



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

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

Résumés non techniques des projets autorisés (11)

1101. Les sous-produits animaux (SPA) constituent une source majeure de protéines très peu exploitée en Europe. En effet, sur les 3 millions de tonnes produites chaque année dans les abattoirs et équarrissages en France, près du tiers est aujourd'hui incinéré. Dans le cadre du projet DESIRABLE financé par l'ANR, nous étudions la valorisation des sous-produits animaux par des insectes, qui pourront ensuite être incorporés à la nourriture des poissons et des volailles. L'utilisation d'insectes instaure une barrière d'espèce supplémentaire susceptible de limiter la transmission de maladies, et notamment celles dues aux prions.

Pour cela, il faut dans un premier temps assurer la sécurité de ces matières vis-à-vis des risques sanitaires, notamment celui du prion. La réglementation européenne considère qu'un traitement est efficace vis-à-vis des prions s'il réduit la charge infectieuse initiale de 99,9999%, soit d'un facteur 1.000.000.

Une nouvelle méthodologie de décontamination du prion reposant sur des conditions douces a été développée en respectant les standards de l'agro-alimentaire. Elle maintient les caractéristiques nutritionnelles et organoleptiques des sous-produits animaux tout en inactivant les prions : la forme pathologique de la PrP, ou PrPres, seul marqueur spécifique des maladies à prion, n'est plus détectable par les méthodes *in vitro* disponibles, ce qui correspond à une réduction de l'infectiosité initiale d'un facteur mille (au moins).

Ces méthodes *in vitro* permettent une première sélection des traitements de décontamination potentiellement efficaces, mais présentent deux inconvénients. D'une part leur sensibilité est limitée (un facteur mille au lieu du million requis), d'autre part elles détectent un marqueur (PrPres) mais pas l'infectiosité en tant que telle. Or de nombreuses publications font état d'une possible dissociation entre infectiosité et présence de PrPres. Il est donc indispensable de confirmer l'efficacité d'un traitement de décontamination par inoculation à l'animal de laboratoire, aucune méthode alternative *in vitro* pertinente n'existant à l'heure actuelle.

Le bio-essai repose sur la contamination artificielle d'une matrice avec une quantité connue d'une souche de prion expérimentale (souche de tremblante 263 K). Après traitement de cette matrice avec le protocole de décontamination à étudier, celle-ci est inoculée par voie intracérébrale à un rongeur modèle sensible à cette souche de prion. Les animaux seront suivis cliniquement et euthanasiés à l'apparition de signes cliniques neurologiques évidents. Le diagnostic de maladie à prion sera confirmé par examen biochimique. La période d'incubation des maladies à prion étant inversement proportionnelle à la charge infectieuse initiale (allongement de la période d'incubation lorsque la charge infectieuse diminue), des dilutions sériées de matrice contaminée non traitée seront inoculées à des animaux contrôles. Les réductions de titre infectieux des échantillons traités seront déterminées par comparaison à cette gamme de dilutions contrôles.

Nous prévoyons de tester en parallèle plusieurs traitements de décontamination, afin de mutualiser les animaux contrôles. Un total de 320 rongeurs, nés et élevés en captivité dans des établissements agréés, sera inclus dans cette étude. Cela correspond au minimum nécessaire pour obtenir des données suffisamment solides statistiquement.

Les rongeurs seront surveillés cliniquement tout au long de l'expérience, ce qui nous permettra d'intervenir de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. A l'installation de signes neurologiques évidents, les animaux seront euthanasiés et la présence de PrPres sera recherchée dans leur cerveau par des techniques biochimiques et histologiques pour confirmation du diagnostic clinique établi.

1102. Il apparaît de plus en plus clairement que seule la combinaison de plusieurs traitements qui ciblent différents processus liés au cancer aura une réelle efficacité dans la lutte contre ce problème de santé publique majeur. Le cancer du rein représente 3% des cancers chez l'adulte et le traitement de choix actuellement est l'opération chirurgicale. Il est donc urgent de trouver de nouveaux traitements.

Une étude préliminaire réalisée dans le laboratoire, sur des cellules tumorales en culture, a effectivement montré un effet synergique de deux médicaments. Dans le but d'étudier l'efficacité de ces combinaisons de molécules, nous avons proposé un modèle rongeur dans lequel des tumeurs rénales d'origine humaine sont implantées, soit en sous-cutané, soit sous la capsule rénale. L'objectif était de réaliser dans un premier temps des coupes de tissu tumoral à mettre en culture pour tester ces traitements combinés. Deux lignées cellulaires ont été utilisées, les 786-O exprimant ou non un gène suppresseur de tumeur nommé Von Hippel Lindau (les cellules sont appelées 786-O VHL- et VHL+), représentatives des tumeurs humaines. Les

résultats préliminaires obtenus étant concluants, nous souhaitons poursuivre ce travail très prometteur en traitant directement les animaux porteurs de ces xénogreffes tumorales.

Le projet portant sur des approches thérapeutiques, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. En effet, l'efficacité du traitement doit maintenant être testée sur un organisme vivant, toutes les expériences préliminaires ayant été validées. Le choix et le nombre de rongeurs, nés et élevés dans des élevages agréés, ont été déterminés grâce aux expériences réalisées dans le cadre d'un projet antérieur. Ceci nous a permis de réduire le nombre d'animaux (480) utilisés au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

L'expérience est réalisée dans une animalerie contrôlée pour son absence de pathogènes. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'étude et évalué grâce à une grille d'observation clinique permettant de limiter les contraintes pour les animaux. L'utilisation de cette grille nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance des animaux. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. La règle des 3R reste notre préoccupation permanente

1103. Ce projet s'inscrit dans le cadre de la recherche d'un antidiabétique efficace à long terme. Cette recherche fait appel à de nombreux tests *in vitro* permettant de sélectionner grâce à des critères stricts les meilleures molécules dont l'efficacité sera déterminée *in vivo* dans des modèles animaux de diabète de type 2. Ces études d'efficacité à long terme de nos molécules *in vivo* sont majoritairement réalisées dans des modèles pathologiques rats ou souris monogéniques ou induits sous régime obésogène. Néanmoins, une limitation majeure de ces modèles rats et souris est l'absence du gène CETP qui code pour une protéine de transfert plasmatique essentielle à l'homéostasie du cholestérol chez les espèces supérieures. L'absence de ce gène chez les rats et les souris ne permet pas de mesurer de manière fiable l'effet d'une molécule candidate sur le profil lipidique et donc de déterminer son influence d'un point de vue cardio-vasculaire au sens large. Le Hamster est une espèce qui exprime de manière constitutive la CETP et dont le profil lipidique est très proche de celui de l'homme. Ce projet a donc pour but de confirmer les propriétés antidiabétiques d'une molécule, établies dans les modèles rats ou souris et d'approfondir l'influence du traitement pharmacologique sur l'homéostasie du cholestérol chez le hamster. Les hamsters reçoivent quotidiennement (une à deux fois par jour) la molécule à évaluer pour une durée maximale de quatre semaines. A la fin de l'étude, l'ensemble des paramètres liés à l'homéostasie lipidique (cholestérol, triglycérides, acides gras libres, acides biliaires) et glucidique (glycémie, insuline, HbA1c) sont mesurés sur sang total ou plasma après un prélèvement terminal sous anesthésie générale.

L'effet à long terme sur les métabolismes glucidique et lipidique ne peut être détecté qu'après un traitement chronique de plusieurs semaines chez l'animal et requiert la physiologie qui intègre toutes les interactions hormonales et neuronales, ce qui n'est pas le cas sur des cellules ou organes isolés. Il n'y a donc pas de méthode alternative. Le projet fait appel à des animaux sains et est estimé de gravité modérée essentiellement lié au traitement pouvant durer 4 semaines et aux potentiels effets sur les métabolismes glucidiques et lipidiques. Afin de le réduire au maximum, le nombre d'animaux utilisés pourra si besoin être réajusté suite à une estimation de la variabilité statistique des paramètres mesurés sur quelques études pilotes. On estime à 50 le nombre d'animaux par étude et on pense réaliser 5 études par an soit environ 250 hamsters par an pour toute la durée du projet.

1104. Une épidémie de maladie à virus Ebola a débuté en Guinée en décembre 2013 avant de s'étendre au Liberia, à la Sierra Leone et au Nigeria. L'épidémie actuelle, causée par la souche Zaïre du virus, est la plus meurtrière depuis la découverte des premiers cas en 1976. C'est la première fois que le virus est détecté hors d'Afrique centrale.

Selon une prévision, datant d'août 2014, de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'épidémie pourrait entraîner plus de 20 000 cas de contaminations avec un taux de létalité de plus de 50%.

La transmission du virus Ebola nécessite un contact physique rapproché avec une personne infectée présentant des symptômes ou un contact avec des surfaces souillées par les liquides biologiques de la personne (vomissements, linge par exemple). Les personnels de santé sur le terrain et les femmes sont particulièrement touchés.

Devant l'urgence de la situation, des traitements expérimentaux sont en cours de développement et doivent être rapidement validés.

Les experts en éthique médicale de l'OMS, devant les circonstances de l'épidémie et sous réserve que certaines conditions soient remplies, ont abouti au consensus estimant qu'il est éthique d'offrir des traitements non homologués dont l'efficacité n'est pas encore connue ainsi que les effets secondaires, comme traitement potentiel ou à titre préventif.

Le T-705 (favipiravir) a été développé pour traiter les infections aux virus Influenza. La molécule agit contre les virus à ARN. Dans les modèles animaux, le T-705 a principalement été utilisé par voie orale, mais le fabricant a développé un produit utilisable par voie intraveineuse.

Dans ce projet, la pharmacocinétique de la molécule T-705 est analysée sur 20 macaques dans le but de valider son utilisation chez l'homme dans le traitement des infections à virus Ebola. Le nombre d'animaux testés a été réduit au strict minimum pour obtenir des données scientifiquement interprétables et les procédures expérimentales s'appuient sur les techniques les moins invasives disponibles en l'état des connaissances actuelles. Une attention particulière est portée aux animaux en termes d'enrichissement et de suivi comportemental.

1105. La dépression est un problème majeur de santé publique. Les traitements actuellement disponibles prennent imparfaitement en charge la maladie. Notamment, leur délai d'action est long et ils peuvent provoquer par eux-mêmes des troubles anxieux en début de traitement.

Dans le cadre de nos recherches sur les maladies psychiatriques, nous avons identifié une cible au niveau du système nerveux central, qui est impliquée dans les processus d'anxiété et de dépression. Nous disposons de molécules dont la caractérisation pharmacologique dans des essais *in vitro* prouve leur activité sur cette cible et donc les positionne comme des candidats médicaments potentiels. En seconde étape de caractérisation pharmacologique, nous mettons en œuvre des modèles animaux qui grâce à leurs caractéristiques comportementales permettent de reproduire certains symptômes de pathologies humaines. Le but est d'estimer l'efficacité thérapeutique potentielle des molécules candidates. Plus particulièrement, nous souhaitons déterminer si la modulation de notre cible par ces molécules provoque chez le rat des variations de son niveau d'anxiété. Le test d'interaction sociale est une approche qui permet de répondre à cette question. Il utilise le répertoire comportemental spontané des rats adultes qui, lorsqu'ils sont placés par pair dans un environnement nouveau et plus éclairé que leur habitat, développent une anxiété modérée se traduisant par une baisse relative de l'intérêt pour le congénère. Ce test possède une forte valeur translationnelle à l'homme. En effet, 1) les médicaments anxiolytiques sont actifs dans ce test et 2), comme ce qui est observé en début de traitement chez le patient déprimé, les antidépresseurs inhibiteurs de la recapture de sérotonine et /ou de noradrénaline sont clairement anxiogènes dans ce test lorsqu'ils sont administrés en aigu. Cet effet disparaît à la suite d'un traitement chronique. L'objectif du projet est d'identifier un antidépresseur amélioré, c'est à dire ne possédant pas cet effet anxiogène - voire même possédant des propriétés anxiolytiques - en traitement aigu ou montrant une tolérance rapide en traitement chronique.

1106. Le rat mâle adulte a été utilisé à l'origine pour mettre au point ce modèle, qui a ensuite été validé pharmacologiquement par de nombreux laboratoires. Il en ressort une forte valeur prédictive des effets pharmacologiques sur l'homme ce qui le place comme un modèle de choix dans le cadre d'un développement pré-clinique pour répondre à la question de l'efficacité thérapeutique de nos molécules *in vivo*. Les molécules évaluées dans le test d'interaction sociale seront celles ayant préalablement démontré une activité *in vitro* marquée sur notre cible, le choix des doses à utiliser sera adapté en fonction des résultats obtenus lors des tests de sécurité réalisés en amont, ce qui permet de prédéfinir les gammes de doses potentiellement efficaces et ainsi éviter de multiplier les expérimentations et en conséquence le nombre d'animaux utilisés. Pour une expérimentation, le nombre de couples d'animaux par lot est a priori fixé à 8, mais après quelques études pilotes, une consultation statistique sera réalisée pour évaluer la possibilité de diminuer ce nombre, et donc le nombre d'animaux nécessaires à ce projet.

