectent les recommandations internationales en vigueur (durée, paramètres étudiés...) : une ou plusieurs doses de la molécule seront administrées, puis des prélèvements sanguins ou des examens physiologiques pourront être effectués à des intervalles réguliers. Par obligation, la plupart des animaux seront mis à mort à la fin de l'étude pour procéder à des analyses histologiques post mortem. Si ce n'est pas le cas, les animaux pourront être inclus dans une autre étude après vérification par un vétérinaire de leur bon état de santé.

Du fait qu'un grand nombre d'études sont nécessaires, pour un grand nombre de produits, plusieurs voies d'administration et plusieurs doses, le nombre total d'animaux est estimé pendant les 5 ans du projet à 4480. Pour chaque étude néanmoins l'exigence de réduction sera respectée, en réduisant au minimum le nombre d'animaux par groupe ; des analyses statistiques seront conduites pour s'assurer de la fiabilité des observations. Un autre élément permettant de réduire le nombre d'animaux est l'effort porté sur leur homogénéité : pour cela la démarche commence dès l'approvisionnement auprès d'éleveurs et fournisseurs agréés, mais surtout par la maîtrise tout au long de leur vie de bonnes conditions d'environnement et d'entretien (alimentation adaptée, contrôle de la température des locaux, surveillance vétérinaire...).

Pour cela, une attention constante sera portée au bien-être animal : les animaux seront hébergés en lère intention en groupe sociaux sauf lorsque le schéma expérimental de l'étude ne le permettra pas et dans un environnement enrichi (volières équipées de balançoires et de jeux, occupation par des graines mêlées à la litière et friandises...) et sous supervision quotidienne. Les contraintes, comme un isolement pendant un examen ou une administration, seront réduites au minimum nécessaire.

En ce qui concerne le raffinement des procédures, nous veillerons aux techniques d'administration pour réduire l'inconfort des animaux et nous appliquerons des points limites précoces pour réduire la souffrance en cas de produits présentant une toxicité. La douleur sera prévenue avec une anesthésie et une analgésie appropriée, sous supervision vétérinaire constante. Une démarche qualité rigoureuse, une supervision de chaque lot d'étude par le directeur d'étude concerné, ainsi que des bilans réguliers impliquant les techniciens, permettront d'appliquer toute alternative respectueuse du bien-être animal. L'étroite collaboration des Directeurs d'études et de la Structure de Bien-Être Animal aura pour objectif de réduire les dommages en respectant la règle des 3R.

5958. Ce projet vise à étudier sur un modèle préclinique, les troubles psychiques tardifs survenant à la suite d'un traumatisme crânien (TC), en particulier l'anxiété et la mémoire dans l'état de stress post-traumatique (ESPT). La prévalence de l'ESPT dans la population TC est importante et l'un des symptômes majeurs de cette maladie est l'incapacité à éteindre les mémoires de peur.

L'objectif du projet est d'induire un TC chez la souris et d'évaluer les déficits comportementaux ainsi que différents marqueurs cérébraux (c.-à-d. inflammation, substance blanche, modifications dans l'expression des gènes). Ces études permettront de valider nos modèles d'un point de vue comportemental et neurobiologique, afin de se modéliser les données cliniques observées chez les patients traumatisés crâniens qui développent troubles psychiatriques, ceci dans le but de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Ces approches sont indispensables, car les molécules précédemment développées en préclinique pour protéger le cerveau ont toutes été des échecs lors de leur passage en clinique. Or, les critères étudiés en préclinique étaient par exemple la mort neuronale évaluée à court terme (moins d'une semaine après le TC), alors que les évaluations cliniques reposent sur des évaluations comportementales évaluées à long terme. Ainsi, afin d'augmenter la prédictibilité de nos modèles, il est nécessaire d'étudier chez l'animal autant les déficits physiques que psychiques à long terme (c'est à dire plusieurs semaines ou plusieurs mois après le TC).

Le TC expérimental, induit grâce à un appareil contrôlé par ordinateur, permet de limiter l'étendue de la blessure cérébrale. Les études seront réalisées sur 315 souris C57BL6/J sur 5 ans, dont 105 souris témoins et 210 souris qui seront anesthésiées puis soumises à la chirurgie nécessaire pour le TC. L'observation régulière du comportement des animaux en relation avec des points limites permettra de limiter toute souffrance et douleur. Ce modèle expérimental très reproductible n'entraîne qu'une très faible mortalité, réduisant le nombre d'animaux. Nous utiliserons le modèle de la peur conditionnée pour modéliser l'incapacité à éteindre les mémoires de peur (3 semaines post-TC). Pour mimer l'ESPT chez l'animal, cette procédure utilise pendant quelques secondes un stimulus induisant une réponse de peur innée qui ensuite est couplée à un son émotionnellement neutre. Les déficits de nature anxieuse et cognitive seront évalués par les réactions au son conditionné ainsi que dans 3 tests d'exploration spatiale (1 ou 3 mois post-TC).

A terme, nos objectifs sont de développer des stratégies pharmacologiques pour la prise en charge des séquelles physiques et psychologiques post-TC. Ce projet s'inscrit dans une thématique plus large de notre laboratoire, qui évalue l'intérêt thérapeutique de la minocycline, un antibiotique, mais également un anti-inflammatoire.

5959. Notre projet a pour but de caractériser les propriétés de la muqueuse nasale d'un modèle de rat pour la mucoviscidose.

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies rares. Dans la population caucasienne, la maladie représente environ une naissance sur 4500. Il s'agit d'une maladie mortelle qui touche principalement les poumons, le pancréas, l'intestin, les glandes sudoripares et qui s'exprime dès la petite enfance avec une prise en charge lourde et onéreuse. La mucoviscidose est une maladie génétique due aux mutations du gène *cftr* (cystic fibrosis transmembrane protein). Les progrès importants dans la prise en charge des symptômes de la maladie et les possibilités de transplantations d'organes ont conduit à une augmentation importante de leur espérance de vie chez ces patients. Les modèles animaux ont largement participé à la connaissance de la pathologie. Les modèles souris expriment certaines caractéristiques de la pathologie, notamment des obstructions intestinales sévères, mais ils ne présentent pas de manifestations pulmonaires. Or c'est l'insuffisance pulmonaire chez l'humain qui est la principale cause de mortalité.

Des études précédentes ont montré que le rat peut représenter un modèle intéressant pour le phénotype respiratoire de la mucoviscidose. Un rat knock-out (KO) pour le gène *Cftr* (MUKORAT) a donc été développé. Pour cela, une approche génétique

moderne a été utilisée. Les mukorats ne produisent donc pas la protéine CFTR et devraient mimer l'atteinte due à la mucoviscidose. Les premiers mukorats ont été obtenus et ont besoin d'être caractérisés.

L'objectif du projet est de caractériser les répercussions du KO au niveau de la membrane nasale par l'étude des modifications de la différence de potentiel (DDP) nasal. Il existe en effet des modifications électrophysiologiques au niveau de cette muqueuse que l'on retrouve chez l'Homme. Pour cela, une petite aiguille servant d'électrode sera mise en place sous la peau du dos, et une électrode sera posée sur la muqueuse nasale. Cet examen, réalisé sous anesthésie, est peu invasif et peu douloureux. Une fois les enregistrements réalisés, les animaux seront euthanasiés et les organes seront récupérés pour des expériences *ex vivo* et des analyses ultérieures.

Le nombre d'animaux nécessaires pour le projet a été déterminé à partir des données obtenues chez la souris de manière à limiter au maximum le nombre de rats utilisés pour avoir des informations exploitables. Le projet devrait nécessiter au maximum 27 animaux.

Une attention particulière sera apportée à la gestion de la souffrance des rats par des moyens antalgiques de manière à la réduire au maximum.

Les résultats de cette étude devraient permettre de valider la mesure de la DDP chez le rat comme un modèle d'étude de la mucoviscidose. Ce nouveau modèle de rat devrait pouvoir fournir des informations sur les mécanismes de la pathologie, complémentaires de celles obtenues chez la souris, et servir comme modèle préclinique pour tester de nouvelles stratégies afin de traiter la mucoviscidose. L'objectif est à terme de pouvoir appliquer ces nouvelles stratégies au traitement de la mucoviscidose chez l'homme.

5960. Ces dernières décennies ont vu une augmentation significative de l'espérance de vie globale mais peu de l'espérance de vie en bonne santé. Ainsi, le vieillissement de la population s'accompagne d'un accroissement du nombre des personnes dépendantes ou à risque de le devenir. Un des déterminants majeurs de la dépendance est la sarcopénie, c'est-à-dire la perte progressive de masse et de force musculaires, fréquente avec l'avancée en âge. Elle résulte d'une fréquence accrue de dénutrition (liée à l'anorexie, la carence d'apport protéique, l'inflammation chronique ...) et d'une résistance du muscle à la renutrition. La sarcopénie est responsable d'une détérioration de la qualité de vie du fait de la dépendance à laquelle elle conduit mais constitue également un facteur de risque de complications. La préservation ou la restauration de la fonctionnalité musculaire est devenue ainsi un enjeu de santé publique.

L'efficacité des stratégies nutritionnelles proposées jusqu'à maintenant pour lutter contre la sarcopénie reste à démontrer. Il a déjà été montré chez le jeune rat adulte que l'administration d'un dérivé de la citrulline, la N-carbamoyl-putrescine (NCP) était associée à une augmentation du contenu protéique musculaire. Cependant, son efficacité en situation de vieillissement et de dénutrition n'a encore jamais été évaluée.

Notre hypothèse de travail est que la NCP pourrait être un outil intéressant lors de la renutrition du sujet âgé pour améliorer la masse musculaire en stimulant la synthèse des protéines musculaires.

Notre objectif est donc d'évaluer l'action de la NCP sur le métabolisme protéique, et plus particulièrement sur les processus de synthèse et dégradation des protéines musculaires, dans un modèle de dénutrition suivie d'une semaine de renutrition chez le rat âgé de 20 mois.

Pour cela, des rats âgés de 18 mois seront soumis à 6 semaines de dénutrition induite par une restriction alimentaire à 50 % des apports spontanés [modèle maîtrisé au laboratoire]. A l'issue de la dénutrition, un groupe d'animaux sera mis à mort et servira de témoin de dénutrition. Les autres groupes seront renourris pendant 5 jours avec une alimentation standard, seule ou associée à de la NCP. Pendant ces 5 jours, les animaux seront placés en cage à métabolisme pour permettre le suivi des apports alimentaires et le recueil urinaire pour explorer la dégradation protéique (bilan azoté et 3-méthylhistidine urinaire). Avant leur mise à mort après anesthésie, les animaux recevront une injection de puromycine pour la mesure de la synthèse protéique. Une surveillance quotidienne de tous les animaux sera mise en place tout au long de l'expérimentation afin de dépister et le cas échéant de remédier à une éventuelle souffrance animale. Un total de 48 animaux sera nécessaire pour permettre l'analyse statistique des résultats.

Si ces travaux montrent une amélioration significative du métabolisme protéique dans ce modèle de sarcopénie, cela pourrait nous permettre de proposer une solution nutritionnelle innovante dans le domaine de la prévention et/ou la limitation de la fonte musculaire liée à l'âge.

5961. La formation du personnel est nécessaire et obligatoire dans le cadre de nos activités de contrôle qualité des vaccins qui requièrent des tests *in vivo*, imposés par les différentes pharmacopées. Cette formation ne peut pas être effectuée sans le recours à l'animal de laboratoire. Ce projet a pour objectif d'encadrer la formation des nouveaux techniciens animaliers et les réévaluations régulières des personnes déjà formées aux manipulations « *in vivo* » standards sur la souris, le rat, le cobaye, le lapin, et le furet, sous la responsabilité de manipulateurs référents expérimentés (système de compagnonnage). Ce système de formation permet aux personnes en charge des gestes techniques d'être parfaitement formées et compétentes et de travailler de façon harmonisée.

Ce projet pourrait engendrer l'utilisation d'au maximum 7 5000 souris, 200 rats, 15 000 cobayes, 50 lapins et 15 furets sur une période de 5 ans. Le degré de sévérité est considéré comme léger pouvant aller jusqu'à modéré pour la formation des personnes débutantes ne maîtrisant pas certaines techniques ou pour certains gestes plus invasifs.

Chaque animal est observé au moins une fois par jour durant toute la durée de la formation. La prise en charge d'un animal ayant des signes de maladie est assurée par un vétérinaire. L'ensemble des animaux est euthanasié selon des méthodes recommandées par la réglementation et approuvées par le Comité d'Éthique (CE) et la Structure de Bien-être Animal (SBEA).

Mise en œuvre des 3R

Remplacement :

Il est incontournable d'utiliser des animaux vivants afin de se former aux techniques d'injection et de prélèvement et ainsi, de pouvoir observer qu'aucun impact clinique n'est constaté suite à la réalisation de ces gestes techniques. Tous les gestes techniques ont été revus et sont approuvés par la SBEA.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés sera raisonné selon le nombre de personnes à former, l'expérience de ces personnes, le nombre de techniques à apprendre, la difficulté technique, le nombre de techniques réalisables sur un même animal et sur la base des expériences terrain comme étant le minimum pour s'assurer que la personne formée maîtrise les gestes techniques. Dans la mesure du possible, des animaux issus d'autres procédures classées en catégories légère ou modérée pourront être utilisés pour ces formations.

Raffinement :

Des moyens sont entrepris au niveau du projet ou des procédures pour réduire le stress et le niveau de souffrance : anesthésies raisonnées pour certaines techniques, choix des techniques en fonction de l'avantage expérimental procuré par rapport à la souffrance occasionnée. Un programme d'enrichissement est en place pour toutes les espèces.

5962. L'exposition des populations aux iodes radioactifs rejetés lors d'accidents de réacteur d'une centrale nucléaire peut être responsable, en l'absence de mesures de protection adaptées, de l'apparition de cancers de la thyroïde, en particulier chez les nourrissons et les jeunes enfants. Les conséquences sanitaires peuvent néanmoins être limitées par la mise en œuvre de mesures de protection, telles que la mise à l'abri des populations, leur évacuation, la mise en place de restrictions de consommation alimentaire et enfin, l'ingestion de comprimés d'iode stable. Décidée en France sous l'autorité du préfet, l'ingestion d'iode stable doit intervenir idéalement deux heures avant l'exposition au panache radioactif ou à défaut, au plus tard dans un délai de 24 heures pour être pleinement efficace. Cette mesure préventive a pour objectif de saturer la glande thyroïde par de l'iode non radioactif et d'éviter ainsi la fixation des iodes radioactifs. Toutefois, la récente catastrophe de Fukushima a fait resurgir des interrogations sur les conditions de mise en œuvre de la prophylaxie par l'iode stable. En effet, cet accident a montré que la « doctrine iode » qui préconise à ce jour une prise unique de comprimés d'iodure de potassium ne peut protéger de manière satisfaisante les populations exposées à des rejets répétés d'iodes radioactifs. Ainsi, si la doctrine actuelle envisage l'éventualité d'une deuxième prise, notamment en cas d'impossibilité d'évacuation rapide des populations, elle ne donne à ce jour aucune indication quant aux conditions de mise en œuvre de prises répétées d'iode stable. De plus, sur le plan strictement réglementaire, l'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) des comprimés d'iodure de potassium ne permet pas d'envisager des prises réitérées, cette AMM ayant été délivrée pour une prise unique d'iode stable à renouveler une fois seulement. Ainsi, les autorités sanitaires se trouvent démunies face à des situations de rejets chroniques d'iodes radioactifs en raison du déficit de connaissances quant aux modalités d'administration répétée d'iode stable.

Le présent projet de recherche propose de déterminer les modalités d'administrations répétées d'iode stable en situation de rejets radioactifs chroniques, de faire évoluer l'actuelle autorisation de mise sur le marché des comprimés d'iodure de potassium dosés à 65 mg, et enfin d'évaluer les effets indésirables d'administrations répétées d'iode stable sur les grandes fonctions physiologiques de l'organisme. Les expérimentations seront réalisées sur le rat Wistar qui constitue un des modèles de référence pour les études de pharmacologie et de toxicologie de l'iode. Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale. Articulé autour de sept protocoles expérimentaux différents à réaliser sur cinq ans, ce projet nécessite un nombre maximal de 2172 animaux.

Les résultats issus des travaux mis en œuvre dans le cadre de ce projet permettront à termes de proposer aux autorités sanitaires de nouvelles solutions opérationnelles pour la prévention des expositions aux iodes radioactifs et bénéficieront ainsi à l'évolution de la « doctrine iode ». De plus, les nouvelles recommandations françaises issues de ces travaux scientifiques innovants pourront faire évoluer les « doctrines iode » au niveau international avec pour bénéfice une harmonisation des pratiques en la matière.

5963. Pour évaluer la sécurité des produits chimiques sur la santé humaine, différentes études sont nécessaires et elles combinent des modélisations mathématiques par ordinateurs (études *in silico*), des modèles cellulaires (tests *in vitro*) et des modèles animaux (études *in vivo*). L'objectif est de ne soumettre à autorisation que des produits dont le profil toxicologique garantit l'absence d'effets néfastes sur la santé humaine.

Ce projet comprend une série d'études permettant d'évaluer la toxicité, et de fournir des informations sur les dangers pour la santé qui peuvent résulter d'une exposition à une substance d'essai par voie orale pendant une période courte ou moyenne. En effet l'exposition à un composé est souvent multiple (doses répétées) et peut produire des effets immédiats ou plus tardifs (par accumulation de la substance d'essai ou par sa biotransformation par exemple).

Les objectifs de ces études sont de déterminer et d'évaluer le potentiel toxique d'un composé pour :

- Chercher des effets ou constater l'absence d'effets toxiques,
- Déterminer la concentration sans effet nocif observé,
- Identifier des organes cibles et évaluer les changements biologiques provoqués par l'administration du produit,
- Évaluer la concentration plasmatique du produit et de ses métabolites, et de certains biomarqueurs,
- Évaluer le profil de bioaccumulation du produit dans certains organes,
- Apporter des informations sur la sélection des doses pour les études ultérieures.

Ces études d'une durée inférieure ou égale à 90 jours permettent de définir les doses qui pourront être utilisées dans des études chroniques sans induire d'effets sévères. Toutes ces études se font en général par voie orale, de préférence mélangé à la nourriture pour mimer l'exposition humaine. Elles peuvent néanmoins être faites par gavage afin d'évaluer la quantité exacte administrée. Il existe également des groupes additionnels dans certaines études pour évaluer la persistance ou la réversibilité des effets après arrêt de l'exposition.

Toutes ces études se font dans le respect des 3Rs avec un nombre restreint d'animaux. Un total estimé de 1100 rats et 600 souris pourront être utilisés chaque année pour tester environ 20 molécules différentes, pour un total de 8500 rongeurs sur 5 années pour ce projet. Les animaux seront hébergés par groupe (ou individuellement, temporairement ou si nécessaire dans le cas des études d'environ 28 jours) avec un enrichissement du milieu adapté à leur âge et à leur espèce. Les animaux sont observés tous les jours (week-ends compris). Des points limites ont été définis par le laboratoire, conditionnant l'appel à un vétérinaire du site. A la fin de chaque étude, une évaluation rétrospective sur le bien-être animal est réalisée par la structure du bien-être animal et le comité d'éthique.

5964. Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAS) est le trouble respiratoire nocturne le plus fréquent dans la population. Il se caractérise notamment par une hypoxie intermittente et il est aujourd'hui reconnu que la principale complication du SAS est sa morbi-mortalité cardiovasculaire.

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que le SAS était un facteur de risque de complications cardiovasculaires (i.e. hypertension artérielle, maladie coronarienne, insuffisance cardiaque et accident vasculaire cérébral), mais aussi rénales.

L'obésité et le SAS sont des pathologies étroitement associées, avec une prévalence de SAS chez des patients obèses supérieur à 30%, et une prévalence d'obésité chez des patients SAS d'au moins 60%

Il existe aujourd'hui un intérêt croissant dans les potentielles interactions entre SAS et obésité dans le développement des complications cardio-métaboliques, notamment par l'intermédiaire des propriétés sécrétoires du tissu adipeux viscéral. Ce tissu a la capacité de sécréter de nombreux médiateurs de l'inflammation qui pourraient contribuer au lien étroit entre obésité et pathologies cardiovasculaires dépendantes de l'obésité. De récents travaux montrent que l'hypoxie, per se, induit des altérations du tissu adipeux.

Ainsi, l'objectif de ce projet est d'étudier les effets conjoints de l'hypoxie intermittente et de l'obésité sur les altérations des différents territoires adipeux et de déterminer l'impact de ces altérations sur la fonction cardiaque et rénale dans un modèle murin. Il n'est pas possible de réaliser notre étude dans un modèle autre qu'animal au vu des altérations et modifications systémiques que nous nous attendons de voir.

Pour la demande de prolongation de cette étude, nous souhaitons utiliser 50 nouvelles souris C57bl6, mâles, âgées de 4 semaines au début du protocole. Les souris seront réparties en 4 groupes obèses et non obèses, soumises à l'HI ou non. Le calcul de nos effectifs est réalisé de manière à utiliser le moins d'animaux sans altérer la puissance et la fiabilité de nos tests statistiques.

Les procédures expérimentales utilisées pour ce projet n'apporteront aucune souffrance à l'animal.

Les animaux seront hébergés en groupes, dans un environnement enrichi et leur bien-être sera vérifié quotidiennement. La mise en place d'un régime riche en graisses n'entraîne pas de souffrance ou douleur particulière et les animaux s'adaptent rapidement à l'exposition à l'hypoxie intermittente.

5965. Le produit X que nous allons étudier est un médicament innovant qui vise à soigner un organe ou un organisme par l'apport de cellules (thérapie cellulaire). Le développement clinique de ce produit doit être préalablement validé par des études cliniques, comportant deux phases : l'effet thérapeutique et l'évaluation de la sécurité du produit pour le traitement des leucémies lymphoïdes (cancer du sang).

Au vu de l'intérêt thérapeutique que le produit représente, des études réglementaires permettant d'évaluer la pharmacodynamie primaire (validation modèle et preuve de concept) ainsi que la sécurité du produit (biodistribution, toxicologie et tumorigénicité) sont nécessaires chez l'animal avant son utilisation chez l'homme.

La stratégie se décompose en 2 phases.

La phase I étape 1, consistera en une étape préliminaire de validation du modèle avec deux lignées tumorales humaines bioluminescentes ou non injectées en sous-cutanée. Il sera effectué un pré-test sur la cinétique de développement tumorale par mesure de la taille de la tumeur quotidiennement jusqu'à J45 au pied à coulisse, complété par la caméra de bioluminescence pour les cellules bioluminescentes. Elle servira également à valider les méthodes d'analyse. La phase I étape 1 nécessitera 16 animaux (8M et 8F).

La phase I étape 2 correspond à la mise en œuvre de la preuve de concept et sa réalisation. Cette phase consiste à faire la démonstration de l'effet thérapeutique du produit X sur les 2 lignées tumorales bioluminescentes. Les conditions seront : groupe 1 : contrôle (cellules tumorales marquées seules), groupe 2 : produit X (3 doses testées), groupe 3 : anticorps seul, groupe 4 : produit X (3 doses) + anticorps, groupe 5 : dose répétée de produit X et groupe 6 : dose répétée de produit X + anticorps. La phase I étape 2 nécessitera 112 animaux.

La phase II sera adaptée en fonction des résultats de la phase I et constituera l'évaluation de la sécurité du produit. Elle se déroulera en 7 groupes : groupe 1 : dose de produit X, groupe 2 : dose de produit X + anticorps A seul, groupe 3 : anticorps A, groupe 4 : dose de produit X + anticorps B, groupe 5 : anticorps B seul, groupe 6 : dose répétée de produit X et groupe 7 : dose répétée de produit X + anticorps A. La phase II nécessitera 112 souris.

La réduction sera respectée en adaptant le nombre exact d'animaux après les résultats de la phase I. Ainsi le nombre d'animaux de la phase II pourra être modulé. Au total, les deux phases réunies nécessiteront au maximum 240 rongeurs.

Tous les animaux seront hébergés selon le décret 2013/118. De l'enrichissement tel que des morceaux de bois et du sopalin seront systématiquement mis dans les cages. Une surveillance quotidienne par le personnel de zootechnie sera effectuée pour mettre en évidence rapidement tout signe clinique susceptible d'altérer le bien-être des animaux. Ainsi, les animaux seront anesthésiés durant l'étape d'implantation tumorale. Les animaux seront euthanasiés dès l'apparition de signes de douleurs dues à la tumeur ou à ses métastases. Une taille limite tumorale sera fixée (>1500mm³). Le suivi de croissance tumorale via une caméra de bioluminescence permettra également d'être plus précis dans l'évaluation de la souffrance animale.

5966. L'autisme est un trouble précoce du développement qui s'accompagne généralement de déficits cognitifs altérant les apprentissages et l'intégration sociale. Si à l'heure actuelle l'autisme ne se guérit pas, différents médicaments peuvent aider à réduire les comportements répétitifs, l'hyperactivité, l'agressivité, les troubles de la mémoire ou du comportement social. Au sein de notre laboratoire, nous travaillons sur un gène de susceptibilité lié à l'autisme : le gène SHANK3. Ainsi des mutations du gène SHANK3 entraînent des troubles du comportement social et des déficits cognitifs qui rappellent les traits caractéristiques de l'autisme. Nous nous proposons donc d'étudier le rôle de Shank3 dans la mise en place du comportement social et des réseaux neuronaux de l'hippocampe. Nous utiliserons une lignée de souris mutante : la lignée « Shank3flox/flox » dont le gène SHANK3 est muté.

Notre projet repose sur une approche intégrée nécessitant le fonctionnement du cerveau dans son intégrité ce qui reste encore impossible à modéliser. Par conséquent, nous pensons qu'il n'existe pas de remplacement disponible à notre modèle expérimental qui permettrait d'atteindre les objectifs scientifiques du travail proposé.

Pour supprimer l'angoisse, la détresse ou la douleur subie par les animaux au cours de l'expérience, les animaux sont élevés en cage collective enrichie, observés quotidiennement et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place. Nous considérons qu'un nombre minimum de 15 animaux est nécessaire pour chaque condition expérimentale. Nous utiliserons dans ce projet une lignée de souris transgéniques à quatre stades de développement et ceci pour deux structures cérébrales différentes. Les animaux subiront ensuite des tests comportementaux afin d'évaluer leur comportement social et leur mémoire de reconnaissance. Notre projet portera donc sur 16 lots de souris et nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 420 souris.

5967. L'infection par les Salmonelles (*Salmonella enterica Enteritidis*) est pratiquement asymptomatique. Cependant, les bactéries colonisent durablement le tractus intestinal des poulets ou peuvent se disséminer à tous les organes du corps (dissémination systémique), notamment les ovaires des jeunes poulettes. Les viandes sont contaminées lors de l'abattage par la libération des Salmonelles présentes dans le tube digestif. Les œufs peuvent-être contaminés soit en surface, soit directement *in ovo* lors de leur formation. Cette contamination des aliments est responsable de gastro-entérites parfois très graves chez l'homme. Afin de limiter le risque de transmission à l'homme un effort important est fait pour éliminer ces souches de Salmonelles des élevages.

Les jeunes animaux sont les plus sensibles à l'infection et chez eux la dissémination systémique est maximum. A ce stade de la vie, le système immunitaire est encore considéré immature, rendant les animaux très sensibles à ce type d'affection. A l'heure actuelle il est difficile ou interdit de prévenir l'infection par les salmonelles par un traitement antibiotique. Ceci augmenterait le risque de générer des souches résistantes aux antibiotiques et le risque de contaminer les aliments. Notre laboratoire développe un immunostimulant innovant capable de stimuler rapidement, et de manière aspécifique, le système immunitaire des animaux dès la naissance afin de prévenir les conséquences des maladies infectieuses. L'efficacité de ce candidat produit a été initialement démontrée chez l'agneau et nos résultats récents ont démontré un effet immunostimulant chez les poussins. C'est pourquoi nous souhaitons étudier l'efficacité de ce produit comme un agent préventif de l'infection à salmonella chez la poule pour proposer une nouvelle solution préventive non chimique et limiter les risques de contamination humaine.

Ces expérimentations seront échelonnées sur une durée de 1 an. L'efficacité de l'immunostimulation a été préalablement testé *in vitro* (remplacement), néanmoins, l'infection par les salmonelles requiert une dissémination systémique de la bactérie qui ne peut-être modélisée *in vitro*, il n'est donc pas possible d'employer seulement une méthode de remplacement pour estimer les effets de l'immunostimulation. Afin d'établir cette preuve d'efficacité, nous devons conduire un test préclinique sur 240 poulets (poule pondeuse, compte tenu des critères de l'étude seules les femelles seront utilisées, soit un total de 600 œufs mis en incubation). Il s'agit du nombre minimum d'animaux nécessaire à obtention d'une bonne représentativité statistique (Réduction).

Lors de l'euthanasie, un maximum d'organes et de prélèvement seront effectués afin de s'assurer de ne pas avoir à reproduire l'expérience. D'autre part les animaux seront élevés en présence d'enrichissement et seront manipulés au minimum pour limiter leur stress. Il n'y a pas de prélèvement *in vivo* sur les animaux vigiles. Les méthodes analytiques choisies sont sensibles et quantitatives, elles permettent d'améliorer la qualité des analyses et de minimiser les prélèvements (Raffinement). Les animaux sont hébergés en box agrémenté de litière et un enrichissement avec des objets métalliques est également prévu (objet non contondant et suffisamment gros pour ne pas être ingéré). Des petites cages seront mises à disposition pour permettre aux animaux le désirant de s'isoler ou de se percher.

De plus, toutes les procédures de ce projet sont sans douleur et sans stress. Ainsi la règle des 3R est pleinement respectée.

En fin d'expérimentation, les animaux seront euthanasiés selon les procédures éthiquement recommandées, les mâles seront réemployés et expédiés chez un partenaire de la société civile.

5968. Les autorités de santé demandent la démonstration de l'activité et de l'identité virale des lots commerciaux de chaque vaccin *via* des contrôles qualité qui ont pour finalité l'autorisation de mise sur le marché (AMM). De ce fait, la sécurité des lots de vaccins peut être évaluée sur des modèles animaux.

Le projet a pour objectif de qualifier le personnel à la technique d'efficacité par épreuve rage sur espèce alternative (souris). Cette technique vise à être en conformité avec les exigences réglementaires de la Pharmacopée Européenne et des pays tiers destinataires, dans la constitution d'un dossier d'AMM pour un vaccin.

Former et qualifier du personnel compétent pour utiliser les modèles rongeurs permet de garantir une commercialisation de vaccins efficaces et sûrs qui protègent l'animal de la maladie.

Les animaux peuvent présenter une légère augmentation de stress due aux injections et aux manipulations.

Les animaux témoins montrent les symptômes sévères liés aux maladies testées. Des points limite spécifiques aux pathologies sont appliqués.

La période de formation/qualification est supervisée par du personnel formé et compétent.

Les tests de contrôle qualité permettent la libération d'un nombre important de doses de vaccins qui protègent les animaux, et indirectement, l'homme, contre la rage.

Pour former et qualifier 10 personnes sur une période de 5 ans, nous utiliserons au maximum 2830 souris.

La Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays tiers destinataires du produit exigent des tests sur animaux pour l'AMM. Il n'est actuellement pas possible de les remplacer sans un changement de la réglementation de ces pays.

Le nombre d'animaux est défini au plus juste selon la pharmacopée correspondant à l'activité du vaccin rabique inactivé pour usage vétérinaire.

Des points limites spécifiques aux pathologies sont déterminés pour les témoins non vaccinés. Le personnel vérifie l'évolution de l'état général et si les points limites spécifiques sont atteints, la souris est euthanasiée. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort.

Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être.

Tous les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements adaptés du milieu ont été mis en place dans les hébergements.

La Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

5969. En conséquence du vieillissement, de divers traumatisme ou accidents ou des maladies osseuses (comme l'ostéoporose), le nombre de fracture et de traumatismes osseux augmente considérablement en particulier dans les pays les plus industrialisés où il soulève un problème de santé publique. Dans le domaine de la régénération du tissu osseux, alors que la reconstruction de défauts osseux de taille faible à modérée en utilisant des substituts osseux classiques est techniquement réalisable, la reconstruction de défauts de grand volume reste difficile en raison d'un manque de vascularisation. Ainsi, le développement de nouveaux biomatériaux apparaît nécessaire. La technique d'imagerie utilisée couramment pour suivre la réparation osseuse est le scanner-CT, car le tissu osseux est dense, et suite à un trauma ou pathologie, la densité osseuse est en général altérée. L'inconvénient de cette technique est l'utilisation de rayonnements ionisants, qui peut empêcher le suivi longitudinal des patients. Une recommandation de l'Autorité de Sûreté Nucléaire (n°2011-DL-0019) a demandé à réduire l'utilisation de scanner-CT au vue de l'utilisation de radiations ionisantes pouvant altérer la santé des patients. L'IRM est devenue au cours des années 1980 et 1990 un outil de plus en plus utilisé pour le diagnostic médical, grâce à sa bonne résolution spatiale (submillimétrique), son caractère non-traumatique et sa grande variété de contrastes (T1, T2, diffusion, IRM fonctionnelle, etc...). Notre projet consiste à suivre par IRM la dégradation des biomatériaux au cours du temps, et d'évaluer la néo-angiogenèse se formant dans le nouveau tissu osseux. Pour cela, une séquence anatomique sera utilisée permettant de détecter les biomatériaux en hyper signal comparé au tissu osseux sain sera utilisée. De plus, suite à une injection intraveineuse d'un agent de contraste clinique, des images successives seront acquises. Trois différents matériaux synthétiques déjà utilisés au sein d'un laboratoire collaborateur seront implantés au niveau condylien chez 12 rats adultes sous anesthésie générale. Le suivi IRM des animaux se fera sur 5 semaines. Le nombre de rats reste modéré car une seule patte arrière par rat sera opérée (l'autre patte servant de contrôle direct), et seulement 4 rats par condition seront utilisés (ce qui est le minimum pour effectuer des statistiques). Les animaux seront gardés dans trois cages séparées, contenant des bâtonnets de bois à ronger, matériaux de construction de nid, coton, maisonnette, tubes en carton, de la paille, de la nourriture et de l'eau à volonté. Si certains rats sont en état de souffrance, ils pourront être séparés et placés dans des cages individuelles. De plus, l'administration d'un analgésique pourra être envisagée. L'état de santé des animaux sera suivie bi hebdomadairement.

5970. Les maladies infectieuses et plus particulièrement celles qui sont développées à la suite de soins (maladies nosocomiales) correspondent à une problématique majeure de santé publique. Parmi ces maladies infectieuses, les infections fongiques sont de plus en plus fréquentes. Elles sont pour la plupart opportunistes et de gravité importante (mortalité évoluant entre 10 et 50% des cas).

Le diagnostic de maladies fongiques repose sur différents critères : signes cliniques, radiologiques, facteurs de risque associés et sur les résultats de tests biologiques. L'utilité des tests biologiques est d'autant plus grande que certaines infections présentent peu ou pas de signes cliniques caractéristiques. Un large panel de tests biologiques existe de la PCR, à la culture de prélèvements et à la recherche d'antigènes/anticorps spécifiques dans le sang des patients. La recherche d'anticorps circulants fongiques spécifiques fait donc partie de ce panel de tests et est un marqueur simple et d'une grande fiabilité chez les patients immunocompétents.

Pour la recherche de ces anticorps circulants (anti-Candida, anti-Aspergillus anti-Fusarium, anti-Scedosporium...), nous avons besoin d'antigènes spécifiques qui se présentent sous la forme invasive (une culture de ces agents fongiques ne permet pas d'obtenir des antigènes de bonne qualité). En conséquence il n'est pas possible de remplacer la production de ces antigènes par une technique *in-vitro*. Pour obtenir ces antigènes, une infection expérimentale massive est nécessaire pour permettre la production

tissulaire d'antigènes invasifs (rein, foie, rate, autres viscères en fonction de l'agent fongique) et ceci avant que la maladie se dissémine et soit létale.

Pour cela, les différentes expérimentations suivront le même schéma expérimental. Des lapins, deux par lot de production d'antigène, nous permettront d'obtenir assez d'antigène pour une durée supérieure à un an. Ces derniers seront infectés par voie intraveineuse d'une suspension de spores fongiques standardisées grâce à une culture fongique. La préparation de la suspension de spore sera réalisée de manière stérile afin d'éviter toute contamination. L'infection sera réalisée après administration de myorelaxant pour limiter au maximum le stress et la douleur des animaux. Ce geste d'infection est le seul geste réalisé sur animal vivant. Si, malgré la simplicité de ce protocole, l'animal présente un événement inattendu (choc septique, choc anaphylactique, douleurs inattendues définies comme limites), l'animal sera sorti du protocole et soigné par la vétérinaire.

L'obtention d'antigènes se fera avant toute souffrance chez l'animal vers le 3/4ème jour après infection. Nous serons amenés à renouveler cette manipulation un maximum de 12 fois en 5 ans soit un maximum de 24 lapins pour ce projet.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérés grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant / anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont stabulés dans des box individuels équipés de paroi transparente pour qu'ils puissent se voir ainsi que des plateformes de repos. Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum", de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

5971. Cette demande d'autorisation à expérimenter concerne un projet de recherche fondamental d'ordre générique, à savoir l'étude des neuropathies auditives. Dans ce projet, il s'agit de décrire un protocole expérimental général qui s'appliquera à différentes lignées de souris transgéniques sélectionnées en fonction de leur utilité pour comprendre la physiopathologie des neuropathies auditives et faciliter le développement d'outils thérapeutiques. Certains de ces modèles animaux sont déjà identifiés et ont fait l'objet d'autorisations officielles (comité d'éthique) antérieures; d'autres ne seront retenus qu'ultérieurement.

Les neuropathies auditives sont des surdités qui se traduisent par une absence ou une désynchronisation des potentiels auditifs évoqués, c'est-à-dire une altération du transfert du message nerveux le long de la voie auditive jusqu'au cerveau. Il existe différents types de neuropathies auditives chez l'homme. Elles ont pour origine une atteinte des cellules sensorielles, les ciliées internes, de la cochlée (organe sensoriel de l'audition) ou du nerf auditif. Les mécanismes de ces pathologies sont mal connus. Pour élucider les mécanismes à l'origine de ces pathologies, nous utiliserons plusieurs lignées de souris transgéniques reproduisant différentes formes de neuropathies auditives humaines. L'étude expérimentale chez ces animaux consistera à explorer l'évolution de la fonction auditive chez des souris de différentes lignées, âgées de 1, 3 et 6 mois, et de la comparer à celle de souris témoins du même âge, ne développant pas de pathologie auditive.

Les tests auditifs consisteront à évoquer et mesurer les activités électriques des cellules ciliées internes et du nerf auditif en réponse à des stimulations acoustiques, ou avec des stimulations galvaniques si les stimulations sonores sont inefficaces (en cas d'atteinte sévère des cellules ciliées internes). Pour cela, différentes techniques seront employées : les potentiels évoqués auditifs, qui repose sur l'utilisation d'électrodes cutanées, l'électrocochléographie, qui repose sur l'utilisation d'électrodes déposées chirurgicalement au contact de la cochlée et l'enregistrement de l'activité unitaire du nerf auditif, dans lequel les électrodes sont insérées dans le nerf auditif. La pose des électrodes et l'enregistrement des activités électriques sont toujours pratiqués chez l'animal anesthésié. Des tests auditifs comportementaux fondés sur le sursaut en réponse à un son, seront également employés pour compléter les données de l'électrophysiologie.

A l'issue de ces tests d'exploration fonctionnelle, les souris seront euthanasiées. Les cochlées et les nerfs auditifs d'une partie d'entre-elles seront prélevés et examinés avec des techniques d'étude anatomiques dans le but d'établir des corrélations avec les résultats des tests fonctionnels.

Pour chacune des lignées de souris qui seront sélectionnées pour cette étude, un nombre de 36 animaux sera nécessaire et suffisant selon une évaluation statistique. Ce nombre sera donc multiplié par autant de lignées utilisées. Le nombre de lignées que nous pourrons étudier ne pouvant pas excéder 4 par an en raison des contraintes de temps et de disponibilité du matériel d'exploration fonctionnelle, le nombre maximum de lignées de souris utilisées pendant 5 ans (limite supérieure de validité d'une autorisation de projet) sera de $4 \times 5 = 20$ lignées. En conséquence le nombre maximum de souris, toutes lignées confondues, sera de 720.

Cette étude sera menée en conformité avec les recommandations de la règle des 3R. Nous veillerons notamment à :

- utiliser le nombre minimum et suffisant d'animaux
- héberger les souris dans un environnement conforme et enrichi
- anesthésier profondément les animaux lors des tests fonctionnels
- évaluer quotidiennement l'état des animaux en expérimentation
- prodiguer les soins éventuels aux animaux malades
- respecter des points limite en cas de gêne ou souffrance manifestées

5972. En situation normale, la population est exposée à des mélanges complexes de polluants chimiques. Cette complexité peut être augmentée en situation d'accident nucléaire par la présence de radionucléides dans l'alimentation et dans l'environnement. A l'heure actuelle, très peu de données sont disponibles sur les effets biologiques et sanitaires de l'exposition combinée à une irradiation externe et à une contamination interne, ou sur une exposition combinée à des polluants chimiques et des radionucléides. Rien ne démontre si ces expositions peuvent entraîner une additivité des effets, une synergie ou un antagonisme des effets liés à

chacune des substances. Le système de radioprotection en vigueur repose sur une hypothèse d'additivité des effets engendrés par différentes expositions, qu'elles soient internes ou externes.

Ce projet est destiné à tester cette hypothèse dans le cas d'une exposition combinée à une irradiation externe et à une contamination interne par un radionucléide. Le modèle expérimental choisi est la souris BALB/c, recevant une irradiation corporelle totale de 1 ou 5 Gy, puis une injection d'une quantité définie de radionucléides (137Cs pour la première partie du projet et 90Sr pour la seconde partie) immédiatement après l'irradiation externe. La mesure corporelle totale de radionucléides sera réalisée dans un nouvel appareillage de mesure de la contamination interne adaptée à la taille des rongeurs de laboratoire. Ce suivi permettra de vérifier si l'élimination des radionucléides est modifiée par l'irradiation externe. Cette étude permettra également de réaliser la qualification (sensibilité, limite de détection et bruit de fond) de cette nouvelle chaîne de mesure, qui à terme, assurera la possibilité d'un suivi de la contamination interne sans avoir à euthanasier des animaux. Cette méthode pourrait à l'avenir représenter un raffinement des méthodes actuelles, et permettre aussi une réduction du nombre d'animaux utilisés.

Pour ce projet, nous prévoyons d'utiliser 72 souris mâles de lignée BALB/c, 36 pour la partie expérimentale avec le 137Cs et 36 pour la partie expérimentale avec le 90Sr.

En respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement, les conditions suivantes seront respectées. Ce projet nécessite une étude des effets à l'échelle de l'organisme dans son ensemble, les études *in vitro* ne sont donc pas adaptées. Le nombre d'animaux utilisé est le nombre nécessaire et suffisant requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet. Les animaux seront observés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié, avec un score basé sur le comportement, le suivi pondéral et celui de la température corporelle. Tous les animaux seront hébergés en groupe et selon les standards en vigueur. Les effets biologiques attendus (sur la base des expériences réalisées précédemment) suggèrent qu'aucune souffrance ou douleur particulière n'est attendue dans ce projet.

5973. Les intoxications par les inhibiteurs de cholinestérases de type organophosphorés (OP) constituent un risque pour la population. Plus de 300 000 décès sont rapportés chaque année dans le monde suite à une exposition volontaire ou passive à des pesticides organophosphorés. Une intoxication sévère par les OP affecte le système nerveux central et peut conduire au développement de crises épileptiques pouvant s'aggraver en état de mal épileptique (EME) accompagné de lésions cérébrales si les crises ne sont pas rapidement arrêtées.

Dans la vie quotidienne, les individus peuvent être soumis à de nombreuses contraintes (activité physique, stress, traumatismes, syndromes infectieux, perturbations du cycle veille-sommeil...). Certains de ces paramètres sont à l'origine d'une réaction inflammatoire périphérique ou centrale. Il a été montré que cette réponse inflammatoire consécutive à un « stress » du système nerveux central est impliquée dans les mécanismes de genèse de la symptomatologie épileptique : ictogénèse (naissance des crises) et épileptogénèse (mise en place de la maladie épileptique).

Notre objectif scientifique à travers ce projet de recherche est d'étudier l'impact de la réaction inflammatoire consécutive à une infection préalable sur la réponse centrale à l'exposition d'un OP, le diisopropylfluorophosphate (DFP). L'infection sera ici mimée par l'injection d'un agoniste des Toll-like receptors 4 (TLR4) ou 3 (TLR3), récepteurs reconnaissant respectivement les bactéries et les virus. Aucune méthode alternative ne permettant d'étudier de manière intégrée la réponse du système nerveux central à un toxique OP, ce projet nécessite l'utilisation d'animaux pour répondre à nos questions scientifiques. Le projet intégrera 700 souris swiss sur 5 ans. Il permettra de mieux comprendre, dans le cas des intoxications aux OP :

- les facteurs de risques de développement d'un état de mal épileptique et de lésions cérébrales,
- les mécanismes de vulnérabilisation systémiques et cérébraux,
- les cibles thérapeutiques et/ou prophylactiques potentielles.

A plus long terme, ces connaissances nous permettront d'améliorer la prise en charge et le traitement des personnes exposées.

Les animaux subiront une période d'infection et une injection de DFP qui engendre un EME suite auquel les animaux sont léthargiques et présentent une réduction de poids pendant quelques jours. A la fin de l'étude, les animaux sont euthanasiés dans le respect des règles d'euthanasie des animaux de laboratoire.

Il n'existe actuellement aucune méthode alternative permettant d'étudier de manière intégrée la réponse du système nerveux central et périphérique à un toxique organophosphoré. Par ailleurs l'étude de l'impact d'un pré conditionnement sur cette réponse ne peut être envisagée qu'« *in vivo* » en particulier sur le plan comportemental et électro physiologique. Le nombre d'animaux estimé et les tests statistiques utilisés sont basés sur notre expérience pour ce type d'étude. Ce nombre nous permettra d'être certains de répondre aux questions scientifiques de ce projet.

La dose de DFP sera affinée afin d'obtenir un nombre optimal d'animaux répondeurs et ainsi réduire le nombre d'animaux utilisés. Les animaux seront hébergés en groupe en milieu enrichi pour minimiser leur stress. Les points limites définis seront respectés.