On peut estimer sur toute la durée de ce projet (5 ans) une utilisation de 1440 rats par an.

Le projet est de degré de gravité léger, pour un objectif thérapeutique important chez l'homme.

1107. La sclérose en plaques (SEP), décrite par Jean-Martin Charcot, est une maladie neurologique auto-immune chronique du système nerveux central. Elle débute entre 20 et 40 ans et touche préférentiellement les femmes (en France le rapport est de 1,7). Les causes de la SEP sont imparfaitement connues. Elles associent des facteurs génétiques, des facteurs environnementaux et un facteur déclenchant de la maladie. Classiquement, la SEP évolue avec des poussées de la pathologie qui alternent avec des phases de rémission. Lors des phases de rémission, on observe une diminution ou une stabilité des symptômes.

Dans la SEP, les lésions anatomiques consistent en des zones plus ou moins étendues de démyélinisation au sein de la substance blanche du système nerveux central. Les conséquences de cette démyélinisation sont à l'origine des signes cliniques de la maladie tels que les troubles de la motricité, de la sensibilité ou encore de la vision.

Depuis 10 ans, les innovations thérapeutiques ont permis de trouver de nouveaux médicaments pour améliorer la qualité de vie des personnes atteintes de SEP. Ces traitements agissent sur la durée et la gravité des poussées, sur les symptômes ou sur le système immunitaire.

Cependant à ce jour aucun traitement n'est efficace pour lutter contre les formes progressives de la SEP et les traitements proposés aux patients ne permettent pas une prise en charge spécifique et satisfaisante.

La recherche est actuellement concentrée sur le développement de thérapeutiques dites « ciblées » c'est à dire qui vont interférer avec des fonctions précises qui sont impliquées dans la pathogénie de la maladie.

Le but de ce projet est de valider des molécules de références dans un modèle de SEP chez la souris afin de pouvoir tester l'efficacité des nouveaux traitements. Le modèle souris est préférable par rapport à d'autres modèles du fait que de nombreux outils de diagnostics sont disponibles pour cette espèce.

La pathologie est induite par l'injection à des souris d'une molécule issue du système nerveux. La maladie se manifeste par des paralysies progressives des membres postérieurs dont le degré est quantifiable par un système de score bien établi. Comme chez l'homme la phase de crise de la pathologie est suivie d'une rémission spontanée, ce modèle peut également reproduire les cycles crise-rémission.

Lors de nos travaux en général et pour ce développement en particulier, nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soins aux animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

Sur une période de 2 ans, l'utilisation de 300 souris est envisagée.

1108. Ce projet concerne l'efficacité d'un produit immunologique destiné à protéger contre une maladie mortelle chez une espèce de carnivore domestique.

La mise en œuvre de ce projet comporte une procédure expérimentale permettant d'évaluer l'efficacité à long terme de ce produit ainsi qu'une procédure de validation de l'outil permettant cette évaluation.

Ces procédures sont conçues en accord avec les textes en vigueur de la Pharmacopée Européenne et avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

- un caractère de stricte nécessité et ne pouvant pas être remplacées par des méthodes expérimentales alternatives : en effet, elles répondent à l'obligation réglementaire d'être conduites sur l'espèce de destination,
- le nombre d'animaux envisagé par groupe sera déterminé pour à la fois être conforme à la réglementation et obtenir des données valides. Au total, un nombre maximum de 44 animaux sera impliqué dans ce projet,
- des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long des procédures,
- du fait de la classe sévère des procédures, des points limites adaptés et précisément définis qui seront appliqués afin d'éviter toute souffrance des animaux,
- un hébergement des animaux par groupe de manière à ne pas induire un stress d'isolement.

Nous envisageons d'évaluer la pyrogénicité de préparations d'origine bactérienne destinées à renforcer le caractère immunogène de vaccins. Ces préparations ont subi des essais sur des cultures cellulaires laissant supposer qu'elles seraient parmi les moins pyrogènes de leur famille de molécules. Le présent projet vise à les comparer à des molécules de référence peu pyrogènes dans les conditions des essais réglementaires sur l'animal tel que prévu par la pharmacopée.

Dans le présent projet, les préparations à tester sont injectées à des groupes de trois lapins et comparées à des produits de référence dont la pyrogénicité est connue. Lorsque les résultats sur la température corporelle sont douteux ou positifs, un nouvel essai est conduit sur un groupe de huit lapins. Ces nombres d'animaux ainsi que les critères permettant de classer une préparation comme pyrogène ou non sont définis par la pharmacopée internationale (OMS). Des tests d'évaluation de la pyrogénicité *in vitro* existent mais ils ne sont pas à ce jour approuvés par l'OMS et ne peuvent donc remplacer les essais sur animaux.

Les produits entrant dans une phase de développement pré-clinique doivent de surcroît être évalués de manière à déterminer une dose maximale non pyrogène et sur ces produits une étude d'escalade de dose devra être menée.

Afin de réduire le nombre total d'animaux utilisés, nous envisageons de comparer les combinaisons préparation/dose 4 par 4. Pour évaluer la pyrogénicité de 4 doses de produits, chaque test requiert un nombre de lapins compris entre 21 et 72. Nous envisageons de pouvoir reproduire ce test 5 fois par an pendant 5 ans et le nombre total maximal d'animaux pouvant être impliqué dans ce type de procédures est donc de 1800.

A priori, les produits testés devraient être non ou faiblement pyrogènes et n'impacter que très modérément le bien-être animal. Dans un objectif de raffinement, nous prévoyons d'interrompre le test si la température mesurée pour un lapin augmente de plus de 1,5°C pendant plus de 30 minutes (le produit est considéré comme pyrogène si la température augmente de plus de 0,6°C dans les trois heures suivant l'injection).

1109. Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche destiné à identifier de nouvelles molécules permettant de traiter la fibrose hépatique. Cette pathologie est définie par l'accumulation excessive des constituants de la matrice extracellulaire dans le parenchyme hépatique. C'est la complication majeure de toutes les maladies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine alcoolique, virale, parasitaire, biliaire ou liée à l'exposition à certains médicaments. Cette affection est associée à une évolution pathologique grave, puisqu'au stade tardif de la maladie, une cirrhose hépatique et ses complications potentielles, insuffisance hépatique et hépatocarcinome (HCC) peuvent survenir.

A ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la fibrose. Aussi, plusieurs voies de recherche et de développement sont en cours pour palier à ce déficit. Afin d'étudier et d'étayer nos hypothèses lors du développement de nos molécules, il nous sera inévitable d'avoir recours à des modèles animaux présentant une pathologie similaire à celle qui se produit chez l'Homme, des méthodes alternatives n'étant pas disponibles à ce jour.

Il existe plusieurs méthodes pour induire expérimentalement une fibrose hépatique chez l'animal de laboratoire. Nous utiliserons le modèle de fibrose hépatique induit par l'administration chronique de thioacétamide (TAA) chez la souris sauvage et chez le rat sauvage. Ce modèle permet le développement d'une fibrose, pouvant évoluer vers une cirrhose et un hépatocarcinome.

Les procédures expérimentales utilisées dans ce projet sont de classe modérée et seront réalisées dans les conditions les moins stressantes possibles pour les animaux. Dans un souci permanent du bien-être animal et afin de minimiser l'emploi des animaux de laboratoire, l'évaluation des molécules sera réalisée en priorité dans des modèles *in vitro*. Les molécules ayant prouvé un potentiel thérapeutique dans ces études feront alors l'objet d'une évaluation chez l'animal. Ce projet engagera des souris et des rats et dans un nombre estimé à 1936 individus pour la durée que couvrira ce projet. Le nombre d'animaux utilisés dans chaque lot de chaque procédure est réduit, il correspond au seuil minimal qui puisse nous permettre d'apprécier, avec nos moyens techniques et en fonction de la variabilité inter-individus, les effets désirés.

Par ailleurs, l'hébergement des animaux pendant la phase d'acclimatation et pendant l'expérimentation sera faite avec enrichissement du milieu afin d'améliorer leur bien-être.

Cette stratégie nous permet de définir préalablement des points limites éthiquement et scientifiquement acceptables, en tenant compte des objectifs de l'étude. A terme, nos travaux pourraient ouvrir de nouvelles voies de traitement de certaines formes de maladies hépatiques chroniques, aujourd'hui ce besoin médical est clairement établi.

1110. Les infections chroniques par les virus de l'hépatite C (VHC), de l'hépatite B (VHB) et de l'hépatite Delta (VHD) sont un problème majeur de santé publique du fait de leur prévalence élevée (3% de la population mondiale, soit 170 millions d'individus infectés par le VHC et 4.2% soit 240 millions par le VHB). L'infection par le VHD est concomitante à une infection par le VHB et entraîne une aggravation de la maladie hépatique. La sévérité de des complications, cirrhose hépatique et carcinome hépatocellulaire (CHC), font de ces infections l'une des indications majeures de la greffe de foie. La mise au point d'un vaccin contre le VHC a été entravée par le manque d'un petit modèle animal idéal pour l'infection par ce virus. De même, l'investigation de traitements permettant l'éradication du VHB et/ou du VHD ne peut se faire que grâce à la mise au point d'un modèle in vivo permettant le développement d'une infection chronique. En effet, les cellules de foie (hépatocytes) de souris sont naturellement résistantes à l'infection par ces 3 virus. Le chimpanzé a été utilisé pour étudier l'infection aiguë et chronique par le VHC et le VHB mais l'utilisation de ce modèle est interdite en Europe depuis la nouvelle loi relative à l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales. De fait, des modèles animaux alternatifs pour la recherche sur les virus hépatotropes ont été mis au point. Ils sont basés sur l'utilisation de souris immunodéficientes et hépatodéficientes greffées avec des hépatocytes primaires humains (PHH) qui vont pouvoir reconstituer un foie "chimérique". Ces souris ainsi humanisées peuvent alors être inoculées avec des virus recombinants ou naturels, issu de sérums de patients chroniquement infectés. Notre objectif est donc de produire en routine de telles souris "humanisées" telles que décrites par Mercer et al. (Nat Med. 2001;7:927-33) afin d'étudier les interactions virus-hôte et de valider au niveau préclinique les approches thérapeutiques innovantes développées au sein de notre laboratoire. Ces approches sont basées sur l'utilisation d'inhibiteurs d'entrée du virus (anticorps monoclonaux, molécules chimiques, nanoparticules, ARN interférent...) ou sur des approches d'immunothérapie cellulaires. Ainsi, nous greffons des PHH par injection intrasplénique à des souris âgées de 21 à 24 jours, dans les jours qui suivent le sevrage. La prise de greffe est monitorée par dosage de l'albumine humaine présente dans le sérum de la souris, prélevé 4 et 8 semaines après la greffe : en fonction des taux d'albumine humaine obtenus, les souris sont euthanasiées (<0,05 mg/ml albumine), utilisées dans des expériences d'innocuité ou inoculées avec du VHB/VHD (0,05-1 mg/ml) ou inoculées par le VHC (>1 mg/ml, 20 à 100% des animaux greffés selon le lot de PHH), en zone de confinement de sécurité biologique de niveau 3 pour être et utilisées en expérimentation. Les niveaux d'infections sont mesurés par détection de l'ADN du VHB ou de l'ARN du VHC ou du VHD dans le sérum des souris inoculées. Il s'agit en d'une production en routine. En estimant une vingtaine de greffes par mois pendant 5 ans (durée maximale autorisée), le nombre de souris utilisées devrait avoisiner les 1200. Afin de réduire le nombre de souris nous sommes passé sur une production de souris à partir des souris homozygotes, seules souris permettant une prise de greffe efficace d'hépatocytes. Afin de raffiner au mieux notre méthodologie, nous avons mis en place des points limites que sont les signes de douleurs persistants plus de 48h post-greffe, ainsi que les dosages de l'albumine humaine sérique. En effet des souris avec des taux inférieurs à 50µg/mL ne pourront être utilisées ultérieurement en expérimentation du fait du faible nombre d'hépatocytes ayant repopulés le foie. Afin de remplacer le plus possible l'utilisation d'animaux pour l'étude des virus hépatotropes, nous réalisons, quand cela est possible un maximum de tests in vitro en lignées cellulaires.

1111. L'utilisation du fentanyl en patch ou en solution transdermique pour la prise en charge de la douleur des chiens et des chats est en pleine expansion en pratique vétérinaire en raison de l'efficacité antalgique de ce produit, de l'observance améliorée des traitements grâce aux voies transdermiques en question et de la simplification des procédures de prescription des morphiniques considérés.