5974. La presbytie se caractérise par une diminution graduelle et progressive de la capacité de focalisation de la vision pour lire ou effectuer un travail de près. Cette atteinte correspond à une sclérose du système d'accommodation (cristallin et muscle ciliaire). Il s'agit d'un vieillissement normal de l'œil dont les effets commencent à apparaître après 45 ans.

Il y a près de 60 ans ont été développés les premiers dispositifs implantables au sein de la cornée (dits « inlay ») pouvant traiter la presbytie. Cependant, ils n'ont pas eu d'application clinique à cette époque pour 2 raisons : les matériaux utilisés n'étaient pas suffisamment compatibles et il n'existait pas de méthode suffisamment précise et reproductible pour les implanter dans la cornée (seule une découpe manuelle était possible).

Les inlays connaissent actuellement un regain d'intérêt, car les 2 points bloquants se sont améliorés. Les biomatériaux sont désormais disponibles et les lasers ultrarapides dits « laser femtoseconde » de chirurgie cornéenne (chirurgie de la myopie surtout)

permettent d'obtenir la précision nécessaire. Ce sont ces lasers qui sont utilisés pour effectuer des capots cornéens dans les techniques de correction de la vision appelées « LASIK » depuis environ 10 ans.

Le but est d'étudier la tolérance et l'efficacité d'un inlay. Cet implant sera placé au sein du stroma cornéen dans une poche qui aura préalablement été découpée par Laser femtoseconde ophtalmologique.

La cornée de lapin est similaire à celle de l'homme au niveau de l'anatomie et de l'histologie. Au total 12 lapins seront utiles pour ce projet. Ce nombre est réduit au minimum pour que les résultats soient statistiquement significatifs. Ce nombre doit obligatoirement être mis en œuvre *in vivo* afin d'être au plus proche de la situation clinique chez l'homme. Tout est mis en œuvre pour limiter au maximum le stress et la douleur de l'animale (anesthésie générale pendant la pose de l'implant ainsi que pour les suivis).

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérés grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant/anesthésie/analgésie).

Par ailleurs, les lapins sont hébergés en cage règlementaire (plateforme paroi transparente entre 2 cages); dans un environnement enrichi (kong et autre jeux). Enfin, l'eau et la nourriture (granules et foin) sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

5975. Depuis leur commercialisation en France en 2008, les anticoagulants oraux non anti-vitamine K inhibant la thrombine ou le facteur Xa de la coagulation sont de plus en plus prescrits. Ils présentent une efficacité et une sécurité semblables voire supérieures aux anti thrombotiques classiques, en particulier les anti-vitamines K. Cependant, comme tout anticoagulant, ils induisent un risque hémorragique pouvant nécessiter d'être rapidement neutralisé, par exemple en cas de chirurgie urgente ou d'hémorragie grave. Or il n'existe pas à l'heure actuelle d'antidote disponible ou de molécule permettant de contrecarrer les effets de la majorité de ces nouveaux anti-thrombotiques. Cette lacune fait l'objet du présent projet. Nous avons préparé une molécule qui a montré une efficacité indéniable en tant qu'antidote potentiel dans des tests de coagulation *in vitro* (test de génération de thrombine et fibrinogramme). La preuve du concept ne peut être validée qu'avec un modèle expérimental *in vivo*.

L'objectif de ce travail est de tester cette molécule candidate sur un modèle de saignement à la queue de souris. 6 groupes de souris recevront l'un des anticoagulants testés et/ou l'antidote ou aucun des deux. Un total de 142 souris sera testé permettant d'évaluer la capacité de la molécule candidate à neutraliser l'effet anticoagulant et ce au moyen d'un test classique de saignement à la queue suivi par un prélèvement intracardiaque dans le but de réaliser divers tests de coagulation *ex vivo*.

Dans un souci de réduire au maximum le nombre d'animaux requis tout en permettant d'obtenir des résultats significatifs, une approche statistique a été réalisée. Afin de limiter au maximum la souffrance des animaux, toutes les procédures se dérouleront sous anesthésie et analgésie et les animaux ne se réveilleront pas en fin de manipulation. Ils seront euthanasiés conformément aux exigences règlementaires en vigueur.

A terme, notre projet permettra de valider *in vivo* l'efficacité et la sécurité de la molécule candidate qui pourra être développée comme antidote universel des anti thrombotiques, et par la suite répondre à un besoin qui s'avère indispensable vu la prescription de plus en plus fréquente de ces nouveaux anticoagulants.

5976. Les sarcomes des tissus mous représentent un groupe hétérogène de tumeurs (50 histotypes différents) affectant chaque année 4500 adultes et enfants, le décès survient dans près de 50% des cas parce que les médecins ne disposent que de chimiothérapies palliatives. La trabectedine (ou Yondelis) a obtenu l'AMM (autorisation de mise sur le marché) en Europe et aux Etats-Unis il y a quelques mois, c'est un médicament qui provoque des cassures dans l'ADN provoquant ainsi la mort de la cellule. Il y a malheureusement de nombreux patients qui ne répondent pas bien à ce traitement et il reste important d'essayer d'améliorer les traitements existants en leur associant d'autres molécules, comme des inhibiteurs de la réparation de l'ADN comme le rucaparib par exemple.

Nous sommes localisés dans un centre de référence dans le traitement de ce cancer rare et nous avons donc la possibilité d'obtenir des tumeurs de patients et ainsi de pouvoir développer des lignées cellulaires et des modèles de souris xénotreffées avec ces lignées cellulaires. Les tests seront d'abord réalisés sur des cellules en culture et s'ils sont concluants, ils seront réalisés sur des souris sur lesquelles on aura injecté les cellules en sous cutanée. Nous souhaiterions réaliser ces expérimentations sur 5 lignées de liposarcomes différenciés et 5 lignées de leiomyosarcomes (histotypes les plus représentés) pour avoir un panel tumoral représentatif des patients.

En résumé, pour chaque expérimentation il y aura 4 bras de traitement : placebo, Yondelis seul (administré 1 fois par semaine pendant 3 semaines), rucaparib seul (donné 5 fois par semaine pendant 3 semaines) et la combinaison des deux médicaments (administrés comme précédemment).

Ces expérimentations *in vivo* s'inscrivent dans un projet de recherche translationnelle qui vise à élargir l'éventail thérapeutique dans le traitement des sarcomes des tissus mous, elles sont obligatoires avant de pouvoir réaliser les essais chez l'homme. Toutes les expérimentations sont réalisées par du personnel qualifié, le nombre de souris est limité au maximum, le but étant d'obtenir des données significatives d'efficacité du médicament. Les animaux sont surveillés par le personnel de l'animalerie quotidiennement et sont hébergés dans des cages comprenant une nourriture adaptée enrichi par des tunnels en polycarbonate ou polysulfone

Ce projet nécessitera l'implantation de 960 animaux sur 3 ans.

5977. Aujourd'hui on fait face à une véritable pandémie des maladies métaboliques telles que le diabète type 2 et l'obésité. Une étude a quantifié cette pandémie en prévoyant pour le 2030 un taux de développement de 72% pour les Etats Unis et même supérieur à 150% pour les Pays en cours de développement tels que l'Asie et l'Afrique. Les impacts des facteurs génétiques et les mauvaises habitudes alimentaires (régimes riches en graisse et pauvres en fibre) n'expliquent que 10% de cette augmentation. Dans le but de comprendre ce qui favorise cette pandémie métabolique, un nouvel acteur du contrôle du métabolisme a été identifié, c'est le microbiote du tractus gastro-intestinal. Des altérations du microbiote ont été associées à la survenue de pathologies métaboliques, sans encore en avoir identifié tous les mécanismes moléculaires responsables. De plus, il a été récemment montré qu'un régime diabétogène/obésogène induit des altérations du microbiote intestinal, dites dysbioses, favorisant les infections à entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, etc.), des espèces bactériennes qui colonisent le tractus des nouveau-nés dès les premières heures après la naissance. Ces souches transmises par la mère sont des bactéries commensales qui persistent dans le tractus intestinal toute la vie de l'individu. Cependant, certaines souches d'entérobactéries sont aussi pathogènes, responsables de diarrhées, méningites, septicémies ou encore infections urinaires. Certaines de ces souches pathogènes produisent des toxines capables de provoquer des dommages à l'ADN (génotoxines) dans les cellules intestinales. On retrouve aussi des souches commensales exprimant cette génotoxine dans 25% de la population générale, et une souche probiotique (*E. coli Nissle*). Il a été aussi montré que les infections à entérobactéries peuvent déclencher et aggraver les maladies métaboliques, en agissant par exemple sur des tissus clé comme le tissu adipeux.

Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes moléculaires qui favorisent les infections à *entérobactéries* dans le contexte des maladies métaboliques et comprendre pourquoi ces infections sont plus sévères dans un contexte de diabète type 2 et obésité. Pour réaliser ce projet nous envisageons l'utilisation de deux modèles animaux de souris rendues obèses/diabétiques par des approches génétiques visant à invalider soit le gène de la leptine (souris ob/ob) soit son récepteur (souris db/db). Ces souris seront colonisées par de souches d'*entérobactéries* produisant la génotoxine colibactine et par des souches mutantes sur différents gènes impliqués dans la production de la colibactine. Ensuite, nous réaliserons *in vivo* de tests clé du métabolisme glucidique comme de tests de tolérance au glucose, à l'insuline ou au pyruvate. Nous étudierons *ex vivo* les organes clé du métabolisme glucidique comme le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique.

Nous comptons utiliser un total de 300 souris (*Mus musculus*), soit 10 souris par modèle animal, génétiquement modifiées, de fond génétique C57Bl/6J âgées de 10-12 semaines au moment du début du projet, selon ce schéma :

Souris ob/ob ou db/db ou WT: 10 souris par groupe colonisées pendant 4 semaines avec 5 conditions (3x10x5) : 150 souris
Le même schéma s'applique pour l'utilisation de la souche *K. pneumoniae*, soit 150 souris également.

Avoir 10 souris par groupe nous permettra d'attendre un seuil statistiquement valable et donc de pouvoir interpréter les résultats obtenus. En effets, dans le cas où quelques souris ne répondraient pas comme attendu et devraient être sortie de l'étude, nous aurons encore un nombre statistiquement valable pour interpréter les résultats avec une confiance élevée. Cela permettra donc de ne pas répéter les expérimentations tout en respectant la réduction du nombre d'animaux employés (règle de 3R). Nous envisageons d'utiliser de souris mâles, dont la littérature montre une vaste gamme de données du microbiote intestinal et de ses altérations, les dysbioses.

Les procédures de colonisation n'ont pas été rapportées pour induire de douleur chez l'animal et sont bien tolérées sauf avec certaines souches pathogènes. Pour ces souches spécifiquement, le temps d'expérimentation sera réduit afin de minimiser la mortalité. Une perte (non attendue) du poids initial supérieure à 20% nous conduira à sortir l'animal du protocole expérimental et à l'euthanasier.

5978. La Tomographie par Emission de Positons (TEP) au 18-fluorodésoxyglucose (¹⁸FDG) est la méthode d'imagerie de référence pour le diagnostic et le suivi de nombreux cancers. Les cellules tumorales ont généralement un métabolisme glucidique augmenté, et captent de manière intense le glucose et le ¹⁸FDG. Le radiotracer, à la différence du glucose, reste piégé dans le compartiment intracellulaire, en impasse métabolique, de manière proportionnelle à l'activité métabolique tissulaire.

Certaines tumeurs, de type neuroendocrine, sont néanmoins décrites comme fixant très peu le ¹⁸FDG. La littérature faisant état de cas sporadiques de patients pour lesquels la captation de ¹⁸FDG était anormalement élevée dans ces types de tumeurs en lien avec une mutation de la succinate déshydrogénase, nous avons analysé des pièces anatomopathologiques et mis en évidence des taux anormalement élevés de succinate dans le microenvironnement tumoral de ces patients.

Nous cherchons maintenant à objectiver le lien entre les concentrations élevées de succinate dans le microenvironnement tumoral et la captation de ¹⁸FDG: d'une part dans un modèle préclinique de tumeur faiblement fixant au ¹⁸FDG, après injection intra tumorale de succinate (lignée non neuroendocrine HT29 d'adénocarcinome colique humain, avec de très faibles niveaux de sécrétion de succinate endogène, de faibles niveaux de fixation de ¹⁸FDG, et déjà utilisé dans la littérature pour voir l'impact du succinate sur le métabolisme tumoral) , et d'autre part dans une 2ème série d'animaux pour évaluer la contribution de la paroi vasculaire endothéliale (non tumorale) à cette hyper captation du traceur, après injection intramusculaire de succinate.

Le recours à l'expérimentation animale se justifie par l'impossibilité réglementaire de conduire ce type de recherche chez l'homme sain, et le choix de l'espèce par le besoin d'un modèle animal immunodéficient déjà documenté permettant de favoriser la prise et le développement des cellules tumorales, en l'absence d'alternative possible (Remplacement). L'étude sera menée *in vivo* au total sur 32 souris (*Mus musculus*) : ce nombre nécessaire d'animaux a été calculé pour permettre une étude statistique fiable (Réduction). Les animaux seront hébergés dans des cages avec enrichissements à types de copeaux, nids et tunnels, avec alimentation et eau ad libitum (Raffinement).

La surveillance de l'absence d'atteinte de point limite sera réalisée également. Si nous observons un comportement de souffrance suite aux interventions (et sur la base d'une grille d'évaluation de la souffrance), un antalgique sera administré.

Pendant l'imagerie, l'animal est anesthésié et la respiration est suivie. L'animal est réchauffé par une table ou couverture chauffante ce qui permet de maintenir sa température interne et de lutter contre l'hypothermie due à l'anesthésie. Le radiotracer, dénué d'effet pharmacologique, est injecté à une très faible dose (le but étant de cibler le récepteur et non d'induire un effet pharmacologique), par voie intrapéritonéale.

5979. Le projet a pour but de développer des modèles orthotopiques chez le rongeur, qui consistent en l'implantation de cellules tumorales au niveau de son site d'origine, et d'utiliser ces modèles pour l'évaluation de nouvelles thérapies anticancéreuses.

Les modèles d'implantation orthotopique de tumeurs chez l'animal permettent de reproduire l'évolution d'une tumeur dans un microenvironnement où les interactions tumeur-stroma (tissu en grande partie conjonctif) sont conservées. Aucune méthode alternative n'a été développée à ce jour permettant cela. Ces modèles permettent la migration des cellules tumorales puis la formation de métastases dans d'autres organes souvent identiques à ceux observés chez l'homme. Les modèles d'implantation orthotopique sont décrits dans la littérature pour de nombreux organes (cerveau, foie, pancréas, prostate, vessie, estomac, reins, colon, prostate, ovaire, seins...), les techniques et voies d'administration varient en fonction de l'organe.

Une première phase de mise au point pour chaque site d'implantation permettra en accord avec la règle des 3R, de réaliser un calcul d'effectif afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires par groupe, de définir les critères d'interruption de chaque modèle.

Un total de 5000 rongeurs est estimé sur les 5 ans du projet.

L'implantation orthotopique est faite sous anesthésie générale et la prévention de la douleur pendant l'opération, au réveil et en post-opératoire est faite par l'administration d'analgésique et anti-inflammatoire.

5980. La sénescence cellulaire est un processus impliqué dans de nombreuses pathologies chez l'Homme, ainsi que dans le vieillissement normal. Les cellules sénescents ne prolifèrent plus, mais restent présentes dans le tissu et sécrètent des molécules pro-inflammatoires. L'accumulation de cellules sénescents au cours d'une pathologie ou du vieillissement entraîne d'importantes lésions, et une diminution de la régénération tissulaire. A terme, cela se traduit chez les patients par une insuffisance pulmonaire pouvant être sévère. Le raccourcissement de l'extrémité des chromosomes, appelées télomères, a un rôle majeur dans l'induction de la sénescence.