En tant que molécule anesthésique et analgésique, le fentanyl possède, à lui seul, une action sédatrice, et son utilisation intraveineuse isolée a montré un effet négatif sur la sécrétion lacrymale chez le chien. Une étude récente a identifié l'utilisation post opératoire de patch de fentanyl comme facteur de risque dans l'apparition d'ulcères post opératoires chez le chien, en suggérant un mécanisme dépresseur de la production lacrymale sans toutefois l'avoir démontré.

L'objectif de cette étude est d'étudier les répercussions oculaires de solutions transdermiques de fentanyl permettant une libération prolongée de la molécule (dispositifs ayant une AMM dans cette espèce) en corrélant les résultats obtenus avec la concentration plasmatique réelle de fentanyl. Les données auront un intérêt pour la prévention d'atteinte oculaire post opératoire chez les chiens ayant reçu ce type d'analgésie.

Pour cela 8 chiennes stérilisées de race Beagle seront utilisées. Les examens réalisés incluent un examen ophtalmologique complet et des prises de sang à différentes dates prédéterminées basées sur les données bibliographiques actuelles, chaque chien étant son propre témoin. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, un lot de 8 animaux sera constitué pour la première étude. Si, comme cela est supposé, l'état ophtalmique des animaux revient à l'état initial en quelques heures, les mêmes animaux seront utilisés pour les deux protocoles expérimentaux testant l'effet de deux présentations et dosages avec une période de sevrage d'une semaine entre chaque protocole. Sinon, un second lot de 8 animaux sera utilisé pour la seconde procédure.

A l'issue de leur participation au présent projet et après vérification de l'absence de lésions par un vétérinaire, les animaux pourront soit être utilisés dans d'autres projets ne comportant que des procédures légères ou dans un projet comportant une procédure modérée, soit être proposés à l'adoption après avoir suivi un programme de sociabilisation pour ceux qui le nécessiteraient.

1112. La dépression est la pathologie mentale la plus fréquente. Elle nécessite une prise en charge très longue et sera, en 2030, au plan mondial, une des pathologies les plus importantes en termes de santé et société (WHO, 2008). En plus du stress chronique, la douleur chronique est un facteur déterminant dans son apparition puisque la co-morbidité douleur

chronique/dépression atteint 50%. Nous faisons l'hypothèse que des modifications de la neuroplasticité du cortex cingulaire antérieur (CCA), sous-tendent la dépression induite par la douleur chronique. Nous proposons une étude intégrative, utilisant des niveaux d'analyse allant des mécanismes de transduction aux circuits neuroanatomiques, pour rechercher chez l'animal les changements morphologiques et fonctionnels du CCA et de sa connectivité. Le projet nécessitera 640 souris de la lignée C57BL/6J et 400 souris génétiquement modifiées de la lignée Thy1-ChR2-YFP dans laquelle il est possible d'activer spécifiquement les neurones pyramidaux et sera conduit en respectant la règle des 3R visant à remplacer ou réduire chaque fois que possible le nombre d'animaux ainsi qu'à optimiser les procédures. Au regard des données de la littérature et de la variabilité phénotypique interindividuelle, les groupes expérimentaux, explorant les comportements anxiodépressifs liés à la douleur neuropathique, seront constitués de 20 souris. Ce projet comporte 7 procédures expérimentales, mais 4 d'entre elles font partie d'un enchaînement et utilisent les mêmes animaux ce qui limite considérablement leur nombre.

1113. Les vecteurs viraux sont des particules virales ayant la capacité d'introduire leur matériel génétique spécifiquement dans une cellule d'intérêt et de franchir ses barrières (membranes plasmique et nucléaire). Ces virus ont été modifiés, afin de les rendre inoffensifs pour l'organisme, en supprimant les gènes viraux responsables de leur réplication, de leur virulence et en incorporant à la place un gène d'intérêt. Le vecteur viral va ainsi permettre l'insertion du gène d'intérêt dans le génome de la cellule hôte (ici de souris), et aboutir à l'expression d'une protéine d'intérêt dont le niveau d'expression et l'impact sur l'organisme pourront être étudiés.

Chez l'homme, de nombreuses protéines sont impliquées dans l'apparition et l'installation de maladies neurodégénératives tels que le peptide amyloïde 42 et la protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer ou l' α synucléine pour la maladie de Parkinson. Pour prédire l'efficacité thérapeutique de nos molécules chez l'Homme, il est nécessaire de posséder un modèle expérimental le plus représentatif possible des pathologies neurodégénératives humaines.

C'est pourquoi, l'objectif de ce projet est d'induire l'expression de ces différentes protéines (pathologiques chez l'homme) chez des souris de type sauvage (« wild type ») ou transgéniques à différents âges par l'intermédiaire des vecteurs viraux. Les études sur les animaux transgéniques permettront de mieux comprendre le rôle, l'implication et l'évolution dans le temps des interactions entre différentes protéines mises en jeu dans l'apparition et l'installation des processus pathologiques. L'intérêt de cette technologie est de suivre l'évolution des processus pathologiques engendrés par l'expression de ces protéines dans une structure cérébrale, de manière beaucoup plus rapide et plus flexible que la mise en œuvre de modèles transgéniques murins classiques.

L'objectif final de ce projet est d'étudier l'effet de molécules pouvant moduler l'apparition de processus pathologiques engendrés par l'expression de certaines protéines.

Le recours à l'animal dans ce projet est donc nécessaire pour pouvoir évaluer de façon objective l'effet de la surexpression cérébrale des protéines, induites par les vecteurs viraux, sur un organisme entier comprenant différents mécanismes physiologiques que l'on ne retrouve pas in vitro dans des modèles cellulaires.

Le suivi de l'expression des protéines sera quantifié par une méthode d'imagerie non invasive nécessitant une simple anesthésie de l'animal lors des mesures. La caractérisation de l'expression des protéines sera réalisée par des tests cognitifs visant à évaluer la mémoire des animaux. En fin d'expérimentation, des analyses histologiques et biochimiques seront réalisées sur tous les animaux afin de corréliser les résultats observés in vivo avec des données ex vivo. Techniquement, une première phase de mise au point est prévue (600 animaux) afin de définir les conditions expérimentales optimales de réalisation de l'induction ainsi que le nombre d'animaux par groupe et la constitution des groupes à prévoir avant la seconde phase dédiée à la réalisation des études de screening de molécules (2600 animaux). Cette démarche vise à optimiser les conditions expérimentales et réduire ainsi le nombre d'animaux utilisés. On peut également estimer sur toute la durée du projet (5 ans), une utilisation d'environ 640 souris par an pour un degré de gravité modéré. Les injections intracérébrales des vecteurs viraux seront réalisées sous anesthésie et les animaux bénéficieront d'une analgésie post-opératoire. Une surveillance accrue sera également assurée afin d'identifier tout signe de souffrance et de soustraire si besoin les animaux des études en cas d'atteinte des points limites définis. Ils seront également maintenus dans la mesure du possible en groupe tout au long des études. Les études seront réalisées chez des animaux jeunes ainsi que chez des animaux âgés afin de suivre l'évolution des processus pathologiques engendrés par les vecteurs viraux à différents âges.

1114. La nécessité d'évaluer la sécurité des médicaments est apparue suite aux accidents thérapeutiques du début du XX^{ème} siècle voire aux tragédies comme ce fut le cas pour la thalidomide.

Dans ce cadre, l'étude de l'index thérapeutique et de l'innocuité d'une molécule est primordiale. Il s'agit de déterminer les doses à administrer afin d'obtenir la concentration sanguine permettant l'effet recherché mais également d'évaluer la dose à laquelle les premiers effets secondaires apparaissent. Ces études sont fréquemment réalisées sur des rongeurs et pourraient être également considérées comme l'équivalent préclinique des études de phase 1 en développement clinique impliquant des volontaires sains.

Dans ce projet nous adressons 3 questions interdépendantes.

La première interrogation est de savoir comment le composé se comporte vis-à-vis de l'organisme : comment il y entre, à quelle vitesse, combien de temps il reste avant d'être éliminé et où il va. C'est ce qu'on appelle l'étude des paramètres pharmacocinétiques. Pour cela le composé est administré à différentes doses, puis du sang et/ou des organes sont prélevés à différents moments après l'administration. La détermination de la dose de composé dans le sang ou dans chaque organe par analyse chimique permet le calcul des paramètres pharmacocinétiques d'intérêt.

Ce projet permet également d'évaluer les éventuels effets secondaires d'une molécule lors de son administration aux doses que l'on souhaite utiliser pour traiter la maladie (doses thérapeutiques). Pour cela, des animaux sains sont traités par le composé à tester et leur comportement est observé pour détecter des effets non souhaités comme des somnolences, des hyperactivités, des troubles de la mémorisation ou de la coordination motrice.

Finalement, ce projet permet de déterminer la dose maximale tolérée, c'est-à-dire une dose maximale dénuée d'effet indésirable majeur. Ceci est réalisé en administrant un composé à une dose supérieure à la dose thérapeutique et en surveillant certains paramètres physiologiques (la prise de poids, la température, la prise alimentaire), le changement de comportement de l'animal ou l'apparition de douleur. Ce paramètre est très important car il donne une indication de la sécurité d'utilisation du futur médicament.

Lors de nos travaux, nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soins aux animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

En règle générale, un plan d'étude comporte 4-10 animaux par groupe afin d'assurer un résultat statistique satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 2500 souris et 1500 rats est envisagée.

1115. L'objectif général de ce projet est d'étudier les mécanismes responsables du développement et du maintien des douleurs neuropathiques, afin de pouvoir identifier de nouvelles pistes thérapeutiques. Pour ce faire, nous nous intéressons à la plasticité du réseau neuronal spinal, qui est connu pour jouer un rôle crucial dans la transmission et l'intégration des informations signalant la douleur.

La douleur est une sensation désagréable mais utile permettant de détecter et d'éviter les stimuli potentiellement nocifs pour notre organisme. Cependant dans certains cas pathologiques, tels qu'une lésion nerveuse, la douleur perd sa fonction protectrice et devient invalidante. Ces douleurs dites neuropathiques s'accompagnent d'états d'hyperalgésie (augmentation de l'efficacité d'un stimulus nociceptif) et d'allodynie (situation dans laquelle un stimulus non nociceptif devient douloureux). Chez l'homme, ces douleurs dites douleurs chroniques sont malheureusement résistantes à la plupart des traitements utilisés en clinique. Aussi, une meilleure compréhension des mécanismes sous-tendant la mise en place et la chronicisation de ces douleurs devrait permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

La transmission synaptique inhibitrice spinale joue un rôle essentiel dans l'intégration et la modulation des informations nociceptives. Suite à une lésion nerveuse, des changements plastiques mènent entre autre à une diminution de l'inhibition synaptique spinale. Un des mécanismes de cette désinhibition est le changement de l'homéostasie de l'ion chlorure Cl⁻ due à une diminution de la fonction du transporteur de l'ion chlorure KCC2 dans la moelle épinière. La phosphorylation de KCC2 est une des voies de régulation de ce transporteur. L'objectif de notre projet est d'étudier l'implication de la phosphorylation de KCC2 dans la sensation douloureuse et plus particulièrement dans le développement et le maintien des douleurs neuropathiques.

Cette étude sera réalisée principalement par une approche électrophysiologique *in vitro* (patch-clamp sur tranche de moelle épinière de souris), associée à une approche comportementale (évaluation des sensibilités mécanique et thermique). L'ensemble des expériences utilisera 360 souris pour les 3 années du projet. Nous utiliserons un modèle de douleur neuropathique afin d'étudier les changements de gradient chlorure dans cette condition et les possibilités de restaurer ce gradient en condition neuropathique par des approches pharmacologiques.

1116. L'ensemble de ce projet a été élaboré en prenant en considération les exigences éthiques de réduction, raffinement et remplacement des procédures sur l'animal. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum nécessaire pour réaliser les tests statistiques. Aussi, l'analyse des données sera menée au fur et à mesure des expériences et le nombre d'animaux ajusté en conséquence. Les animaux seront maintenus en cage collective avec environnement enrichi. L'ensemble des procédures invasives seront effectuées sous anesthésie générale et des contrôles quotidiens de l'état de santé et du comportement des animaux seront effectués dès lors que l'animal entre en expérimentation. Ce projet portant sur l'étude d'un système intégré et mature, il nous a été impossible de remplacer l'utilisation d'animaux par des tests *in-vitro*. Cependant, l'ensemble des études pharmacologiques sera réalisé lors des expériences d'électrophysiologie permettant ainsi de tester plusieurs doses lors d'une même expérience, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

1117. Le SIDA est une maladie infectieuse due au virus de l'immunodéficience humaine (VIH). On considère qu'environ 34 millions de personnes sont infectées. Il n'existe, à ce jour, aucun traitement capable d'éradiquer le virus chez les personnes infectées, les traitements actuels permettant seulement de ralentir la progression de la maladie, ni aucun vaccin efficace pour prévenir l'infection. De nombreuses stratégies vaccinales ont été testées mais aucune n'a montré une efficacité supérieure à 30% lors des essais cliniques. Il est donc nécessaire de développer des approches vaccinales plus efficaces. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité d'un nouveau candidat vaccin, conçu pour induire des cellules immunitaires spécifiques capables d'éliminer les cellules infectées par le VIH.