On appelle hypoxie la diminution du pourcentage de dioxygène reçu par les patients. L'hypoxie chronique, comme celle observée chez les patients présentant une broncho-pneumopathie chronique obstructive, ou l'hypoxie intermittente, comme celle observée chez les patients souffrant d'apnée du sommeil, entraînent une diminution significative de la longueur des télomères. A ce jour il n'existe pas de traitement curatif contre la BPCO et l'apnée du sommeil. Nous cherchons à comprendre si :

- ces hypoxies entraînent une augmentation directe de la sénescence cellulaire dans le poumon
- cette augmentation de la sénescence est la cause des altérations pulmonaires observées chez les patients

Pour répondre à ces questions, une approche *in-vivo* est nécessaire et nous utiliserons deux modèles expérimentaux d'hypoxie chez la souris :

- 1) l'exposition à l'hypoxie chronique, maintenue à 9% d'O₂ pendant 21 jours. Ceci permet d'induire des dommages pulmonaires similaires à ceux observés chez les patients atteints de broncho-pneumopathie chronique obstructive.
- 2) l'exposition à l'hypoxie intermittente pendant la période de sommeil des souris, pendant plusieurs semaines. Ceci permet de mimer les dommages observés chez le patient atteint d'apnée du sommeil sévère.

Nous utiliserons 3 types de souris génétiquement modifiées :

- 1) des souris exprimant une molécule nommée " luciférase" dans les cellules qui deviennent sénescents. Ceci permet de visualiser directement l'apparition des cellules sénescents par imagerie chez une souris endormie.
- 2) des souris exprimant une molécule nommée "ATTAC" permettant d'éliminer ces cellules sénescents. Ceci permet d'évaluer l'effet de la diminution de ces cellules dans les deux modèles d'hypoxie.
- 3) des souris présentant un stress oxydant important, nommées "souris JunD déficientes", chez lesquelles la proportion de cellules sénescents est augmentée. Ceci permettra de comprendre l'effet de l'augmentation de la sénescence cellulaire dans ces modèles.

Dans cette étude, nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux (158 souris au total) notamment en utilisant des techniques novatrices telles que l'imagerie. Par ailleurs la méthodologie est raffinée en enrichissant l'environnement des souris et en mettant en place un arrêt des procédures en cas de souffrance de l'animale.

5981. Les cancers de la peau sont en augmentation et constituent un réel problème de santé publique. L'objectif général du projet est de comprendre quand et comment des cellules épithéliales pathologiques (cellules cancéreuses) rendent dysfonctionnelles des cellules immunitaires cruciales pour la défense anti tumorale. Pour cela, nous souhaitons utiliser un modèle murin qui mime les étapes du développement du cancer de la peau. Nos cellules d'intérêt sont les cellules dendritiques, une famille de cellules immunitaires de la peau qui éduquent les lymphocytes T tueurs. Lors de la présence dans la peau d'une cellule pathologique, les cellules dendritiques la repèrent, en capturent des fragments et les présentent aux lymphocytes tueurs et les activent pour qu'ils détruisent spécifiquement ces cellules pathologiques (dans notre cas les cellules de la surface de la peau appelées cellules épithéliales). Lors du développement d'une tumeur, les cellules pathologiques s'échappent en induisant une défaillance du système immunitaire à leur profit, notamment des cellules dendritiques. Comprendre comment les cellules pathologiques affectent les fonctions des cellules dendritiques à différents stades du développement d'une tumeur permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour renforcer la défense anti tumorale.

Nous proposons d'utiliser une souris génétiquement modifiée nommée K14HPV16 qui exprime spécifiquement un motif tumoral qui est reconnu par les cellules dendritiques, ce qui en fait un modèle de choix pour étudier les fonctions des cellules dendritiques au cours du développement du cancer. Ces souris développent de manière sporadique des tumeurs de la peau à partir de l'âge de 8 mois. Afin de raccourcir le temps d'expérimentation, d'augmenter le nombre de lésions par souris et que l'apparition des tumeurs se fassent chez des souris jeunes et en phase entre les souris, nous souhaitons utiliser un protocole d'induction chimique pour accélérer le développement du cancer de la peau chez ces souris. Ce modèle consiste d'abord en l'application sur la peau du dos de la souris d'un agent mutagène, le DMBA puis en l'application dans un deuxième temps d'un agent promoteur, le PMA qui favorise le développement des tumeurs. Ce traitement mime les étapes de la pathologie humaine avec l'apparition de verrues qui sont des boursoufflures épithéliales mobiles à leur base et correspondent à un stade précancéreux. 3 à 4 de ces lésions par souris se transforment en tumeurs entre semaine 11 et 14 après le début du traitement. Ces lésions (verrues, tumeurs) ainsi que de la peau contrôlée seront collectées et les fonctions des cellules dendritiques comparées entre ces différents stades par des techniques de biologie analytique afin d'identifier des cibles thérapeutiques. Au total, nous aurons besoin de 333 souris pour maintenir notre lignée et répondre à nos questions biologiques sur 3 ans et obtenir des résultats statistiquement valides.

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

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

Le nombre d'animaux a été déterminé afin de pouvoir valider nos résultats statistiquement.

Les animaux ne recevront pas de traitement analgésique qui interférerait avec l'analyse des cellules immunitaires, par conséquent le suivi des animaux et de l'évolution des lésions sera effectué deux fois par semaine pendant les 10 premières semaines et tous les jours entre semaines 11 et 14 (ou dès l'apparition d'une tumeur) conformément à une grille d'évaluation et de suivi permettant la mise en œuvre d'actions appropriées incluant la définition de des points limites.

5982. L'hémophilie A et B sont des maladies génétiques dues respectivement à un déficit en facteur VIII (FVIII) ou IX (FIX). L'hémophilie est caractérisée par un défaut de génération de thrombine, de formation des caillots, et par conséquent par des hémorragies spontanées ou prolongées. Les traitements actuels comprennent en général un traitement substitutif par le facteur déficitaire recombinant ou purifié. Cependant, ces traitements présentent différents inconvénients, en particulier des complications liées à l'apparition d'anticorps inhibiteurs. Nous proposons une approche innovante qui consiste à cibler la Protéase Nexine-1 (PN-1) ou SERPINE2, un inhibiteur naturel et très efficace de l'enzyme centrale de la coagulation qu'est la thrombine. La PN-1 inhibe l'activité catalytique de la thrombine, enzyme centrale de la coagulation. Nous avons mis en évidence les propriétés anti-thrombotiques de la PN-1 dans différents modèles expérimentaux de thrombose *in vivo*. Par conséquent, bloquer l'action de la PN-1 permettrait non seulement de favoriser l'activité de la thrombine mais aussi la production de celle-ci et donc la formation du caillot.

Ce projet a pour but de fournir la preuve de concept *in vivo* via le modèle de souris hémophiles, que la neutralisation de la PN-1 est une approche originale et novatrice dans le traitement de l'hémophilie. A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'utilisation de souris qui pourrait remplacer l'approche *in vivo*. Pour appliquer le principe de réduction, nous avons calculé le nombre minimum d'animaux à utiliser pour pouvoir réaliser des analyses statistiques robustes et pour le raffinement, nous allons réaliser les procédures expérimentales sous anesthésie générale et utiliser des prélèvements animaux pour plusieurs types d'analyses. Nous avons calculé que le nombre d'animaux nécessaire à cette étude est de 90 souris pour l'ensemble des expériences.

5983. La protéine sur laquelle nous travaillons possède une fonction suppresseur de tumeur. Nous pensons qu'activer cette protéine, pour renforcer son effet suppresseur de tumeur, pourrait être une nouvelle stratégie thérapeutique pour bloquer le développement tumoral. Des chimistes ont synthétisé des composés qui activent notre protéine. Dans ce projet, nous souhaitons tester l'activité suppresseur de tumeurs de ces composés. Nous utiliserons des souris commerciales C57Bl6J qui possèdent un système immunitaire fonctionnel. Ces souris seront injectées avec des cellules tumorales de même espèce, pour éviter les réactions de rejet. Les cellules seront injectées en sous cutané, sur un seul flanc ce qui permet de suivre très facilement la croissance tumorale. Cette procédure d'injection n'est pas douloureuse pour l'animal. Une fois l'injection réalisée, le comportement des animaux sera suivi quotidiennement de façon à assurer une bonne gestion de la douleur, le tout en accord avec les objectifs de notre étude. L'ensemble de cette étude a été conçue pour respecter la règle des 3R.

Seul les modèles animaux permettent de tester la collaboration qui existe entre les différents compartiments cellulaires (cellules de l'immunité, cellules des muqueuses, etc.). Ainsi la faisabilité et l'efficacité d'une nouvelle approche à visée thérapeutique ne peut se faire que chez l'animal. Dans ce cadre la souris est utilisée.

Nous testerons au maximum 2 composés agonistes sur plusieurs modèles tumoraux. Pour cela nous avons besoin d'au maximum de 1440 animaux. Ce chiffre pourra être revu à la baisse si les expériences sont exploitables dès le premier essai.

Une étude exhaustive de la littérature a été menée avant d'initier ce projet pour s'assurer de la non reproduction de résultats déjà publiés. Le nombre d'animaux utilisé lors des expériences est calculé pour utiliser le minimum d'animaux tout en obtenant des résultats statistiquement significatifs. Nous avons réalisé des tests sur des cellules en culture pour prouver la non toxicité de nos composés et définir les meilleures conditions d'utilisation des composés que nous souhaitons tester sur l'animal.

Les procédures expérimentales peuvent engendrer une douleur modérée, pour limiter cette douleur nous avons établi une grille d'observation visant à définir des points limites à partir desquels l'expérience sera arrêtée et qui indiquent les mesures que nous

prendrons à l'apparition des premiers signes de douleur. Toutes ces mesures sont prises pour limiter au maximum la souffrance des animaux tout au long de l'expérimentation.

5984. La prématurité est la principale cause de décès et de handicaps chez les nouveau-nés. Dans les pays industrialisés, en raison de l'amélioration des soins intensifs néonataux, le nombre des nourrissons de très faible poids de naissance qui survivent au-delà de l'enfance est en hausse. Cependant, le cerveau de ces prématurés reste extrêmement vulnérable. Les lésions diffuses de la substance blanche (LSB) constituent la principale forme de lésion cérébrale du prématuré. L'inflammation périnatale que subit une grande majorité des enfants prématurés et la grande vulnérabilité des cellules cérébrales en développement à ce stress inflammatoire est à l'origine de l'apparition de la plupart de ces lésions. Elles induisent des handicaps moteurs, des déficits cognitifs et des troubles comportementaux qui persistent à l'âge adulte. Malheureusement, aucune thérapie spécifique de ces lésions diffuses n'existe à ce jour. L'amélioration du pronostic de cette pathologie repose donc sur la découverte de nouvelles stratégies neuroprotectrices. Les objectifs de ce projet visent donc (1) à comprendre les mécanismes impliqués dans l'apparition des LSB et (2) à évaluer l'efficacité de différentes stratégies neuroprotectrices. Pour cela, nous utiliserons un modèle de LSB induites par des injections d'interleukine 1 beta chez le souriceau qui reproduit la pathologie humaine de l'enfant prématuré. Dans ce modèle largement utilisé, il sera étudié l'évolution des processus neuroinflammatoires, des altérations du développement cérébral et des déficits cognitifs. L'évaluation des signaux cardio-respiratoires comme outil prédictif de l'état inflammatoire de ce modèle sera également réalisée. Une partie des travaux de ce projet a déjà été réalisée *in vitro* sur des cultures cellulaires. Cependant, les mécanismes impliqués dans les LSB mettent en jeu l'interaction de plusieurs types cellulaires au cours du développement cérébral qu'il est impossible de reproduire *in vitro*. Il est donc indispensable d'associer, aux études *in vitro*, des études chez l'animal entier soumis à un stress inflammatoire qui reproduit les LSB. Les expériences seront réalisées chez 1344 souris. La bonne reproductibilité et le faible taux de mortalité (5%) de ce modèle expérimental permettent de limiter le nombre d'animaux par groupe nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques (Test de Student, Analyse de variance). Ce modèle expérimental qui repose sur des injections intra-péritonéales d'interleukine 1 beta est de sévérité légère et n'entraîne pas de phénotype dommageable chez la souris. La mise en place de points limites (anémie, déshydratation, absence de prise de poids, lésions) ainsi que l'observation régulière du comportement des animaux permettront d'identifier et de limiter toute souffrance et douleur.

5985. L'ischémie myocardique ou infarctus du myocarde est dû à l'absence partielle du flux sanguin et donc de l'oxygène dans le cœur. Cette maladie est à l'heure actuelle l'une des principales causes de décès dans le monde, avec des facteurs de risque connus tels que l'hypercholestérolémie et le diabète. L'ischémie survient lorsque le myocarde ne reçoit plus l'oxygène dont il a besoin par l'apport sanguin. L'agression tissulaire hypoxique qui en résulte peut avoir des conséquences dramatiques et laisser des séquelles indélébiles. Lorsque la perfusion est restaurée et l'oxygénation tissulaire à nouveau possible, on observe alors une forte réaction inflammatoire associée à une production élevée des radicaux oxygénés qui ont un effet néfaste sur les cellules cardiaques. Cet effet paradoxal et indésirable après le rétablissement du flux sanguin constitue le syndrome de reperfusion. La dénomination "Ischémie-Reperfusion" rappelle que les dégâts tissulaires liés à une interruption ou une réduction du flux sanguin, sont le résultat de deux phénomènes : l'effet de l'hypoxie-ischémie (absence d'oxygène) et l'effet de la reperfusion-réoxygénation (apport de l'oxygène).

A l'heure actuelle il existe très peu d'options thérapeutiques pour réduire ces lésions de reperfusion. Deux de ces options sont basées sur l'administration de l'adénosine ou des antioxydants. En essai clinique, l'adénosine a montré un fort effet cardioprotecteur. Cet effet bénéfique était obtenu après l'administration de doses élevées d'adénosine, car celle-ci est rapidement métabolisée dans l'organisme (demi-vie de 2 à 10 secondes). Les doses élevées induisant également des effets secondaires graves ont mené à l'arrêt des essais cliniques. Egalement testés en essais cliniques, les antioxydants, molécules qui protègent contre l'action délétère des radicaux oxygénés, ont montré des résultats mitigés. Ceci étant dû à une faible pénétration dans la membrane plasmique mais également à une faible stabilité et une durée de vie très courte dans la circulation sanguine.

Pour contourner ces limitations nous avons développé des nanomédicaments à base de squalène, une molécule naturellement présente dans l'organisme et donc bien tolérée. Il a été précédemment démontré que les nanoparticules de squalène couplé à l'adénosine (Sq-Ade) induisaient un fort effet neuroprotecteur chez la souris avec une ischémie cérébrale.

Le projet actuel vise à évaluer les nanoparticules de Sq-Ade couplées ou pas à un antioxydant (Sq-Ade-AO) dans des modèles murins d'ischémie/reperfusion myocardique. La validation d'un nouveau nanomédicament nécessite la mise en place d'expériences chez des animaux. Les lésions d'ischémie/reperfusion myocardique sont associées à une forte réaction inflammatoire. Toutes ces modifications ont des répercussions sur le cœur entier non seulement au niveau structural mais également au niveau physiologique (cycle cardiaque, contractions des cellules cardiaques). Les études *in vivo* nous permettent d'évaluer un effet dans le temps au niveau de l'organe entier mais également de tenir compte de la réponse immunitaire, conditions non possible à ce jour par une méthode alternative. Nous avons choisi la souris car il existe des modèles transgéniques qui présentent les facteurs de risque associés au développement de cette maladie (hypercholestérolémie et diabète). La procédure expérimentale, réalisée sur des souris anesthésiées, consiste en une thoracotomie latérale (ouverture de la cage thoracique) suivie de la ligature de l'artère coronaire gauche. La reperfusion est réalisée après 45 minutes de ligature. Les nanomédicaments vont être administrés avant la reperfusion. L'évaluation de l'effet cardioprotecteur sera réalisée à différents intervalles de temps. La fonction cardiaque sera évaluée par échographie qui est une méthode non invasive. Un calcul statistique nous a permis d'établir le nombre maximal de souris utilisées pour ces expériences. Ainsi pour l'ensemble de cette étude 1044 souris sont nécessaires sur 5 ans.