Les évaluations d'efficacité vaccinale ne peuvent être réalisées que sur des organismes vivants entiers, il est actuellement impossible de ne pas recourir à un modèle animal pertinent. Le primate non humain a été choisi pour ce projet car sa physiologie et son système immunitaire sont proches de ceux de l'homme. Sa réponse vaccinale est donc semblable à celle obtenue chez l'homme. De plus, les primates infectés par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) constituent le seul modèle expérimental reproduisant la pathogénèse observée chez l'homme infecté par le VIH. C'est donc le seul modèle

permettant de tester à la fois la sûreté, l'immunogénicité et l'efficacité d'un candidat vaccin anti-VIH. Les animaux inclus dans ce projet sont nés et ont été élevés en captivité dans des établissements reconnus. Le nombre de 12 animaux a été réduit au minimum nécessaire pour permettre une analyse statistique robuste des données. Six des 12 animaux sont réutilisés d'un projet antérieur.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administration du vaccin/du virus et prélèvement de sang sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés). Des critères d'arrêt ont été définis afin de limiter la durée de l'infection et de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Le cas échéant le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Les animaux seront hébergés par paires avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

1118. La mise en œuvre des réglementations portant sur l'expérimentation animale inscrite dans le droit français depuis Février 2013 précise les obligations réglementaires de formations pour les chercheurs qui souhaitent utiliser des approches chirurgicales sur des rongeurs.

Dans ce contexte, une nouvelle formation sera mise en place avec une demande d'agrément spécifique auprès du ministère. Cette formation comporte un aspect théorique qui, une fois validé, pourra être poursuivie, par une formation complémentaire portant sur la chirurgie des rongeurs (rats, souris).

Cette formation qui fait l'objet de cette demande d'autorisation de projet, a pour objectif de permettre aux participants d'acquérir les gestes de base nécessaire à la réalisation d'actes chirurgicaux dans les conditions optimales en veillant que le bien être de l'animal soit respecté. Cette formation ouverte de deux à quatre fois par an accueillera au maximum 12 participants par session. Elle sera principalement proposée aux étudiants de l'école doctorale de notre université, mais pourra aussi être ponctuellement proposée à des chercheurs des organismes de recherche, voire à des chercheurs post-doctorants, afin qu'ils puissent satisfaire aux obligations légales.

Cette formation pourra également être proposée pour des formations venant compléter les livrets de compétences de chercheurs confirmés dans le cadre des missions des différents bureaux de Bien être Animal. Lors de cette formation, le nombre d'animaux (rat/souris) sera réduit au maximum (7 par binôme, soit 42 animaux par session de 12 stagiaires) tout en permettant aux participants d'acquérir les compétences escomptées pour leur permettre de réaliser ensuite leur travail de recherche selon les bonnes pratiques en expérimentation animale et en accord avec la réglementation européenne.

1119. Ce projet concerne l'administration concomitante de deux produits immunologiques sur l'espèce cible. La mise en œuvre de ce projet comporte une procédure expérimentale répétitive permettant d'évaluer l'innocuité et l'efficacité de cette utilisation combinée.

Cette procédure est conçue selon les textes en vigueur de la Pharmacopée Européenne et selon les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

- un caractère de stricte nécessité. Cette procédure ne peut pas être remplacée par des méthodes expérimentales alternatives, car elles n'existent pas pour le moment,
- une réduction du nombre d'animaux à son minimum. Au total, un nombre maximum de 36 animaux sera impliqué dans ce projet,
- un respect du bien-être des animaux. Des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long de la procédure. Enfin, pour ne pas induire un stress d'isolement, un hébergement des animaux se fera par groupe.

1120. Les douleurs chroniques sont un problème majeur de santé publique. Les cellules nerveuses (neurones) de la moelle épinière jouent un rôle prédominant dans la transmission de la stimulation douloureuse du corps jusqu'au cerveau ainsi que dans l'apparition des douleurs chroniques. De plus, des données récentes de la littérature suggèrent que les cellules non-nerveuses (cellules gliales) de la moelle épinière pourraient moduler la manière dont ces neurones transmettent le signal douloureux.

Le but de ce projet de recherche est de mieux comprendre comment l'activation des cellules gliales entraîne une modulation de l'activité des neurones qui participent au traitement du signal douloureux dans la moelle épinière et ainsi de déterminer si les cellules gliales pourraient être des cibles pharmacologiques potentielles pour le traitement de la douleur. Pour cela nous utiliserons majoritairement des approches virales de transfert de gènes dans les cellules gliales de la moelle épinière de rats et de souris : 572 rats et 176 souris seront utilisés.

Pour respecter la règle européenne des '3R' permettant la réduction, le remplacement et le raffinement des animaux pour l'utilisation des animaux de laboratoires, le nombre d'animaux sera restreint au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie générale et des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Notre projet nécessite l'emploi de différentes techniques expérimentales : études électrophysiologiques in vivo et ex vivo, études de biologie moléculaire/biochimie, études immunohistologiques et études comportementales.

Différentes mesures seront réalisées :

1. Injections stéréotaxiques de virus exprimant les gènes d'intérêts dans la moelle épinière.
2. Tests comportementaux pour mesurer la sensibilité thermique, mécanique ou la sensibilité au froid.

3. Etudes électrophysiologiques de la transmission synaptiques et de la potentiation de la transmission synaptique des neurones (LTP) de la moelle épinière in vivo.

4. D'autres études seront réalisées en post-mortem : (i) les modifications neuropathologiques et inflammatoires seront analysées en utilisant des techniques d'histologie et d'immunohistochimie et des quantifications de différentes protéines d'intérêt en Western Blot ; (ii) modification de l'activité neuronale par électrophysiologie ex vivo.

1121. Actuellement, les maladies infectieuses sont un des principaux enjeux de santé publique. La vaccination a permis de lutter contre de nombreuses maladies, cependant nos connaissances dans ce domaine restent incomplètes. De meilleures connaissances sont nécessaires pour concevoir de nouveaux vaccins (en particulier contre les pathogènes et maladies qui « résistent » au développement des vaccins comme l'infection par le VIH et le SIDA, l'infection par Plasmodium et la malaria ou l'infection par Mycobacterium tuberculosis et la tuberculose), améliorer les vaccins existants et accélérer le développement de vaccins contre des maladies émergentes.

Notre projet a pour but d'identifier les acteurs cellulaires et moléculaires intervenant lors des premières étapes de la réponse vaccinale, au site même d'administration du vaccin, donc dans le muscle après injection intramusculaire (une voie utilisée pour de nombreux vaccins).

1122. Les informations obtenues nous aideront à comprendre le rôle du site d'injection dans le déclenchement et le déroulement de la réponse vaccinale, et contribueront au développement de vaccins plus efficaces. Le projet se déroule en trois grandes étapes :

- 1) Injection du vaccin par voie intramusculaire
- 2) Biopsie musculaire du site d'injection après 24h ou 48h
- 3) Analyse des biopsies musculaires pour caractériser les événements liés à la réponse immunitaire précoce.

Ce projet sera réalisé chez le primate non humain (PNH) en raison de sa proximité phylogénétique (degré de parenté) avec l'homme et en particulier des similarités de leurs systèmes immunitaires. Aucune méthode alternative n'existe à ce jour. Le nombre d'animaux (24) inclus dans ce projet correspond au minimum nécessaire pour une analyse statistique robuste des données. Les PNH utilisés sont nés et ont été élevés dans des établissements agréés. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administration du vaccin, prélèvement de sang et biopsies sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés). Des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Le cas échéant, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider une euthanasie. Les animaux seront hébergés par paires ou en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Ils bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

1123. Chaque année, 130.000 personnes en France sont victimes d'un accident vasculaire cérébral (AVC), un quart en meurt dans un délai très court, et les personnes survivantes à l'attaque restent pour la plupart handicapées avec des séquelles parfois légères mais pouvant aussi aller jusqu'à des déficits neurologiques sévères.

L'AVC représente une des premières causes de déficience neurologique associée à l'âge. Des données récentes montrent que 98,5% des AVC ont lieu chez des personnes âgées de plus de 45 ans et parmi elles, 75% ont plus de 65 ans. Avec l'allongement de l'espérance de vie, la prévalence des AVC est en constante augmentation et devient un problème de santé publique majeur au niveau de la prise en charge des malades. Les conséquences des AVC au niveau cérébral dépendent de nombreux facteurs : la vitesse de rétablissement de la circulation sanguine, la durée de la privation en oxygène et la localisation cérébrale de l'accident.

La recherche sert à améliorer les connaissances fondamentales sur les désordres moléculaires et cellulaires induits par l'AVC et sur les cibles potentielles pour une intervention thérapeutique. Un des modèles animaux (rongeurs) le plus utilisé dans la recherche sur l'AVC est basé sur l'induction d'une vasoconstriction artérielle au niveau cérébral. Cette vasoconstriction induit une ischémie cérébrale qui évolue vers la mort des cellules neuronales. Il s'en suit ainsi des troubles moteurs ou cognitifs chez l'animal. Nous souhaitons caractériser les déficits neurologiques dans ce type de modèle au sein de notre structure puis l'utiliser pour tester l'efficacité de nouvelles interventions thérapeutiques potentielles.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 12 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. De plus, nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permette de réduire le nombre d'animaux. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle afin de ne pas multiplier les groupes témoins. De plus, une attention particulière est portée à l'hébergement des animaux afin de leur garantir des conditions de vie les meilleures possibles.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 1000 rats est envisagée.

1124. Ce projet concerne l'efficacité d'un produit immunologique destiné à protéger contre une maladie mortelle chez une espèce de carnivore domestique.

La mise en œuvre de ce projet comporte une procédure expérimentale permettant d'évaluer l'efficacité à long terme de ce produit ainsi qu'une procédure de validation du modèle permettant cette évaluation. Ces procédures sont conçues en accord avec les textes en vigueur de la Pharmacopée Européenne et avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

-un caractère de stricte nécessité : ces procédures ne peuvent pas pour le moment être remplacées par des méthodes expérimentales alternatives car elles répondent à l'obligation réglementaire d'être conduites sur l'espèce de destination ;

- le nombre d'animaux envisagé par groupe sera déterminé pour à la fois être conforme à la réglementation et obtenir des données valides. Au total, un nombre maximum de 48 animaux sera impliqué dans ce projet ;
- des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long des procédures ;
- du fait de la classe sévère des procédures, des points limites adaptés et précisément définis qui seront appliqués afin d'éviter toute souffrance des animaux,
- un hébergement des animaux par groupe de manière à ne pas induire un stress d'isolement.

1125. La substance blanche du cerveau est une structure extrêmement dynamique chez l'adulte. La formation de la myéline ou son remodelage sont probablement à l'origine des modifications de la substance blanche, mais les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents restent inexplorés. Comprendre la dynamique des cellules oligodendrogiales dans le cerveau normal et malade est la clef pour répondre à des questions sur la plasticité de la substance blanche, la myélinisation et réparation de la myéline. Dans ce projet, nous étudierons la dynamique de recrutement, de la prolifération et de la différenciation des cellules oligodendrogiales au niveau du corps calleux de la souris en conditions normales et pathologiques. Nous éluciderons les mécanismes dépendants de l'activité neuronale qui contrôlent l'oligodendrogénèse. Nos expériences seront menées en induisant une lésion démyélinisante locale au niveau du corps calleux avec une chirurgie stéréotaxique et en utilisant plusieurs types de protocoles expérimentaux. Ces protocoles ne peuvent malheureusement pas être substitués par des procédures *in vitro* car il s'agit de reproduire une démyélinisation locale dans l'environnement naturel des cellules et d'étudier leur dynamique. Un total de 1000 souris transgéniques sur cinq années sera utilisé pour des stimulations optogénétiques, des expériences d'imagerie biphotonique et d'immunohistochimie. Le calcul du nombre d'animaux a été fait afin d'obtenir un nombre suffisant de données pour chaque protocole expérimental, tout en appliquant strictement les grands principes éthiques de l'expérimentation animale (les trois R). Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

Nous espérons être pionniers dans l'étude de la dynamique des cellules oligodendrogiales chez l'animal vivant dans une région jusqu'alors inaccessible, mais très importantes car elle est impliquée dans des maladies démyélinisantes comme la sclérose en plaques et dans de nombreux troubles psychiatriques. Nous espérons que les résultats de ce projet ouvrent la voie pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques de ces maladies.

1126. La myopathie de Duchenne est une maladie génétique qui touche le muscle chez l'enfant, provoquant une faiblesse musculaire généralisée et évolutive. Les patients sont contraints à l'usage permanent du fauteuil roulant vers l'âge de 10 ans et décèdent prématurément d'insuffisance respiratoire ou cardiaque vers l'âge de 30 ans. Il n'existe pas à ce jour de solution thérapeutique pour la myopathie de Duchenne. Il existe différents modèles de cette maladie pour travailler en amont sur l'élaboration de médicaments, des modèles *in vitro* (myoblastes, myotubes) aux modèles animaux. Toutefois seul le contexte du chien atteint spontanément par cette même maladie, le chien GRMD (golden retriever muscular dystrophy), reproduit de manière fidèle les manifestations cliniques de cette maladie. Lorsqu'un médicament a fait ses preuves sur des modèles *in vitro* puis dans le modèle murin, et qu'il a des chances importantes d'arriver au chevet du malade, son efficacité chez le chien GRMD permet d'envisager un passage en clinique prometteur, du fait de la valeur translationnelle forte des données obtenues chez les chiens.

C'est le cas du Riméporide, molécule qui sera testée dans ce projet. Cette molécule est un inhibiteur d'un échangeur sodium-proton qui a montré des effets très positifs sur des myotubes en culture (modèles *in vitro*) : diminution du pH (anormalement élevé dans les muscles des malades), et régulation des influx de sodium et de calcium (dérégulés chez les malades). Chez la souris, des effets positifs sur la fonction musculaire ont été identifiés, mais ils doivent être confirmés dans un contexte pathologique plus proche du contexte humain, tel que celui du chien GRMD. Notre projet a pour objectif d'étudier l'effet du riméporide en phase aiguë, administré sur le court terme (5 jours) sur le pH, les influx de sodium et la fonctionnalité du muscle des chiens malades, afin de 1) déterminer si cette molécule atteint bien sa cible dans un modèle à fort potentiel translationnel et 2) identifier des biomarqueurs non invasifs notamment d'imagerie et de spectroscopie qui pourront permettre d'évaluer la réponse biologique aux traitements chez les patients durant les essais cliniques sur cette molécule. Dix chiens GRMD et 3 de leurs frères sains seront inclus dans ce projet. Sur les 10 chiens GRMD, 3 évolueront vers une forme clinique sévère de la maladie (qui touche 25% des chiens) et ne seront pas inclus dans le protocole thérapeutique. Le projet thérapeutique en tant que tel inclura donc 7 chiens GRMD et 3 chiens sains. Nous avons réduit le nombre d'animaux nécessaires au minimum grâce à l'utilisation d'une seule forme clinique qui permet d'obtenir un groupe plus homogène d'animaux, et grâce à une conception du projet en « cross-over », c'est-à-dire que tous les animaux recevront le placebo et le traitement. Ainsi, ces dix animaux seront subdivisés en 2 groupes, qui recevront chacun le riméporide durant 5 jours puis le placebo durant 5 jours ou inversement. Les animaux seront évalués avant, en milieu, et en fin de protocole par IRM et mesures de force (méthodes non-invasives). Les chiens GRMD seront euthanasiés à l'issue du projet, et les chiots sains seront proposés à l'adoption.

Le chien GRMD est un modèle de myopathie de Duchenne incontournable au stade préclinique, mais l'utilisation de ces animaux requiert une expertise dans leur maintien, des soins spécifiques qui leur sont nécessaires pour leur permettre de mener une vie dans les meilleures conditions possibles, tout en ayant défini des points limites extrêmement précis et suffisamment précoces pour éviter à ces animaux toute souffrance prolongée.

1127. Le but de l'étude est d'étudier certains aspects de la reproduction chez une espèce animale photopériodique, c'est-à-dire une espèce dont la reproduction (accouplement, naissances, puberté...) dépend de la photopériode (longueur relative du jour et de la nuit sur 24 heures). Ce signal temporel est représenté par la longueur du pic nocturne de sécrétion de mélatonine par la glande pinéale. Il est connu que la mélatonine, régule localement dans l'hypothalamus la production de l'hormone thyroïdienne T3.

Nous cherchons à savoir si dans les structures du cerveau, impliquées dans la reproduction, certaines molécules sont modifiées chez la progéniture selon que la mère était gestante en photopériode longue (été) ou en photopériode courte (hiver). Ou encore, comment la saison de gestation de la mère peut influencer le développement pubertaire de la progéniture et quelle est l'implication de la T3 dans cette intégration ? L'étude sera menée sur des hamsters sibériens qui est une espèce photopériodique et provenant d'un élevage. Les femelles gestantes seront placées en photopériode longue (LP) ou courte (SP). Après sevrage (P21 : 21 jours) la progéniture sera maintenue dans la photopériode précédente ou dans une photopériode intermédiaire (IP, type printemps-automne). Ce protocole permettra de faire la part entre les phénomènes induits par la programmation maternelle et ceux purement liés aux conditions photopériodiques après sevrage (objectif de l'étude). Remplacement : L'axe reproducteur comprenant différents étages (hypothalamus, hypophyse, gonades) cette étude nécessite de mener les expériences sur l'animal entier.

Raffinement: Ce projet nécessite une approche invasive (chirurgie intracrânienne). Le maximum sera fait pour réduire la douleur (anesthésiques, antalgiques, anti-inflammatoires, suivi du score de douleur) et le stress des animaux tout au long de l'expérience (habituation à l'expérimentateur, environnement). Les animaux sont maintenus en cage collective avant chirurgie (4 à 6/ cage selon les portées) puis en cages individuelles, nécessaire compte tenu de l'appareillage, et avec ou sans enrichissement (bâton-matériel de nidation) selon l'âge. Nos précédentes études ont montré que l'hormone du stress reste à des taux normaux dans nos conditions expérimentales. La durée de l'expérimentation pour chaque animal n'excède pas une semaine après chirurgie.

Réduction- Procédure 1 : la technique utilisée permet une étude longitudinale, donc de réduire le nombre d'animaux à 6 par groupe expérimental. Procédure 2 : des expériences précédentes ont établi que pour obtenir des résultats statistiquement valables, le nombre d'animaux par groupe doit être de 6 au minimum. Cependant, les 2 procédures nécessitant de la chirurgie cérébrale, nous devons prendre en considération la perte possible de 15 à 20% d'animaux, le succès de la chirurgie n'étant que de 80%, nous prévoyons de suivre 8 animaux/groupe expérimental. Procédure1 : 4 groupes expérimentaux * 8 animaux = 32 animaux. Procédure 2 : 14 groupes expérimentaux * 8 animaux= 112 animaux.

Total des 2 procédures : 144 animaux.

Dans les 2 procédures, la significativité des différences obtenues sera testée par un test ANOVA.

1128. Chez les mammifères, les rythmes circadiens sont contrôlés par le noyau suprachiasmatique (SCN). Au niveau moléculaire, l'horloge dans le SCN est composée de boucles d'activation et d'inhibition de plusieurs gènes horloges tels que Per1-2, Cry1-2 et rev-erb. En l'absence du SCN, la plupart des rythmes circadiens sont abolis. Cependant, d'autres horloges circadiennes, contrôlées par une restriction alimentaire ou par l'accès à la méthamphétamine (MAP) dans l'eau de boisson, peuvent affecter les rythmes au niveau hormonal et comportemental. Ces rythmes sont générés à partir d'un oscillateur circadien sensible à la restriction alimentaire ou à la MAP, et qui serait situé en dehors du SCN. Le substrat anatomique de cet oscillateur est encore inconnu. D'autres drogues d'abus, comme la cocaïne, interagissent avec les rythmes circadiens. Ainsi, une dose de cocaïne le matin ou en fin de journée n'aura pas les mêmes effets sur l'organisme. L'habénula latérale (LHb) est un noyau de l'épithalamus projetant directement sur des neurones dopaminergiques et GABAergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA), et module donc la première structure du circuit de la récompense. Récemment, il a été montré une oscillation circadienne de l'activité électrique de la LHb. Cependant, son rôle dans le contrôle des rythmes circadiens est encore inconnu. Donc, le but de ce projet est de mieux comprendre le rôle de la LHb dans les rythmes circadiens et l'influence des drogues d'abus sur cette structure. Des souris transgéniques nous permettant de suivre l'expression d'un gène horloge (Per2) grâce à la bioluminescence, seront utilisées afin de pouvoir étudier les rythmes circadiens. En accord avec la règle des 3R, la bioluminescence permet de visualiser plusieurs cycles de Per2 sans avoir à sacrifier des animaux à plusieurs points horaires. Au final, pour l'ensemble de tout le projet, nous utiliserons 252 animaux.

Le premier objectif est de caractériser l'expression rythmique de l'habénula en présence ou non de cocaïne, de voir la sensibilisation locomotrice induite par la cocaïne en cage d'élevage. Le second objectif est de voir l'influence du SCN sur cette sensibilisation locomotrice et l'expression rythmique de l'habénula induite ou non par la cocaïne, et pour ce faire, nous léserons les SCN. Enfin, le dernier objectif est de déterminer si l'expression rythmique de l'habénula en présence ou non de cocaïne est d'origine circadienne en plongeant les animaux en obscurité totale.

1129. Nous étudions le développement du cortex cérébral des mammifères. Pour cela, nous mettons en œuvre une nouvelle technique de visualisation des cellules, l'approche de marquage multicolore Brainbow. Cette technique permet d'exprimer des protéines fluorescentes de couleurs différentes dans les cellules souches neurales et leur descendance (neurones, cellules gliales). Les cellules sont ainsi identifiées par des couleurs distinctes qui permettent de les suivre lors de leur migration et d'identifier les cellules « sœurs » issues de la division d'une même cellule progénitrice. Nous utiliserons ce nouvel outil d'analyse du lignage cellulaire pour suivre simultanément plusieurs cellules souches neurales (CSN) in vivo et déterminer leur contribution individuelle à la construction d'un cortex cérébral mammalien fonctionnel. Nous utilisons la souris, modèle mammifère usuel le plus "bas" dans la phylogénie doté d'un cortex. Cette approche permettra d'étudier pour la première fois in vivo la biologie, les interactions et le lignage de plusieurs progéniteurs neurales voisins dans le cortex cérébral de souris en

caractérisant 1) leur hétérogénéité cellulaire et comportementale, 2) leur contribution aux lignages neuraux et gliaux ; 3) la position finale de leur descendance dans le parenchyme cortical et son impact sur l'établissement de la connectivité cérébrale. Ce projet fera appel à l'analyse d'animaux dont le marquage multicolore sera déclenché soit par administration du ligand synthétique Tamoxifène (n'impliquant pas de chirurgie), soit par électroporation in utero (chirurgie de type laparotomie, de classe modérée, sans effets nocifs pour la survie des embryons ou des souris gestantes). Nous utiliserons en fonction de la question biologique posée, soit des souris transgénique Brainbow et/ou exprimant la recombinase site-spécifique Cre, soit des souris sauvages. Pour l'ensemble du projet, un nombre global de 9521 animaux sera nécessaire : 2793 femelles gestantes qui généreront 6278 souriceaux (ainsi que 9112 embryons). Nous avons soigneusement choisi les paradigmes expérimentaux (souris transgéniques ou électroporation in utero de souris sauvages) pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Nous avons pris soin d'appliquer la règle des 3Rs pour l'estimation de ce nombre global. Il est important de noter i) qu'il nous serait impossible d'obtenir des données statistiquement significatives avec moins d'animaux ; ii) que les méthodologies utilisées dans ce projet impliquent la mise en œuvre de toutes les stratégies expérimentales et pharmacologiques disponibles actuellement pour réduire le nombre d'animaux utilisés mais aussi minimiser les possibles effets délétères pour ceux-ci, avec un respect particulier de la notion de points limite (grille de suivi, et critères d'interruption en cas de souffrance des animaux).