Cet effectif a été déterminé en tenant compte de la règle des 3R : les expériences réalisées *in vitro* nous ont permis de sélectionner les doses de nanomédicaments ainsi que les meilleures formulations à tester sur les animaux. Le nombre d'animaux par lot a été calculé grâce à un logiciel afin d'utiliser le minimum d'animaux tout en pouvant mettre en évidence les éventuels effets. Les conditions d'hébergement, d'anesthésie, de la thérapie antidouleur avant et après l'opération sont prévues pour réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse que pourraient ressentir les animaux. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux stables formés d'individus compatibles. Chaque animal aura un espace suffisant avec un enrichissement standard. Bénéfices attendus : cette étude nous permettrait d'évaluer et de valider dans une modèle d'ischémie/reperfusion myocardique des nanomédicaments avec comme objectif un effet cardioprotecteur lors de l'étape critique de la reperfusion.

5986. 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, accompagnée d'une atrophie musculaire et de paralysie, puis par le décès des patients en trois à cinq ans après le diagnostic.

L'axe principal de la pathologie correspond à l'axe moteur, et les principaux tissus impliqués dans cette pathologie sont la moelle épinière, les nerfs moteurs et les muscles squelettiques.

La SLA est une maladie multifactorielle dans laquelle le métabolisme des lipides joue un rôle important dans la progression de la maladie chez les patients. Notre corps de données préliminaires a montré que le métabolisme des acides gras, et plus particulièrement la composition en acide docosapentaénoïque (DPA) est fortement diminuée chez les patients SLA ainsi que dans des modèles murins de dénervation musculaire, et corrèle avec la sévérité de la maladie. Notre hypothèse de travail repose sur le fait que ce DPA est requis pour la récupération fonctionnelle de l'axe neuromusculaire.

Nous proposons ici d'augmenter le taux de DPA, en combinaison avec de la vitamine E afin d'éviter la dégradation de l'acide gras, par une approche nutritionnelle par gavage. Pour cela, nous administrerons par gavage chez des souris de souche FVB la molécule (10 souris véhicule, 10 souris DPA seulement, 10 souris vitamine E seulement et 10 souris combinaison DPA-vitamine E). Le nombre total d'animaux sera donc de 40. Après 10 jours de pré-traitement, nous procéderons à une lésion du nerf sciatique chez ces animaux. Nous proposons ensuite d'étudier la récupération fonctionnelle des animaux par des tests moteurs et visuels reconnus ainsi que par des tests biochimiques et moléculaires.

Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation des protocoles afin de limiter le nombre d'animaux et d'améliorer leur bien-être. Un modèle animal sera utilisé car la complexité des altérations du métabolisme des lipides dans la maladie ainsi que celle de la gestion des acides gras rendent indispensable l'utilisation d'animaux. Le nombre d'animaux sera réduit à 10 par groupe afin d'avoir des résultats homogènes et interprétables. Enfin, un raffinement du protocole sera mis en place par l'enrichissement de l'environnement des animaux, le maintien des interactions sociales, une surveillance quotidienne ainsi que le recours à une analgésie post-opératoire qui permettront de limiter la souffrance des animaux et de s'assurer de leur bien-être.

L'objectif de ce projet est de développer des interventions bénéfiques et proposer des stratégies thérapeutiques pour la SLA.

5987. L'accident vasculaire cérébral (AVC) entraîne souvent une diminution de la force musculaire et une immobilisation du membre supérieur replié sur la poitrine. Cette immobilisation précoce engendre une augmentation du réflexe à l'étirement amplifiant à son tour l'immobilisation de ces muscles. Nous pensons que ce cercle vicieux entretient une véritable maladie musculaire que nous nommons myopathie spastique.

L'objectif de ce projet est de déterminer l'évolution des propriétés mécaniques et structurales du muscle squelettique dans le cadre de la myopathie spastique post-AVC à partir d'un modèle de rat. Ce modèle est le rat Wistar de 10 semaines ayant subi un AVC par occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAo) et/ou une immobilisation totale d'une patte avant en position rétractée sur la poitrine durant 14 jours. Dans cette étude des essais mécaniques aux échelles microscopique et macroscopique seront effectués sur des échantillons musculaires de rats sains et pathologiques (ayant eu une MCAo et /ou une immobilisation). Une évaluation des aptitudes motrices de l'animal sera de plus menée à travers deux tests moteurs non douloureux. Une corrélation sera également réalisée entre les propriétés mécaniques et les changements des densités des constituants microstructuraux (collagène, différents type de fibres musculaires) du tissu musculaire quantifiés à partir de coupes histologiques.

Ce projet permettra ainsi dans un premier temps de mieux caractériser sur le plan mécanique cette pathologie afin d'entamer une recherche multidisciplinaire sur l'homme et dans un deuxième temps d'envisager de futures études permettant l'amélioration des thérapies existantes.

Il n'existe actuellement pas de modèle *in vitro* ou *in silico* permettant de déterminer l'évolution des propriétés mécaniques et structurales du muscle squelettique atteint de myopathie spastique. Les modèles animaux sont donc essentiels et ne peuvent donc être remplacés.

Afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, le nombre optimal a été calculé statistiquement et en tenant compte du taux de mortalité des rats dû à l'expérimentation. Nous estimons le nombre nécessaire de rat à 50 se répartissant entre 8 rats sains, 16 rats ayant eu une MCAo, 12 rats ayant eu une patte immobilisée et 14 rats ayant eu une MCAo et une patte immobilisée (calculs détaillés plus loin dans le document).

Un examen clinique quotidien à la recherche d'une diminution de la consommation d'eau ou de nourriture, d'une perte de poids, d'une prostration, ou encore d'une hypo-réactivité à la stimulation sera systématiquement mené. Le point limite menant à une euthanasie est fixé à une perte de poids de 20% ou une perte de poids ininterrompue pendant plus de 5 jours.

5988. Les nanoparticules d'or sont des complexes chimiques de plus en plus étudiés en cancérologie pour leurs propriétés diagnostiques et/ou thérapeutiques. Elles sont radio opaques c'est à dire que leur densité permet une visualisation en imagerie à rayons X tel que la radiographie ou la tomodensitométrie (TDM). De plus, des études ont montré qu'elles sont attirées par les cellules tumorales par diffusion passive. De part ces propriétés, les nanoparticules d'or présentent un intérêt majeur comme agent de contraste en imagerie TDM et en particulier en cancérologie.

Ce projet propose une étude des propriétés diagnostiques de nanoparticules d'or synthétisées à partir d'extraits végétaux. L'étude se réalisera sur deux types de nanoparticules qui diffèrent par leur composition chimique : Np1 et Np2.

Les études *in vitro* ont été réalisées pour vérifier l'innocuité et l'absence de cytotoxicité en fonction des concentrations. Une première étude *in vivo* sur des souris a été réalisée pour évaluer la biodistribution des nanoparticules dans les différents organes.

Pour répondre à l'objectif du projet nous utiliserons deux modèles murins de tumeurs induites par xénogreffe (injection de cellules tumorales humaines) de cellules tumorales épithéliales. Nous utiliserons une souche de souris immunodéprimées, les souris Balb/c Nude, afin de ne pas engendrer de rejet de greffe. Les deux modèles diffèrent par le site de la xénogreffe : un modèle par injection sous cutanée (appelé hétérotopique) et un modèle par injection intra veineuse (appelé modèle orthotopique).

Nous utiliserons un total de 39 souris. L'imagerie nous permet de réduire le nombre d'animaux car nous pouvons visualiser le marquage des nanoparticules dans les tumeurs sans avoir à sacrifier les animaux.

Le modèle animal n'induit pas de souffrance. Les animaux seront surveillés tous les jours et les tumeurs seront mesurées régulièrement pour s'assurer qu'elles ne génèrent pas de tension ou de douleur sur l'animal. La procédure d'imagerie n'induit pas de souffrance, les souris sont anesthésiées tout au long des acquisitions.

5989. Le mésothéliome péritonéal malin (MPM), avec 1 à 3 cas par million d'habitants par an, est un cancer rare et agressif. Il survient préférentiellement chez l'homme, avec un âge moyen de 47-60 ans. Il dérive d'une transformation maligne des cellules du péritoine, véritable seconde peau interne tapissant l'intérieur de la cavité abdominale et les organes digestifs. Cette tumeur reste méconnue du grand public mais également du monde médical. 4 formes de présentation et pronostic différents sont décrits. La maladie se présente comme une carcinose péritonéale envahissant de manière diffuse la membrane séreuse recouvrant les organes intra-abdominaux et la paroi interne. Le traitement à visée curative associe une résection chirurgicale complète des lésions de carcinose à un bain de chimiothérapie directement en intra-péritonéale en fin de l'intervention. Cette approche représente un traitement extrêmement lourd et agressif avec la survenue de complications post-opératoires sérieuses dans 35% des cas et une mortalité de 3% imposant donc une sélection drastique des patients. Néanmoins, seule cette attitude permet des survies prolongées voire une guérison complète de la maladie. En effet, chez les patients dont les lésions sont considérées non résecables chirurgicalement, les chimiothérapies conventionnelles peinent à démontrer une efficacité réelle et restent donc strictement indiquées à visée palliatives avec des survies ne dépassant rarement plus d'un an.

Ainsi, du fait de sa rareté et de son pronostic, le mésothéliome péritonéal est peu accessible aux études cliniques. De plus, beaucoup des données dont nous disposons sur le mésothéliome péritonéal ont été obtenues en extrapolant celles concernant la forme pleurale, liée à l'amiante, plus répandue mais néanmoins différentes. Il existe donc un réel besoin d'approfondir nos connaissances sur cette pathologie et de trouver de nouvelles thérapies justifiant la création et l'utilisation de modèles animaux.

Les progrès actuels de la pharmacologie anti-cancéreuse sont basés sur les thérapies ciblées dont fait partie l'immunothérapie. Le péritoine étant particulièrement riche en cellules immunitaires notamment de l'immunité innée telles les cellules NK, les cellules dendritiques ou encore les macrophages, il constitue donc un véritable organe immunocompétent. Plusieurs protocoles de recherche dans le mésothéliome pleural ont été mis en place afin d'explorer les checkpoints immunitaires pour l'immunité adaptative celle de l'immunité innée.

Les modèles *in silico* et *in vitro* sont insuffisants pour étudier véritablement le MPM notamment du fait de l'impossibilité d'évaluer les nouvelles immunothérapies. La greffe de cellules tumorales d'origine humaine peut nous permettre la création d'un modèle animal tout à fait adapté à l'étude de ces nouveaux traitements notamment ceux visant de l'immunité innée mais aussi celle des chimiothérapies et des thérapies ciblées plus conventionnelles.

OBJECTIFS DU PROJET: Définir le potentiel de tumorigénicité d'une banque de lignées cellulaires obtenus à partir de prélèvements chirurgicaux de différents sous-types histologiques de MPM afin d'établir un modèle *in vivo*, fiable et reproductible, de carcinose péritonéale de MPM chez la souris NUDE par xénogreffe intra-péritonéale.

RETOMBÉES ATTENDUES : l'établissement d'un modèle animal validé de MPM est essentiel à la recherche. Cela constituera une base solide d'étude des mécanismes physiopathologiques, des biomarqueurs potentiels du MPM, et permettra à l'avenir de tester des thérapeutiques médicales innovantes contre cette pathologie sévère *in vivo* avant de lancer des études de phases I et II. Un projet d'essai comparatif *in vivo* en aveugle d'immunothérapie intra-péritonéale est immédiatement prévu en cas de succès de l'élaboration de ce modèle.

ETHIQUE ET CONFORMITÉ À LA RÈGLE DES 3R :

Plusieurs lignées cellulaires ont été sélectionnées de manière *in vitro*. Les dispositions nécessaires ont été prises afin de limiter au maximum le nombre d'animaux avec notamment une phase pilote par xénogreffe sous-cutanée, plus facilement évaluable. Cela permettra avec un nombre restreint d'animaux de sélectionner uniquement les lignées les plus prometteuses pour l'induction d'une carcinose en situation intra-péritonéale dont l'évaluation est plus difficile cliniquement.

Plusieurs points limites directement liés au mode d'évolution d'une carcinose ont été défini avec soin. Nous avons également défini des points d'appel précoces déclenchant des mesures correctrices afin d'éviter au maximum l'apparition de ces véritables points limites et de répondre ainsi au bien-être des animaux tout en ne compromettant pas l'aspect scientifique du projet.

89 souris seront utilisées dans ce projet.

5990. Malgré l'existence d'un vaccin préventif, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) demeure un problème de santé publique avec environ 240 millions de personnes infectées chroniquement dans le monde et risquant de développer une cirrhose voire un cancer du foie. Aujourd'hui environ 1 million de décès/an dans le monde sont dus aux conséquences hépatiques de l'infection chronique par le VHB. Le traitement actuel le plus utilisé est un traitement « à vie », basé sur des analogues de nucléosides permettant de contrôler la réplication virale et l'évolution de la maladie mais ne permettant pas l'élimination du virus, qui persiste dans les cellules infectées. Nous estimons aujourd'hui un taux de guérison de 3 à 15% chez les patients traités ; il existe donc un réel besoin médical de développer de nouvelles approches thérapeutiques permettant d'augmenter ce taux. Par ailleurs il a été montré dans de nombreuses études que l'élimination du virus implique que le patient développe une forte réponse immunitaire. De ce fait, les approches de type immunothérapie qui permettraient d'induire une réponse immunitaire appropriée sont très favorisées.

Notre laboratoire développe actuellement un produit d'immunothérapie de ce type, basé sur un vecteur viral non réplicatif codant pour des antigènes du VHB, et qui a été sélectionné pour un développement clinique chez l'homme.

Nous avons transféré récemment dans notre laboratoire un modèle murin d'hépatite B chronique et nous avons démontré l'effet antiviral de notre produit d'immunothérapie dans ce modèle. Dans le cadre du développement de ce produit, nous avons aujourd'hui pour but d'évaluer la possibilité d'augmenter l'effet antiviral par une combinaison de notre produit d'immunothérapie avec des immunomodulateurs.

Le seul modèle animal infectable par le VHB est le chimpanzé mais son utilisation pour tester des candidats d'immunothérapie est exclue pour des raisons réglementaires et éthiques. Le modèle murin représente une bonne alternative. Bien que non-infectable par le VHB, le modèle que nous avons transféré et mis au point permet d'induire une hépatite chronique chez la souris par l'infection avec un virus assistant modifié et permet ainsi de tester des effets immunologiques et antiviraux du produit d'immunothérapie. Ce modèle ressemble fortement à l'infection chronique par le VHB chez l'homme permettant de mimer notamment la phase de portage chronique immunotolérant/non-inflammatoire qui est décrite chez les patients infectés par le VHB.

A l'heure actuelle, aucun modèle *in vitro* ne peut se substituer au modèle murin dans notre étude. Le nombre de souris utilisé dans ce projet sera néanmoins réduit à son minimum sans pour autant compromettre les objectifs du projet. Enfin, les conditions d'hébergement et d'enrichissement des cages, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées pour respecter le bien-être animal et limiter au maximum la souffrance subie par l'animal.