1130. Les brûlures sont fréquentes chez l'enfant et constituent la deuxième cause de mortalité accidentelle et la première cause de morbidité fonctionnelle et esthétique. La prise en charge des brûlures nécessite des moyens importants et particulièrement coûteux. Ces brûlures sont traitées habituellement par une greffe de peau. Cependant, dans les cas de brûlures de grande surface, il ne reste plus assez de peau saine pour couvrir la perte cutanée; dans ce cas le pronostic vital chez l'enfant est engagé. L'alternative est de pouvoir couvrir une grande surface grâce à une greffe de cellules isolées à partir d'une faible surface de peau saine épargnée. Dans ce cadre, nous avons déjà démontré la haute qualité des cellules préputiales dans la reconstruction d'un épiderme in vitro et dans la cicatrisation des brûlures deuxième degré profondes chez les enfants. Cependant, dans les brûlures totales troisième degré profondes, il y a une perte du support dermique et la greffe cellulaire directe n'est plus possible. Nous souhaitons tester un substitut dermique de remplacement dans la cicatrisation d'une perte de substance chez les souris, substitut qui servirait comme un support dans une future greffe kératinocytaire chez les enfants porteurs d'une brûlure profonde.

Deux souches de souris (BalbC et C57BL/6) seront utilisées afin de mettre en évidence l'influence du système immunitaire dans ce processus de reconstruction dermique.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 224 animaux au total. La règle des 3R a été prise en compte dans cette étude par l'approche statistique qui montre que le nombre d'animaux par lot (lot sans substitut comparé au lot avec substitut) pour chaque souche peut être limité à 28, nombre nécessaire pour valider statistiquement l'effet bénéfique ou non d'un substitut dermique.(réduction). Les douleurs post-opératoires seront prises en compte systématiquement (raffinement). Dans ce contexte de dynamique cellulaire (migration, colonisation, multiples origines cellulaires), il n'est pas possible d'envisager à ce jour des solutions de remplacement.

A terme ces résultats pourraient permettre en clinique humaine d'apporter des solutions n'engendrant pas de rejet à court terme et dépourvu de matériel d'origine.

1131. Le projet a pour objectif la réalisation de tests de fonctionnement, d'efficacité et de la sécurité de différents équipements médicaux qui sont en cours de développement. Les dispositifs médicaux utilisés en chirurgie sont constamment innovés et équipés de nouvelles fonctions. Par exemple l'éclairage opératoire ou une caméra peut être équipé de filtres pour optimiser la vision ou améliorer le confort du chirurgien. Ces améliorations ont pour but principal l'optimisation des conditions de l'acte chirurgical, par exemple par réduction de la durée de l'intervention. Des éventuels bénéfices cliniques ou thérapeutiques de ces nouvelles fonctions doivent être testés et validés sur animaux avant leur utilisation pour la chirurgie humaine. Les tests nécessitent des interventions légères sur animaux, principalement sur les modèles porcins et ovins qui sont proche de l'humain en taille et anatomie. La plupart des tests prévus seront réalisés pendant des procédures ouvertes qui permettent d'aborder une grande variété de situations: chirurgie superficielle et profonde, taille de plaie opératoire de faible dimension à large, couleurs variables suivant les tissus (peau, graisse, muscle, viscères). En vue de réduire le nombre d'animaux utilisés, les animaux seront réutilisés pour plusieurs essais du même genre si leur état le permet.

Les animaux seront hébergés sur paille, dans des cases spacieuses. Pour les brebis, elles seront placées avec un ou deux congénères en post opératoire pour éviter tout stress d'isolement.

L'anesthésie et l'analgésie lors des procédures seront assurées par des traitements adaptés et recommandés (antibiothérapie pré et post opératoire, anesthésie générale, morphiniques en per opératoire associés à des anesthésiques locaux, anti-inflammatoires non stéroïdiens en post opératoire).

Nous estimons que ce projet nécessite au maximum 5 animaux de chaque espèce au total (5 porcs et 5 brebis). Cela nous permettrait de les utiliser pour tester plusieurs dispositifs chirurgicaux.

1132. L'élevage porcin est fortement affecté par le problème de mortalité des nouveau-nés (20%). Ce phénomène aux conséquences économiques et éthiques importantes, provient de la sélection réalisée au cours des 20-30 dernières années pour améliorer le rendement de cette filière, en combinant des caractères de qualité de viande et de taille de portée.

L'augmentation de cette mortalité néonatale s'explique en partie par un retard de maturité des porcelets à la naissance (à terme : gestation 114 jours). Le développement fœtal se finalise vers 90 jours de gestation avec la maturation de la plupart des organes.

Ce projet vise à explorer le contrôle génétique du processus de maturation d'organes clés. La maturité se définit comme un état de plein développement permettant une bonne adaptation à la vie extra-utérine des nouveau-nés.

Pour cela, nous proposons d'étudier les différences de développement en fin de vie intra-utérine entre fœtus de différents types génétiques produits par des truies de races qui présentent un niveau de maturité à la naissance très différent : la race Meishan (MS) avec des porcelets très vifs à la naissance est très peu affectée par la mortalité périnatale et la race Large White (LW) avec des porcelets de moindre vitalité à la naissance présente des pertes élevées en porcelets.

Le dispositif de croisement choisi (insémination des femelles avec de la semence mélangée des 2 races) permettra d'étudier les influences environnementales et génétiques sur la maturation des fœtus. Ce projet implique d'avoir recours à 2 temps de gestation (90j ; 110j) pour analyser le processus de maturation tissulaire in vivo.

Nous avons prévu d'utiliser 168 fœtus au total pour cette étude soit 3 lots de 3-7 porcelets x 4 génotypes (LW, MS et croisés réciproques LWxMS et MSxLW) x 2 temps de gestation. Pour chaque lot, le nombre de truies gestantes sera donc réduit à 4 (une femelle Large White et une femelle Meishan par temps de gestation). Il s'agit, de par notre expérience, du nombre minimal de fœtus pour obtenir des données permettant de détecter les effets mixtes dans les études statistiques de génomique.

Les truies seront anesthésiées puis euthanasiées avec des produits qui franchissent la barrière placentaire ; les fœtus seront donc également euthanasiés. Dans tous les cas, la souffrance fœtale est réduite puisque les porcelets comme les mères seront anesthésiés avant d'être euthanasiés.

L'expérimentation prévoit le phénotypage des fœtus, des mesures physiologiques et des prélèvements de tissus (placenta, endomètre, muscle, foie, surrénales). Les échantillons tissulaires serviront de support à 3 études scientifiques (expression, régulation des gènes et des protéines) afin de définir le rôle précis de gènes ciblés dans la maturation du fœtus porcin.

Les résultats obtenus permettront de mieux comprendre les processus de maturité du fœtus et d'évaluer les possibilités de sélection génétique pour les améliorer et ainsi accroître la probabilité de survie des porcelets. La compréhension des processus de mise en place de la maturité pourrait aussi avoir un impact plus général pour d'autres mammifères d'intérêt agronomique (animaux d'élevage), ou de santé publique (Homme).

1133. Ce projet éducatif correspond à la partie pratique d'une formation réglementaire spécialisée en chirurgie pour les espèces rongeurs. Elle consiste en la mise en place de travaux pratiques (TP) à destination des personnels concevant des procédures expérimentales et des projets utilisant des animaux à des fins scientifiques. Les étudiants auront des cours théoriques, des travaux dirigés sur matière inerte et par utilisation de matériel pédagogique vidéo, et quelques travaux pratiques décrits ici, pour des techniques chirurgicales simples et très courantes (dans ce projet le cathétérisme de l'aorte ou de la veine jugulaire).

Ces dispositions contribuent de façon importante à la réduction du nombre d'animaux. D'autre part, les animaux utilisés seront choisis en priorité parmi des animaux issus d'élevages internes aux établissements, sans phénotype dommageable, mais ne présentant pas un génotype utilisable par les chercheurs. Si toutefois les élevages internes ne permettait pas un approvisionnement de ce type, le nombre minimal d'animaux requis serait obtenu auprès d'un établissement agréé.

Les TP décrits ici correspondent à l'acquisition de la compétence de pose d'un cathéter chez le rat. Pour la durée totale du projet, et pour former 200 étudiants, 240 rats seront nécessaires.

1134. Ce projet vise à mettre en place un référentiel chez un animal omnivore alliant une alimentation paramétrée et les signaux d'usure dentaires, biogéochimiques et morphologiques sur les dents et/ou os. Ce référentiel permettra de meilleure reconstitution des régimes alimentaires chez les primates fossiles, argument incontournable pour comprendre l'évolution. Le porc a été choisi comme modèle car c'est un animal omnivore au même titre que les primates.

Six expérimentations seront menées sur 3 ans.

Sur les quatre premières expérimentations (de 3 à 6 mois chacune) seront testées des consommations croissantes (5, 10, 15 et 20 % du régime alimentaire) de protéines animales (farine animale), de végétaux riches en silice abrasive (tige et feuille de Orge), d'aliments durs et cassants (grains secs de maïs), et de plantes de cycle métabolique en C4 (tige et feuille de maïs). Les plantes en C4 sont principalement des herbacées (monocotylédones) associées au développement des savanes intertropicales et ont donc joué un rôle majeur dans l'alimentation des hominidés anciens.

Les expérimentations 5 et 6 diffèrent des précédentes car l'objectif ici est de déterminer la capacité des approches méthodologiques à détecter un changement alimentaire N jours avant la mort (0, 5, 10, 20 et 30 jours); l'étude prenant en compte l'insertion de 20% de végétaux riches en silice (Orge) et l'insertion de 20% d'éléments durs (grains de maïs).

Les aliments testés partagent des propriétés physiques et chimiques avec des aliments de recours utilisés ou supposés tel par les mammifères sauvages. Six expérimentations seront conduites testant chacune une hypothèse avec 4 lots de 10 porcs chacun et un groupe témoin de 10 individus, 300 porcs intégreront ce protocole.

La règle des 3R a été prise en compte, des lots de 10 individus seront constitués; en deçà, l'étude ne permettrait de mettre en évidence des différences statistiques. Nous avons fait choix de ne pas faire de prélèvements du vivant de l'animal. Les prélèvements seront tous réalisés après la mort de l'animal. La seule contrainte concerne le régime alimentaire. Si une absence de prise de poids était mesurée, les individus en question seraient alors retirés de l'expérimentation et retrouveraient un régime conforme à leurs besoins physiologiques. Enfin, seules des concentrations inférieures ou égales à 20% d'aliments à

tester seront prises en compte. En effet, le projet ne vise pas à détecter des aliments consommés en grande quantité mais les aliments secondaires, non préférés et consommés de manière saisonnière. Ils sont dits de recours. Pour des concentrations supérieures, les données de la littérature scientifique sur les animaux sauvages consommant ces aliments en grande quantité seront prises en compte. Ainsi, le phacochère, un proche parent du porc consomme des plantes en C4 en très grande quantité.

Les porcs seront acheminés à l'abattoir et intégreront la chaîne alimentaire classique, exception faite des porcs consommant des protéines animales, qui seront euthanasiés et retirés de la chaîne alimentaire.

1135. Contexte. La technologie des ultrasons focalisés, connue par l'acronyme HIFU permet d'effectuer l'ablation de tissus pathologiques d'une manière totalement non invasive. Une sonde émet des ultrasons qui traversent la peau et se concentrent sur le tissu à traiter, provoquant sa coagulation puis sa nécrose. La sonde comporte aussi une barrette d'échographie qui permet de guider en permanence le geste. Les HIFU sont déjà utilisés en routine pour traiter notamment les cancers de la prostate et les fibromes utérins. De nombreuses autres applications cliniques sont en développement. Nous envisageons de traiter de cette façon les adénofibromes du sein et les nodules thyroïdiens.

Cette technologie permet de remplacer certaines chirurgies par un geste totalement non invasif. Les avantages comparatifs du dispositif concernent aussi bien le patient, les praticiens et les centres de traitement que la collectivité. Pour le patient, les avantages se traduisent par des durées d'intervention chirurgicale et d'hospitalisation réduites, par l'amélioration de la qualité de vie post opératoire (absence de cicatrice, durée d'hospitalisation faible, douleurs moindres...). Pour les praticiens et les centres de traitement, les avantages du dispositif se caractérisent par l'augmentation du nombre de patients traités, la possibilité d'adresser différentes pathologies via un dispositif unique et la sécurité, l'efficacité et la facilité d'utilisation. Pour la collectivité, les avantages comparatifs sont d'ordre économique et se traduisent notamment par la réduction des coûts induits par les traitements médicamenteux longs ou les actes chirurgicaux (la durée d'hospitalisation, notamment).

Objectif général. Lors d'un traitement de nodule thyroïdien certaines structures sensibles sont localisées à proximité du nodule : la trachée, la carotide et l'œsophage. Des distances de sécurité vis à vis de ces structures ont été définies pour assurer leur intégrité lors du traitement. L'équipe de recherche souhaite valider cette politique de sécurité, en vérifiant l'absence de dommage aux structures à risque, en procédant à des analyses macroscopiques et histologiques.