Ce projet inclura au total 576 souris maximum.

5991. Les spirulines sont des cyanobactéries possédant des propriétés nutritionnelles reconnues depuis l'antiquité et autorisées pour l'alimentation humaine. Elles ont la capacité d'absorber et d'accumuler des oligoéléments qui sont métabolisés et incorporés dans des molécules organiques (protéines, polysaccharides...). Elles constituent ainsi un bon support pour l'enrichissement en micronutriments comme le fer, le sélénium ou encore le silicium. Le silicium intervient dans le maintien de l'élasticité des tissus en participant à l'organisation des fibres de collagène et d'élastine. Or ces structures macromoléculaires altérées au cours du vieillissement pourraient être impliquées dans certaines dysfonctions et dans de nombreuses pathologies (cardiovasculaires, métaboliques, osseuses). La baisse du taux de silicium dans les tissus avec l'avancée en âge pourrait être corrélée à certaines des altérations structurelles des tissus, justifiant l'intérêt suscité par son utilisation en prévention des effets du vieillissement. Une première étude réalisée sur un modèle d'obésité nutritionnelle chez le hamster a permis de poser les bases d'un effet bénéfique d'un complément alimentaire (spirulines enrichies en silicium) sur le système cardiovasculaire. Ce projet a pour but de comprendre les mécanismes tissulaires et cellulaires impliqués dans les effets bénéfiques d'une supplémentation nutritionnelle en spirulines enrichies en silicium sur les altérations de la fonction cardiovasculaire observées au cours du vieillissement.

L'étude sera réalisée sur le rat spontanément hypertendu (SHR) qui représente un modèle de vieillissement artériel accéléré et qui est un modèle de référence pour les pathologies cardiovasculaires. Des animaux contrôles non hypertendus seront intégrés à l'étude (Wistar Kyoto, fond génétique du SHR). Différents groupes d'animaux seront étudiés : des animaux ayant une alimentation standard, ou une supplémentation en spirulines, en spirulines enrichies en silicium ou en silicium (poudre de prêle). La supplémentation sera réalisée sur des animaux adultes (3 mois) sur une durée de 3 mois. Le nombre d'animaux prévus sera au total de 120 rats, 60 SHR et 60 Wistar-Kyoto répartis en 4 groupes de 15 animaux correspondant aux différents traitements et répartis sur 2 ans.

A la fin du traitement, des explorations morphologiques et fonctionnelles non invasives (échocardiographie, enregistrement ECG par télémetrie) seront réalisées sur les animaux vivants. Puis des études de réactivité artérielle (réalisées *in vivo* et *in vitro*) et des mesures réalisées à partir de prélèvements sanguins tissulaires et cellulaires seront effectuées (paramètres biochimiques et moléculaires).

Le déroulé expérimental sera le suivant :

- supplémentation quotidienne (placebo, spiruline, spiruline enrichie, silicium) pour une durée de 12 semaines.
- échocardiographie et pose de capteurs pour les enregistrements électrocardiogrammes (ECG) deux semaines avant la fin du protocole et réalisées sous anesthésie.
- au bout des 12 semaines de supplémentation, euthanasie des animaux avec une anesthésie profonde par injection de pentobarbital, exsanguination et prélèvement des différents tissus d'intérêt (aorte, artère mésentérique, cœur, peau, queue...).

La supplémentation sera réalisée quotidiennement par la prise d'un comprimé réalisé à base de la nourriture standard des animaux additionnée de spirulines, de spirulines enrichies en silicium ou de poudre de prêle (silicium). Taille et goût des comprimés ont été étudiés pour en favoriser la prise afin de réduire le stress induit par cette manipulation.

Notre étude permettra de valider la preuve de concept sur l'efficacité du complément alimentaire en vue de l'obtention d'une allégation santé.

5992. Le virus Ebola provoque une maladie aiguë et grave, souvent mortelle. La maladie à virus Ebola est apparue pour la première fois en 1976, lors de deux flambées simultanées à Nzara (Soudan) et à Yambuku (République démocratique du Congo). Yambuku étant situé près de la rivière Ebola, celle-ci a donné son nom à la maladie.

Les épidémies de fièvre hémorragique provoquées par le virus Ebola surviennent principalement en Afrique avec un taux de mortalité variant de 25% à 90% selon le type de virus et les conditions de prise en charge. La précocité et la qualité de cette prise en charge jouent un rôle important pour diminuer la mortalité associée à la maladie.

La flambée d'Ebola qui a débuté en 2014, qui a nécessité la déclaration de l'état d'urgence internationale par l'OMS, a été responsable de plus de 28000 cas dont 11000 décès. Cette épidémie sans précédent a montré comme particularité de s'être propagée d'un pays à l'autre, partant de la Guinée pour toucher la Sierra Leone et le Libéria (en traversant les frontières terrestres), le Nigéria (par l'intermédiaire d'un seul voyageur aérien) et le Sénégal (par l'intermédiaire d'un voyageur arrivé par voie terrestre).

Il est urgent de développer des vaccins pré/post-exposition efficaces.

Nous proposons de concevoir des vaccins anticorps recombinants ciblant un antigène (Ag) d'Ebola dans les cellules dendritiques (DC), dans le but de favoriser l'activation des réponses immunes Ag-spécifiques. Sur la base de notre expertise, nous émettons l'hypothèse que les candidats vaccins induiront des réponses B et T spécifiques du virus et conféreront une immunité contre l'infection.

Nous avons construit par génie moléculaire des anticorps monoclonaux ciblant un marqueur exprimé à la surface des DCs (CD40). Ces anticorps ont été fusionnés avec la glycoprotéine (GP) des souches Ebola Zaïre et Soudan. En effet, dans une stratégie de vaccination, la GP de l'enveloppe du virus Ebola contribue largement à la protection de Primate Non Humain (PNH) contre l'infection au virus Ebola. Les DCs sont présentatrices de la GP d'Ebola, antigène qui va déclencher une réponse immunitaire. Cette réponse immunitaire sera amplifiée par l'ajout d'un adjuvant. Ces anticorps bivalents (α CD40GP-S ou Z pour anti CD40 fusionné avec la GP d'Ebola Zaïre ou Soudan) sont produits dans des lignées cellulaires et la qualité des lots vaccinaux est contrôlée.

La capacité du vaccin à stimuler des réponses immunes protectrices chez les animaux sera testée en thérapeutique après infection.

Un autre groupe travaille depuis janvier 2015 sur l'évaluation de l'efficacité du Favipiravir contre Ebola. Il a évalué différents niveaux de doses (100 à 180 mg/kg BID) et a montré pour la première fois que des doses élevées de Favipiravir permettaient d'obtenir une réduction massive de la virémie et une négativation dans certains cas permettant la survie des PNH.

Le but de ce projet est d'étudier la capacité des animaux vaccinés à contrôler l'infection et de tester le bénéfice d'une vaccination post-infection chez des animaux traités au Favipiravir dans le contexte d'un challenge Ebola. Il permettra également de déterminer à quel stade de l'infection la vaccination doit être effectuée.

Ce projet, composé d'une procédure, nécessite l'utilisation de 15 macaques cynomolgus. Des groupes de 3 animaux sont mis en place ce qui permettra de déterminer à quel stade de l'infection la vaccination doit être effectuée, de tester les anticorps seuls.

Conformité avec les 3R :

Le macaque est le seul modèle animal sensible à l'infection par la souche sauvage du virus Ebola. Dans le cadre de ce projet, l'utilisation des macaques est indispensable à la bonne réalisation des procédures expérimentales.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats interprétables afin d'explorer la meilleure approche pour observer l'action protectrice des anticorps.

Afin de raffiner l'expérimentation, une attention particulière sera portée sur l'enrichissement alimentaire, l'enrichissement de confort et sur l'enrichissement de stimulation (altères, anneaux, sachets surprises). Le bien-être animal sera suivi à l'aide d'un scoring éprouvé qui reprend les observations du comportement, de la prise alimentaire et hydrique, des symptômes hémorragiques. Les animaux seront équipés d'une gélule en intrapéritonéale (demande de projet distincte) 3 semaines avant leur transfert, ce qui permettra de suivre leur température en temps réel et d'intervenir rapidement. Les animaux seront visités quotidiennement et observés par un personnel avisé et qualifié. Le temps de travail en animalerie étant réglementé, la vidéosurveillance permet également de revoir le comportement des animaux pendant les périodes où ils ne sont pas stimulés par la présence des techniciens.

5993. Le virus Ebola provoque une maladie aiguë et grave, souvent mortelle. La maladie à virus Ebola est apparue pour la première fois en 1976, lors de deux flambées simultanées à Nzara (Soudan) et à Yambuku (République démocratique du Congo). Yambuku étant situé près de la rivière Ebola, celle-ci a donné son nom à la maladie.

Les flambées de fièvre hémorragique provoquées par le virus Ebola surviennent principalement en Afrique avec un taux de mortalité variant de 25% à 90% selon le type de virus et les conditions de prise en charge. La précocité et la qualité de cette prise en charge jouent un rôle important pour diminuer la mortalité associée à la maladie.

La flambée d'Ebola qui a débuté en 2014, qui a nécessité la déclaration de l'état d'urgence internationale par l'OMS, a été responsable de plus de 28000 cas dont 11000 décès. Cette épidémie sans précédent a montré comme particularité de s'être propagée d'un pays à l'autre, partant de la Guinée pour toucher la Sierra Leone et le Libéria (en traversant les frontières terrestres), le Nigéria (par l'intermédiaire d'un seul voyageur aérien) et le Sénégal (par l'intermédiaire d'un voyageur arrivé par voie terrestre).

Le virus Ebola appartient à la famille des Filovirus. Cinq souches ont été identifiées : Zaïre, Bundibugyo, Soudan, Reston et Côte d'Ivoire. Le virus à l'origine de la flambée 2014 en Afrique de l'Ouest appartient à la souche Zaïre (appelée également souche Gabon) et a été isolé sous le nom de Ebola Makona.

Notre groupe travaille depuis janvier 2015 sur l'évaluation de l'efficacité du Favipiravir contre Ebola. Nous avons évalué différents niveaux de doses et nous avons montré pour la première fois que des doses élevées de Favipiravir permettaient d'obtenir une réduction massive de la virémie et une négativation dans certains cas permettant la survie des primates Non Humains (PNHs). Désormais notre groupe a pour objectif d'évaluer des combinaisons antivirales permettant d'augmenter encore plus les taux de survie. En restant sur le principe d'utilisation de médicaments déjà sur le marché et donc utilisables immédiatement en cas d'épidémies, notre groupe a identifié la Gemcitabine et la Ribavirine comme deux molécules ayant une synergie importante avec le Favipiravir *in vitro*.

Le but de ce projet est d'améliorer l'efficacité du Favipiravir en pré-exposition en combinaison avec la Gemcitabine ou la Ribavirine. Une étude de toxicité et pharmacocinétique avait été réalisée pour le Favipiravir au préalable, de la même façon, les combinaisons sont également étudiées, objet d'une autre demande de projet pour un autre établissement utilisateur (EU).

Ce projet, composé d'une procédure, nécessite l'utilisation de 15 Macaques cynomolgus. Des groupes de 5 animaux sont mis en place ce qui statistiquement permet de tirer des conclusions significatives sur les comparaisons qui seront effectuées. C'est ce que nous avons pu observer lors des précédentes procédures.

Le macaque est le seul modèle animal sensible à l'infection par la souche sauvage du virus Ebola. Dans le cadre de ce projet, l'utilisation des macaques est indispensable à la bonne réalisation des procédures expérimentales.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats interprétables. Les expérimentations en cours reposent sur des séries de 15 PNHs. Elles incluent de manière habituelle des groupes de 5 PNHs. Cette distribution est justifiée dans l'état actuel de nos connaissances et de notre expérience notamment par le fait que les groupes de 5 PNHs permettent d'évaluer la variabilité inter-individuelle (souvent importante chez le PNH) et d'obtenir, pour la comparaison inter-groupes, des puissances statistiques adaptées aux besoins des études menées.

Afin de raffiner l'expérimentation, une attention particulière sera portée sur l'enrichissement alimentaire, l'enrichissement de confort et sur l'enrichissement de stimulation (altères, anneaux, sachets surprises). Le bien-être animal sera suivi à l'aide d'un scoring éprouvé qui reprend les observations du comportement, de la prise alimentaire et hydrique, des symptômes hémorragiques. Les animaux seront visités quotidiennement et observés par un personnel avisé et qualifié. Le temps de travail en animalerie A4 étant règlementée, la vidéosurveillance permet également de revoir le comportement des animaux pendant les périodes où ils ne sont pas stimulés par la présence des techniciens.

5994. La néosporose due au parasite *Neospora caninum* est une maladie répartie dans le monde entier. Cette parasitose peut conduire à des avortements chez les ovins et les bovins avec des pertes économiques annuelles estimées à plus d'un milliard d'euros. Il n'y a actuellement pas de traitement ou de vaccin contre cette maladie. Les agneaux/veaux sont infectés par des parasites ingérés (voie muqueuse) par les mères au cours de la gestation ou avant la gestation et qui persistent. Les veaux infectés naissent généralement sans symptômes mais peuvent à leur tour transmettre le parasite à leur descendance. Il est donc indispensable de développer un vaccin capable d'enrayer la persistance du parasite dans les troupeaux sur plusieurs générations. Les rongeurs étant des hôtes naturels de ce parasite, l'efficacité d'un vaccin peut être testée chez la souris.

Les souris seront immunisées par voie nasale (voie muqueuse) avec des nanoparticules (constituées de sucres et de lipides, biodégradables et non toxiques) chargées avec des protéines et des glycolipides de *Neospora caninum*, afin d'induire une réponse immunitaire protectrice (muqueuse et générale) dans un contexte de néosporose congénitale.

Les animaux seront infectés par *Neospora caninum* avant ou pendant la gestation afin de mimer les deux modes de contamination des veaux. L'efficacité du vaccin sera déterminée par la protection de la descendance (diminution de l'infection) sur deux générations.

Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de 2376 souris (2x18 femelles et une estimation de 2x270 pour la première génération et 2x900 pour la deuxième génération) dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : L'existence d'un modèle de néosporose congénitale chez la souris permet de tester l'efficacité d'un vaccin à usage vétérinaire pour les gros animaux d'élevage (ovins, bovins).

- Réduction : La formulation vaccinale et l'adjuvant efficace ont été sélectionnés lors d'une expérience précédente (70% d'efficacité sur une seule génération et un seul mode d'infection). Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques en tenant compte du rendement de gestation et de l'efficacité attendue.

- Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec les directives européennes dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger, des maisonnettes sont en supplément pour les femelles gestantes).

5995. L'hormone parathyroïdienne (PTH) possède des effets osseux dont la nature dépend de son mode d'administration. Elle favorise la formation osseuse lorsqu'elle est administrée de façon intermittente et c'est à ce titre qu'elle est utilisée en injections quotidiennes dans le traitement de l'ostéoporose, en particulier chez la femme ménopausée. Elle exerce en revanche un effet délétère sur l'os lorsque son administration est continue, comme c'est le cas dans certaines maladies des glandes parathyroïdes (hyperparathyroïdie).

Au-delà de ses effets osseux, la PTH possède des actions sur les vaisseaux sanguins dont elle peut augmenter le nombre (angiogénèse) dans de nombreux tissus. Notre laboratoire a récemment publié des observations décrivant, chez la souris, les effets

vasculaires de l'hormone dans l'os, et montré que ces effets vasculaires dépendaient, eux aussi, du mode d'administration du traitement ce qui suggère qu'une partie au moins des effets osseux de la PTH pourrait être en relation avec ses effets vasculaires.

Le projet que nous soumettons fait suite aux travaux précités et vise à préciser la chronologie des phénomènes que nous avons décrit et d'en déterminer le mécanisme.