Modèle animal et méthode : Des traitements HIFU seront délivrés sur la thyroïde de brebis. Ce modèle est pertinent pour atteindre l'objectif de ce projet. Sa localisation la rend accessible avec le dispositif de traitement HIFU. Il est nécessaire de traverser des tissus superficiels, ce qui correspond à la situation observée chez l'humain. Ses lobes sont situés entre la trachée et la carotide comme chez l'humain, ce qui permet d'étudier pertinemment la validité de la politique de sécurité définie lors d'un traitement de nodule thyroïdien. Les brebis seront anesthésiées et on appliquera l'énergie HIFU sur la thyroïde par voie externe. L'euthanasie des animaux interviendra dans l'heure suivant les lésions induites. Elles seront maintenues sous anesthésie entre le traitement et l'euthanasie. La position de traitement sera matérialisée sur la peau des sujets par tatouage. Les sujets seront congelés post mortem pour préserver leur position lors du traitement et faciliter le prélèvement de sections transverses du cou, incluant la thyroïde. Une analyse macroscopique et histologique des sections de cou sera réalisée, afin de vérifier l'intégrité des structures sensibles (trachée, carotide, œsophage). Quarante cinq brebis seront nécessaires à la réalisation de l'étude.

1136. La première reproduction chez la chevrette donne des résultats de fertilité très variables et parfois insatisfaisants pour l'éleveur. La finalité de ce travail est l'amélioration des résultats de fertilité en chevrettes et surtout la meilleure maîtrise de la variabilité de ces résultats. La piste explorée concerne la variabilité de maturité sexuelle des chevrettes : d'une part, elles n'ont pas toutes strictement le même âge à la mise à la reproduction et d'autre part, toutes les chevrettes ne sont pas pubères au même âge. En effet, les chèvres présentent une précocité sexuelle, c'est-à-dire une aptitude à se reproduire plus ou moins tôt, très variable entre animaux. L'objectif est de fournir aux éleveurs un outil d'aide au choix des chevrettes qu'ils conserveront dans le troupeau pour remplacer les animaux plus âgés, basé sur la prédiction de la précocité sexuelle.

Il a été montré chez l'agnelle qu'une hormone présente dans le sang, l'AMH (hormone anti-müllérienne), dosée à 3 mois d'âge pouvait être un bon indicateur de la précocité sexuelle et de la réussite à la reproduction à 7 mois. Le dosage de cette hormone pourrait permettre, à terme, de sélectionner précocement les animaux susceptibles de bien reproduire à 7 mois et de ne pas conserver les autres plus tardifs.

L'objectif premier du projet est de décrire le profil de concentration sanguine de cette hormone (AMH) chez la chevrette de la naissance à la première mise à la reproduction, c'est-à-dire son niveau de base et ses variations au cours du temps, afin de comprendre quel est son rôle dans la mise en place de la puberté. Dans ce projet, nous suivons également les variations de concentration en progestérone. Ces résultats seront ensuite corrélés au moment d'apparition de la puberté et à la réussite à la première mise à la reproduction.

Un lot de 50 chevrettes alpines (à naître en février 2015, 62 mères gestantes) sera suivi durant 15 mois en tout afin d'observer le profil de sécrétion de l'AMH de la naissance jusqu'à la reproduction puis de suivre les performances de reproduction jusqu'aux premières mises bas. Le nombre total de chevrettes incluses dans le projet sera dépendant du bon déroulement des mises-bas de février 2015 et du sexe des chevreaux nés. Ce nombre de 50 chevrettes est suffisant pour permettre l'analyse descriptive du profil d'AMH de 0 à 7 mois chez la chevrette. Par ailleurs, ce nombre est également suffisant pour espérer appréhender la variabilité de fertilité à la première reproduction et sa corrélation avec les concentrations en AMH.

Pour ce projet, 25 prises de sang seront réalisées au total par chevrette. Ces prises de sang seront réparties de la naissance des chevrettes jusqu'à leur reproduction à 7 mois. Elles seront réalisées à un rythme d'une prise de sang par semaine de la naissance à 1 mois d'âge, puis une prise de sang toutes les 2 semaines de 1 mois à 4 mois d'âge, puis de nouveau une prise de

sang par semaine de 4 mois à 7 mois d'âge (âge de la mise à la reproduction). Les prises de sang réalisées de 0 à 4 mois serviront à doser l'AMH. Les prises de sang réalisées à partir de 4 mois serviront à la fois au dosage de l'AMH et au dosage de la progestérone. La progestérone est une hormone qui nous permettra de voir si les chevrettes sont pubères, c'est-à-dire que leur cycle sexuel a démarré. Les données de reproduction seront enregistrées (mode de reproduction, date d'entrée et de sortie du bouc), une échographie de constat de gestation sera faite autour de 60 jours après la sortie du bouc. Les chevrettes seront suivies jusqu'à la mise bas où la fertilité, la prolificité et le sexe des chevreaux seront relevés.

Les exigences de remplacement, réduction et raffinement ont été prises en compte comme suit :

REPLACEMENT : il n'existe pas, à l'heure actuelle de méthode permettant d'éviter ou de remplacer l'utilisation de chevrettes pour décrire comment l'hormone AMH est sécrétée pendant la période allant de la naissance à la reproduction (7 mois) chez ces animaux et caractériser le moment de la puberté.

REDUCTION : Un calcul du nombre de sujets nécessaires a été réalisé afin d'estimer au plus juste le nombre d'animaux à inclure dans le projet. Le nombre et la fréquence des prises de sang pour le suivi hormonal a été réduit au minimum nécessaire et suffisant à l'établissement de profils interprétables. Les prises de sang pour dosage de l'AMH et de la progestérone ont été regroupées afin de limiter le nombre de prélèvements par animal (2 dosages réalisés à partir d'une seule introduction d'aiguille pour la prise de sang). Il est recommandé de ne pas prélever plus de 10% du volume sanguin total en 1 fois. Le volume maximum de sang prélevé en 1 fois est de 5mL, ce qui est 4 fois inférieur à ce seuil de 10% du volume total sanguin estimé pour une chevrete de 4kg.

RAFFINEMENT : Afin de s'assurer d'une bonne contention et de limiter la durée de prélèvements et le stress, la contention et les prélèvements seront réalisés systématiquement par 2 personnes. Des aiguilles de petit format, adapté à de jeunes animaux seront utilisées afin de limiter la douleur. Une attention particulière sera portée aux veines jugulaires des animaux notamment lors des prélèvements sanguins répétés pour repérer tout signe éventuel de phlébite. Le cas échéant, un baume antiseptique et cicatrisant sera appliqué en massage sur les veines. Par ailleurs, les animaux sont surveillés de façon journalière pendant toute la durée des protocoles (surveillance habituelle pratiquée dans le troupeau expérimental). En cas de symptôme suspect, une intervention vétérinaire a lieu et l'animal est sorti du protocole si nécessaire.

1137. L'utilisation d'hormones de synthèse, pour la conduite des élevages a des impacts négatifs connus sur l'environnement. Le cahier des charges pour la production biologique interdit d'y avoir recours. L'élevage porcin conventionnel est conduit en bandes successives, généralement espacées de 3 semaines, ainsi intra bandes, toutes les femelles sont inséminées, mettent bas et sont sevrées le même jour. Pour y parvenir, les éleveurs réalisent une synchronisation de leurs reproductrices. Ils distribuent dans l'alimentation pendant 18 jours un analogue de progestérone. 5 jours après l'arrêt de la distribution, les femelles viennent spontanément en œstrus et sont donc inséminées « en même temps ».

Cette pratique présentant un intérêt certain pour organiser le travail mais aussi pour constituer des lots homogènes de porcelets (même âge, même poids) n'est donc pas possible en production biologique, sans qu'il existe de réelles alternatives.

L'effet mâle, qui correspond à la présentation d'un mâle à des femelles, induit chez les petits ruminants, une ovulation. Il est probable qu'au-delà de la vue du mâle, lors de la présentation, les femelles sont soumises aux odeurs (phéromones) de celui-ci. Ces phéromones ont un impact connu pour induire la puberté.

Chez le porc, il est nécessaire d'associer l'effet mâle à une odeur autre, non habituelle. Les phéromones des verrats sont très présentes dans les élevages et les alentours de ceux-ci, il est probable que leur diffusion « diluée » tout au long de la croissance des animaux explique l'inefficacité de l'effet mâle chez le porc.

Notre projet fait suite à des travaux similaires menés en ovin, l'objet est de créer une imprégnation bien avant la puberté vers 100 jours d'âge. L'imprégnation consiste à associer présentation du verrot plusieurs jours successifs et une odeur caractéristique (l'huile essentielle de lavande) Pendant 15 minutes un verrot « parfumée », sous la surveillance de 2 animaliers, est conduit dans la case des jeunes femelles, les comportements d'intérêt ou d'indifférence sont enregistrés pour chacune des femelles.

Ensuite, à un âge pré pubère, vers 170 jours, cette huile est pulvérisée sur les femelles, l'induction de puberté est contrôlée par dosage de progestérone.

Pour chaque femelle, afin de vérifier la synchronisation, par dosage de la progestérone circulante, 7 prises de sang, espacées de 5 jours seront réalisées de 160 à 190 jours d'âge. Ces prises de sang sont réalisées à la veine jugulaire après contention de l'animal.

La règle des 3R a été prise en compte :

- Remplacement : l'utilisation de l'animal est nécessaire pour documenter les réponses hormonales et comportementales.

- Réduction : Un calcul du nombre de sujets nécessaires a été réalisé afin d'estimer au plus juste le nombre d'animaux à inclure dans le projet. Le nombre et la fréquence des prises de sang pour le suivi hormonal a été réduit au minimum nécessaire pour des détections de puberté.

- Raffinement : Les conditions d'hébergement (pendant les 120 jours de l'expérimentation) sont raffinées par la mise à disposition d'une litière constituée d'une couche épaisse de paille, permettant une activité de fouille et de comportement exploratoire tel que préconisé par le rapport EFSA.

Deux prises de sang de détection de puberté seront réalisées avant l'expérimentation, à 160 et 165 jours d'âge, les femelles détectées pubères sortiront de l'expérimentation, afin de ne pas leur imposer des prises de sang inutiles.

Lors d'une étude préliminaire, 5 jours d'imprégnation successifs avaient été testés, nous souhaitons tester une version « allégée », 2 jours seulement, l'objectif étant de proposer une pratique la plus simple possible pour les éleveurs. Trois lots de 12

cochettes seront ainsi constitués, pour tester des imprégnations de 5 jours, de 2 jours et un lot témoin qui ne sera pas imprégné.

1138. Ce projet éducatif correspond à une des parties pratiques d'une formation réglementaire spécifique et obligatoire pour les espèces rongeurs. Elle consiste en la mise en place de travaux dirigés (TD) à destination des personnels concevant des procédures expérimentales et des projets utilisant des animaux à des fins scientifiques. Pour ces travaux dirigés, il s'agit de démonstrations, avec peu de manipulation directe des animaux par les étudiants. Cette disposition contribue de façon importante à la réduction du nombre d'animaux (un seul animal peut servir pour tout un groupe de TD de 10 personnes pour une démonstration). Ceci constitue aussi un facteur de raffinement puisque les animaux seront manipulés par des formateurs professionnels compétents et non par les étudiants eux-mêmes. D'autre part, les animaux utilisés seront choisis en priorité parmi des animaux issus d'élevages internes aux établissements, sans phénotype dommageable, mais ne présentant pas un génotype utilisable par les chercheurs. Si toutefois les élevages internes ne permettaient pas un approvisionnement de ce type, le nombre minimal d'animaux requis serait obtenu auprès d'un établissement agréé.

Les TD dans ce site seront mis en place pour des acquisitions de compétences dans les domaines suivants: Procédures expérimentales faiblement invasives, éléments pratiques: Etudes comportementales chez le rongeur.

Pour cette partie, il a été déterminé qu'un nombre de 180 souris serait nécessaire et suffisant pour former 200 personnes pendant la durée du projet.

1139. L'État de Stress Post-Traumatique (ESPT ou PTSD, pour Post-Traumatic Stress Disorder, APA 1994) est une pathologie psychiatrique à forte prévalence dans la population générale (8 – 12%) qui, en l'absence de prise en charge adaptée, peut se compliquer en formes handicapantes et comorbides (dépression, addictions, anxiété, etc.) Le PTSD se caractérise par une constellation de symptômes qui surviennent après l'expérience d'un événement traumatique pouvant être léthal, causer une blessure grave ou menacer l'intégrité physique. Ce traumatisme va provoquer une réaction de peur intense, un sentiment d'impuissance ou d'horreur. La symptomatologie du PTSD se définit alors par un syndrome de reviviscence traumatique, un évitement et émoussement affectif et une activation neurovégétative. L'implication de l'hippocampe dans la vulnérabilité à cette pathologie a été bien documentée. Or, au sein de l'hippocampe, on trouve des néoneurones formés à l'âge adulte. On peut donc penser que ces néoneurones pourraient être impliqués dans la vulnérabilité à développer des symptômes de PTSD.