Les animaux recevront l'un des trois traitements suivants: PTH administrée de façon intermittente, PTH administrée de façon continue ou sérum salé pour le groupe contrôle.

On étudiera au terme de 7, 14 et 28 jours de traitement l'évolution de l'arbre vasculaire en lui-même et celle de cellules qui entourent les vaisseaux et que des études récentes ont désigné comme de possible précurseurs des ostéoblastes, cellules en charge de la fabrication de l'os.

On aura recours à deux techniques différentes. La première (IHC pour immunohistochimie) détectera la présence des protéines d'intérêt dans le tissu médullaire osseux lui-même. La seconde (cryométrie) détectera les mêmes protéines au niveau de cellules isolées du tissu médullaire.

L'objectif final est de confirmer ou infirmer notre hypothèse selon laquelle il serait possible d'agir sur la vascularisation de l'os pour en améliorer la qualité.

Nos observations concernent des phénomènes physiologiques qui ne peuvent pas être observés qu'*in vivo* et ne sauraient être remplacé par des observations *in vitro*.

Nous utiliserons au maximum 144 souris pour la première technique et 90 pour la deuxième soit un total maximum de 234 souris.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude.

La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont.

Par ailleurs, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

5996. La reproduction chez les caprins a lieu naturellement à l'automne et en hiver (saison sexuelle). Cette saisonnalité conduit à des variations annuelles dans la disponibilité des produits et du prix du lait. La mise à la reproduction hors saison sexuelle est une solution pour maintenir l'offre en lait ou fromage tout au long de l'année (enjeu majeur pour la filière caprine).

Différentes techniques sont disponibles pour maîtriser la saisonnalité de la reproduction. Les traitements hormonaux d'induction des chaleurs (comportement d'acceptation de la monte du mâle) et des ovulations sont la pratique la plus efficace pour désaisonner la reproduction. Or, le contexte réglementaire et sociétal oriente vers une moindre utilisation des hormones en élevage, dans l'objectif de réduire leurs résidus dans les produits animaux et le risque de contamination de l'environnement via les effluents.

Des méthodes alternatives aux hormones existent, notamment « l'effet mâle ». L'effet mâle consiste à stimuler l'activité ovulatoire de chèvres au repos sexuel par leur exposition à des mâles sexuellement actifs. En élevage, sa mise en œuvre nécessite la préparation des boucs et des chèvres avec des traitements lumineux (ou photopériodiques) de désaisonnement ou des implants de mélatonine afin de rendre les chèvres réceptives aux boucs et les boucs sexuellement actifs. Toutefois, le développement de cette pratique en élevage est freiné par la forte variabilité des résultats obtenus, notamment dans le cadre de l'insémination artificielle.

L'efficacité de l'effet mâle peut être améliorée en caractérisant la période de réceptivité des chèvres à l'effet mâle (période pendant laquelle la sensibilité de la chèvre à la présence du mâle est optimale) et en identifiant des biomarqueurs de cette période. L'objectif du projet est de caractériser la période de réceptivité des chèvres à l'effet mâle en analysant l'évolution des concentrations sanguines en stéroïdes (hormones impliquées dans le cycle sexuel) et en métabolites (petites molécules qui reflètent un état physiologique) avant l'exposition au mâle.

Un total de 70 chèvres adultes en lactation et 12 boucs pubères, de race alpine, seront utilisés.

Ces expérimentations comprennent 1 procédure concernant les prélèvements sanguins dans la veine jugulaire (au niveau du cou).

La règle des 3R sera respectée comme suit :

- Remplacement:

L'activité sexuelle du bouc et de la chèvre, l'ovulation et l'expression des chaleurs sont des phénomènes complexes qui ne peuvent pas être étudiés *in vitro*.

- Réduction:

Des travaux antérieurs sur l'espèce porcine nous permettent de disposer de résultats préliminaires et de réduire au minimum le nombre d'animaux.

- Raffinement:

Les chèvres seront hébergées en groupes, sur une litière paillée, le milieu sera enrichi (pneus suspendus régulièrement remplis de foin, plateformes, brosses). Les chèvres feront l'objet d'une surveillance pendant toute la durée du protocole, en particulier au moment de la traite deux fois par jour. En cas de symptôme inquiétant, une intervention vétérinaire aura lieu et l'animal sera sorti du protocole si nécessaire. Les prélèvements sanguins seront réalisés par des opérateurs expérimentés (animaliers). Des précautions seront prises afin d'éviter tout risque de phlébite (tonte au niveau du cou pour mieux visualiser les veines, et si nécessaire application d'un baume antiseptique et cicatrisant).

5997. La prévalence de l'obésité s'est accrue de manière épidémique dans les pays développés. Compte tenu du lien étroit entre obésité et maladies métaboliques, cela pose un grave problème de santé publique. Résultant d'un déséquilibre entre calories ingérées et dépensées, l'excès de poids a souvent pour origine une perturbation du comportement alimentaire et/ou du

métabolisme énergétique. Bien que les parts environnementale et génétique jouent un rôle indéniable dans ces perturbations, on sait maintenant que comportement alimentaire et métabolisme énergétique nous sont, en partie, dictés par notre héritage épigénétique. Ainsi l'alimentation d'un individu influencerait non seulement l'expression de ses propres gènes mais également celle des gènes de sa descendance. Pourquoi dans un environnement similaire, des individus deviennent-ils obèses et développent des maladies métaboliques alors que d'autres restent sains ? De récentes données indiquent que les molécules d'ARNs présentes dans les spermatozoïdes de souris obèses et diabétiques seraient impliquées dans ce processus. Identifier les molécules d'ARNs responsable de ces pathologies est l'objectif du projet. Pour cela des souris adultes issues d'une autre animalerie et qui dérivent de la micro-injection dans des embryons de molécules d'ARNs identifiées préalablement comme étant potentiellement responsable du phénotype seront reçues dans notre animalerie et analysées sur le plan métabolique. Ces analyses métaboliques font l'objet de la présente demande. Il s'agit de 3 tests: le test de Résistance à l'insuline (ITT), celui de tolérance au glucose (GTT) et un prélèvement sanguin.

Notre travail porte sur la transmission paternelle de caractères nouvellement acquis sur un mammifère. Etant donné que les mécanismes moléculaires de ce type d'hérédité ne peuvent être analysés *in vitro*, nous utilisons parallèlement à notre modèle murin et en collaboration un modèle non-vertébré, *C. elegans*. Ce modèle nous permet d'étudier certains aspects des mécanismes moléculaires de cette hérédité (Remplacement). Cependant, ce modèle a des limites. Il n'est, notamment, pas possible d'analyser les effets métaboliques d'une alimentation riche en graisse. Afin de calculer la taille de l'échantillon nécessaire, nous avons réalisé un calcul de puissance, test qui permet de minimiser le nombre d'échantillons et donc d'animaux nécessaires pour valider ou non notre hypothèse de départ (Réduction). Dans un souci de Raffinement, nous mettons en place toutes les dispositions permettant de minimiser les souffrances éventuelles qui pourraient être associées à nos expériences : recours à l'anesthésie. Afin de réduire la contrainte imposée à chaque animal, les différents tests seront réalisés en respectant un intervalle d'au moins une semaine entre chaque test. Des analyses moléculaires et histologiques seront ensuite réalisées sur chaque souris.

Nous prévoyons utiliser au plus 1440 souris pour l'ensemble de ces travaux.

5998. Etude du potentiel thérapeutique de molécules pharmacologiques sur des xénogreffes de cellules humaines du cancer du foie chez la souris Nude

Ce projet vise à étudier le développement du carcinome hépatocellulaire et à évaluer l'efficacité des thérapies anticancéreuses. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le cancer primitif du foie le plus courant. Il représente la troisième cause de morts par cancer dans le monde. Son diagnostic est mauvais avec une médiane de survie de 6 mois. Il n'existe pas de traitements pharmacologiques efficaces. Aujourd'hui, le Sorafenib (un inhibiteur multikinase) est le seul médicament augmentant la survie des patients atteints de stades avancés d'CHC.

Il est donc urgent de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le cancer du foie et de proposer des thérapies anticancéreuses adaptées. Il a été montré que l'inflammation au niveau du foie associée à l'activation de la voie de la réponse au stress du réticulum endoplasmique (RE) jouerait un rôle central dans la progression tumorale. Notre équipe de recherche s'intéresse à une protéine de la voie de la réponse au stress du réticulum endoplasmique (RE) qui est fortement activée lors de la progression tumorale et dont les données de littérature montrent clairement le rôle dans la régulation de l'inflammation et de prolifération tumorale. Nous disposons de composés pharmacologiques bloquant l'activité de cette protéine. Les effets anti-tumoraux de ces composés n'ont jamais été testés dans le contexte du cancer du foie. Ces études proposées seront réalisées chez la souris nude immunodéprimée (souris mutante) car les approches sur cellules isolées ne permettent pas de mimer la physiopathologie de maladies retrouvées chez l'homme. Ces études permettent de déterminer l'efficacité anti-tumorale de ces composés pour après pouvoir les utiliser chez l'homme.

De plus, ces études seront réalisées dans le souci d'utiliser un nombre minimum d'animaux (792 animaux pour toutes les procédures) et leur bien-être sera scrupuleusement pris en compte dans toutes les procédures selon la règle des 3R.

Pour satisfaire au remplacement, nous avons initiées des études *in vitro* sur des lignées d'hépatocytes dérivées de patients atteints de cancer du foie (HepG2, Huh7). Ces études montrent que les composés pharmacologiques testés (ciblant spécifiquement notre protéine d'intérêt) potentialisent l'action thérapeutique du sorafénib, au niveau de cellules cancéreuses hépatiques *in vitro* (diminution de la prolifération tumorale et augmentation de la mort des cellules cancéreuses). Egalement, des composés aux propriétés anti-inflammatoires, en combinaison avec le sorafénib, potentialisent son action au niveau de cellules cancéreuses hépatiques *in vitro*. Cependant, pour évaluer l'efficacité de nos composés, il est nécessaire d'étudier chez l'animal car il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de tenir compte de toute la complexité d'un organisme.

Pour satisfaire à la réduction. Les expériences *in vivo* sont précédées de multiples expériences et mises au point *in vitro* ce qui permettra de n'utiliser que le nombre de souris strictement nécessaire. La comparaison entre les différents groupes de souris (véhicule seul versus drogue d'intérêt) sera analysée par des tests non-paramétrique (Kruskall-Wallis) ou paramétrique (test-t). Une valeur de $p < 0.05$ sera considérée comme significative. Si les composés anti-tumoraux ne sont pas efficaces chez l'animal, nous ne renouvelerons pas la procédure.

Pour satisfaire au raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés avec un enrichissement systématique et les personnes réalisant les différentes procédures respecteront les règles éthiques lors des manipulations et euthanasies des animaux. La surveillance quotidienne des animaux par les animaliers et nos surveillances régulières nous permettront d'identifier les animaux souffrants et de prendre les mesures nécessaires. Tous les participants sont tous dûment qualifiés et diplômés dans le domaine.

5999. La réponse immunitaire médiée par une catégorie de leucocytes appelée lymphocytes T contribue à la pathogenèse de nombreuses maladies du foie parmi lesquelles les hépatites d'origine virale, auto-immune, alcoolique et médicamenteuse. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des lésions hépatiques induites par l'activation des lymphocytes T restent mal connus.

Chez la souris, l'injection intraveineuse d'une dose unique de concanavaline A (une protéine d'origine végétale qui induit l'activation et le recrutement des lymphocytes T dans le foie) est utilisée comme modèle d'hépatite aiguë.

La sirtuine 6 (SIRT6) est une protéine impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires tels que le métabolisme énergétique, certaines réponses au stress, l'inflammation et la tumorigenèse. Nos résultats préliminaires indiquent que l'inactivation de SIRT6 dans les hépatocytes (principales cellules du foie) protège les souris de l'hépatite induite par la concanavaline A, suggérant ainsi que SIRT6 pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique. De plus, des données de la littérature indiquent que SIRT6 pourrait aussi réguler l'activation des lymphocytes T.

Ce projet d'expérimentation animale a donc pour but de poursuivre la caractérisation du rôle de SIRT6 dans les hépatocytes et d'explorer son rôle dans les lymphocytes T dans le modèle d'hépatite aiguë induite par la concanavaline A.

Pour satisfaire au remplacement, nous réaliserons des études *in vitro* sur des lignées cellulaires. Cependant, pour comprendre l'implication de SIRT6 dans les maladies inflammatoires du foie, il nous est nécessaire de réaliser des études *in vivo* car les études *in vitro* ne permettent pas de reproduire les interactions complexes qui existent entre les différents types tissulaires présents dans le foie.

Pour satisfaire à la réduction, nous utiliserons un schéma de croisement qui génère 50% de souris contrôles et 50% de souris invalidées pour SIRT6 ce qui évite la génération d'animaux inutiles. Nous prévoyons d'utiliser 1794 souris sur une période de 5 ans. Chaque procédure utilise un nombre d'animaux minimum mais nécessaire pour réaliser des études statistiques pertinentes.

Pour satisfaire au raffinement, nous serons particulièrement attentifs à tout changement dans l'apparence et le degré d'activité des animaux. La surveillance assurée par les expérimentateurs nous permettra de déceler précocement tout signe de stress ou de douleur et d'appliquer les points limites que nous avons définis. Il est important de préciser que les souris avec une inactivation de SIRT6 dans les hépatocytes ou les lymphocytes T ne présentent pas de phénotype dommageable.

6000. Le but de cette étude est de déterminer la meilleure dose efficace à utiliser dans le traitement de l'achondroplasie, qui est la forme de nanisme la plus fréquente, afin de l'amener jusqu'en phase clinique. Ceci se place dans la continuité d'un projet précédent. Cette maladie est due à une modification dans le gène FGFR3 qui résulte en son activation prolongée. Cette activation aberrante de FGFR3 est directement responsable de l'arrêt de la croissance osseuse. Il a été montré dans une étude précédente que nous avons trouvé un traitement pour ce nanisme.

Nous avons des souris malades qui présentent la même maladie que les patients. Ce projet nécessite l'utilisation de ces animaux afin de déterminer la dose la plus efficace et ensuite transposer son utilisation dans d'autres modèles et ainsi continuer le développement pharmacologique de la molécule.

Ce projet aura des bénéfices pour l'homme sur plusieurs niveaux. D'une part, à l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement pour l'achondroplasie permettant de restaurer une croissance osseuse et donc de permettre aux patients de grandir mais surtout d'éliminer les complications et notamment les paralysies de la moelle épinière. Nos résultats préliminaires sont très encourageants et suggèrent que notre traitement pourra éventuellement être utilisé en clinique. Le but de cette étude est d'apporter la preuve de concept clinique. Les projets précédents nous ont permis de choisir la molécule qui va être utilisée dans les essais cliniques.

Afin de satisfaire avec les exigences de la règle des 3R nous avons déjà mis en place différentes stratégies. Tout d'abord dans un but de remplacement nous avons déjà réalisé un screening *in vitro* des molécules à tester afin de ne tester *in vivo* que la molécule présentant un potentiel thérapeutique élevé, basé sur la comparaison avec l'étude précédente que nous avons réalisé et qui a démontré une efficacité chez l'animal. Dans un but de réduction nous avons estimé le nombre d'animaux strictement nécessaire fondé sur un calcul de puissance statistique et basé sur notre expérience des résultats précédents. Enfin dans un but de raffinement des expériences nous réalisons une évaluation précise de l'état des animaux au cours des procédures grâce à des grilles de suivis et l'établissement de points limites précoces. Nous estimons que nous allons utiliser au maximum 3600 souris soit 1000 souris dans la procédure 1, 2600 souris dans la procédure 2.