L'utilisation d'un modèle animal est alors nécessaire pour une investigation approfondie. Plusieurs modèles murins valides de PTSD existent, notamment ceux basés sur l'exposition à un choc électrique. Ce protocole de conditionnement de peur classique provoque des modifications comportementales durables (évitement, freezing), associées à la symptomatologie et aux altérations neurobiologiques chez l'humain. Par ailleurs, chez l'animal il est possible d'induire expérimentalement de la neurogenèse.

Ce modèle s'intéressant au comportement animal, il ne peut s'entreprendre que sur l'animal vivant et aucune méthode de remplacement (par exemple, une étude in vitro) n'est envisageable. L'enrichissement du milieu des cages d'hébergement est systématique (cabanes, tubes et smarthomes®).

Le but de cette expérience est d'évaluer les effets d'une augmentation de la neurogenèse adulte sur la vulnérabilité au stress traumatique. Il s'agira d'évaluer la contribution de neurones de différents degrés de maturation (1 semaine, 2 semaines, 4 semaines, 6 semaines, 8 semaines). Nous testerons dans un premier temps les degrés de maturation à 4 et 6 semaines. Pour ces deux points, on testera 8 lots expérimentaux de 18 souris chacun, qui se distingueront par 3 facteurs : le fait d'avoir ou non subi le stress traumatique, le fait d'exprimer ou non la mutation qui induit la neurogenèse, le fait d'avoir ou non subi l'administration de Tamoxifène (qui active la construction génétique). Ainsi, pour un point temporel donné, il y aura $8 * 18 = 144$ souris. Etant donné qu'il faudra entreprendre 2 expériences pour tester les différents âges de neurones, cela représente donc un total de $144 * 2 = 288$ souris.

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

Raffinement : le stress traumatique appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen, en raison de sa brièveté, comparé à ce qui est pratiqué dans d'autres laboratoires. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chronique chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire in vitro n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=15 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

1140. La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après l'étude multicentrique STAR*D, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines

de traitement. En outre, les patients rétablis à la suite d'un premier épisode dépressif présentent un risque de récurrence dans les 6 mois évalué à 50% en cas d'arrêt du traitement et il a été montré qu'en l'absence de traitement 15% des patients succombent à la suite d'un suicide et qu'entre 60% et 80% des suicides (entre 10000 et 15000 par an en France) sont le fait d'individus fortement dépressifs. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements et la compréhension des mécanismes physiopathologiques et étiopathologiques sous-jacents. Certains de ces mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant l'utilisation de techniques d'immunohistochimie par exemple.

Une restriction pour les recherches précliniques qui veulent étudier le mécanisme d'action des antidépresseurs (ADs) chez l'animal est qu'elles sont surtout réalisées chez des animaux normaux, qui ne sont pas dans un état « dépressif-like » (similaire à un état dépressif ou « depressed-like state »). Or les traitements aux antidépresseurs induisent très peu d'effets chez l'homme sain. Ces études ont été une première étape pour définir le spectre des actions possibles des ADs mais demeurent limitées pour déterminer les effets qui sont réellement nécessaires à l'action thérapeutique. C'est la raison pour laquelle nos travaux se basent sur l'utilisation du modèle du stress chronique léger imprédictible (SCI). Il s'agit d'un protocole initialement développé par Willner et al. (1987) que nous utilisons au laboratoire. De façon intéressante, il s'agit du seul modèle pour lequel il existe une signature moléculaire commune entre la dépression humaine et celle existant après stress chronique imprédictible chez la souris. Ce modèle de stress chronique imprédictible a également été validé pharmacologiquement, et semble le mieux adapté et le plus pertinent pour étudier la pathophysiologie de la dépression et le mécanisme d'action des ADs.

Le but de cette expérience est d'évaluer les effets antidépresseurs d'une molécule agissant via un mécanisme dopaminergique, le Brexpiprazole, comparé à ceux d'un antidépresseur agissant via un mécanisme sérotoninergique, la fluoxétine. Pour cette expérience, 75 souris réparties en 5 lots sont requises.

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

Raffinement : les stress appliqués aux animaux peuvent être qualifiés de léger à moyen, sans stress physique de type nociceptif. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu.

Remplacement : aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chronique chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire *in vitro* n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=15 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

1141. La transmission hétérosexuelle du VIH par voie vaginale est l'un des principaux modes de contamination par ce virus. L'entrée du virus a alors lieu au niveau des muqueuses du tractus reproducteur féminin (TRF). A ce jour, il n'existe pas de vaccin empêchant l'infection par le VIH. Un vaccin efficace contre la transmission du VIH par voie vaginale devra donc induire une réponse immunitaire anti-VIH au niveau de ces muqueuses. Lors des rapports sexuels contaminants, les muqueuses du TRF sont exposées au sperme infecté par le VIH. Il est connu que le sperme, en particulier la fraction liquidienne de celui-ci, appelée liquide séminal, modifie la réponse immunitaire locale pour permettre la fertilité. Le liquide séminal infecté est donc également susceptible de modifier localement la réponse immunitaire anti-VIH induite par la vaccination. Afin de faciliter le développement futur d'un vaccin anti-VIH efficace, l'objectif de ce projet est d'étudier l'effet du liquide séminal infecté par le VIH sur la réponse immunitaire induite par un vaccin modèle au niveau des muqueuses du TRF. Aujourd'hui, aucun dispositif *in vitro* ne permet de reproduire la complexité d'une réponse immunitaire au niveau d'un organisme entier, il est donc nécessaire de recourir à un modèle animal. Le primate non humain (PNH) est le seul modèle animal permettant l'étude de la réponse vaccinale anti-VIH dans un contexte physiologique proche du contexte humain (structure du TRF et cycles menstruels semblables chez la femme et le PNH) et dans un modèle reproduisant la physiopathologie de l'infection par le VIH.

Le projet utilisera donc au maximum 18 PNH femelles, nées et élevées dans des établissements agréés. Les animaux seront vaccinés ou non avec un vaccin modèle, le MVA-VIH que nous étudions depuis plusieurs années. Ce vaccin induit une réponse immunitaire systémique anti-VIH. Dans un premier temps, nous vérifierons que ce vaccin induit également une réponse immunitaire locale au niveau des muqueuses du TRF. Pour cela, 2 femelles seront vaccinées par le MVA-VIH puis exposées par voie vaginale à un placebo (groupe 1). Si une réponse immunitaire est bien induite par le vaccin au niveau des muqueuses du TRF, dans un second temps, le groupe 1 sera complété avec 4 femelles supplémentaires ; de plus, 6 femelles vaccinées par le MVA-VIH (groupe 2) et 6 femelles non vaccinées (groupe 3) seront exposées au liquide séminal infecté par le VIH. Six animaux par groupe est le minimum requis pour une puissance statistique suffisante, sur la base de résultats préliminaires et de la littérature. La réponse immunitaire sera analysée dans le sang et dans les fluides vaginaux de façon longitudinale, puis les animaux seront euthanasiés pour caractériser les modifications de la nature et des fonctions des cellules immunitaires dans le TRF (vagin/cervix/utérus/trompes/ovaires), ainsi que dans les ganglions proximaux et distaux.

En accord avec la règle des 3R, les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administration du vaccin, prélèvement de sang et de fluides vaginaux sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés). Des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets

inattendus. Le cas échéant le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider une euthanasie. Les animaux seront hébergés par paires et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

1142. La maladie de Huntington (MH), ou chorée de Huntington, est une maladie neurodégénérative de l'adulte, qui se traduit par une dégénérescence neurologique provoquant d'importants troubles moteurs et cognitifs et conduisant à la perte de l'autonomie et à la mort. La MH est à l'heure actuelle incurable, c'est pourquoi il est urgent de développer des traitements qui pourraient cibler directement les processus moléculaires sous-jacents aux symptômes de cette pathologie. La MH affecte plus spécifiquement le striatum et le cortex dans le cerveau. Au niveau moléculaire, cela se traduit par la diminution de l'expression de nombreux gènes jouant un rôle essentiel dans l'activité neuronale. Les pathologies neurologiques à répercussions locomotrice et comportementales comme la MH nécessite d'étudier la maladie sur l'organisme entier et ne peuvent être réalisées *in vitro*. L'animal est donc nécessaire et en particulier les modèles murins de la MH, dont le modèle transgénique R6/1, qui reproduisent ce phénotype moléculaire observé chez les patients. Restaurer l'expression des gènes dérégulés est considéré comme une piste thérapeutique prometteuse. Nous avons identifié une cible thérapeutique dont la modulation devrait permettre d'améliorer l'expression des gènes dérégulés dans la MH. L'objectif de ce projet est de tester l'effet d'un composé récemment développé, capable d'activer spécifiquement cette cible dans le cerveau lorsqu'il est injecté par la voie systémique, sur l'expression des gènes dérégulés. L'expérience pilote envisagée consiste à effectuer une seule injection sur des souris (R6/1 et contrôle) et d'examiner sur le court terme l'effet sur l'expression de gènes fortement dérégulés dans le striatum et le cortex des souris R6/1. Prenant en compte la stratégie des 3R (remplacement, réduction et raffinement) et des calculs de puissance, nous estimons que 8 souris par groupe (R6/1 traitées, R6/1 non traitées, contrôles traitées et contrôles non traitées), soit un total de 32 souris, sont nécessaires à cette expérience. Par ailleurs, dans un souci de raffinement du projet et du respect du bien-être animal, l'étude sera menée à un âge où les animaux ne sont pas atteints des symptômes les plus invalidants de la MH. Enfin, un suivi quotidien des souris sera réalisé afin d'anticiper tout signe nécessitant chez l'animal des soins particuliers.

1143. Les leucodystrophies représentent un groupe hétérogène de maladies génétiques touchant primitivement la substance blanche du système nerveux central (SNC) et son principal constituant, la myéline. Parmi elles, le syndrome CACH /VWM (Childhood ataxia with central hypomyelination / Vanishing white matter disorder) est caractérisé par une dégradation neurologique survenant entre 2 et 5 ans exacerbée par des épisodes de stress et un aspect cavitaire de l'ensemble de la substance blanche cérébrale. Les examens neuropathologiques mettent en évidence des anomalies des cellules gliales avec une prolifération des oligodendrocytes immatures et très peu d'astrocytes. Le syndrome CACH est lié à des mutations dans un des 5 gènes EIF2B impliqués dans l'initiation de la traduction et il n'existe pour le moment aucune approche thérapeutique permettant d'empêcher ou de retarder le développement de la maladie et son issue fatale en quelques jours ou années. Le but du projet est d'étudier au niveau moléculaire et comportemental un modèle de souris transgéniques présentant une inactivation inductible du gène EIF2B5 (cKO EIF2B5), un des gènes trouvés les plus fréquemment mutés chez les patients, afin de comprendre l'impact de la mutation au cours du développement cérébral et de mieux mesurer l'effet en pathologie humaine. Ce modèle a été développé par l'Institut Clinique de la Souris (ICS) de Strasbourg et obtenu via le CDTA d'Orléans. Nous prévoyons pour ce projet d'utiliser 100 souris mâles et femelles réparties dans 5 groupes expérimentaux, de suivre l'apparition et l'évolution des atteintes moteurs attendues afin de mettre un terme aux souffrances de l'animal quand sa mobilité sera trop réduite.

1144. Le paludisme est dû à un parasite transmis à l'homme par des piqûres de moustiques infectés. En 2012, 207 millions de cas de paludisme et 627000 décès ont été rapportés. La majorité des victimes sont des enfants de moins de 5 ans et des femmes enceintes. Le parasite responsable du paludisme, le plasmodium, persiste dans le foie des personnes infectées sous une forme dormante, appelée hypnozoïte. Cette forme dormante du parasite est le principal obstacle à son éradication et est donc la cible majeure de la recherche thérapeutique contre le paludisme.

Nous avons récemment développé un modèle de culture *in vitro* d'hypnozoïtes dans des cellules hépatiques de macaques, autorisant ainsi, pour la première fois, l'étude de la biologie de ces formes dormantes et une évaluation préclinique de nouvelles molécules thérapeutiques. Ce modèle nécessite d'exposer les cellules hépatiques à une autre forme du plasmodium, appelée sporozoïte. Les sporozoïtes de plasmodium sont obtenus à partir des glandes salivaires de moustiques préalablement gorgés par du sang de macaques infectés par le parasite. Afin de poursuivre la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques ciblant les hypnozoïtes, ce projet consiste donc à infecter des primates non humains par le plasmodium afin d'obtenir les échantillons sanguins nécessaires pour infecter des moustiques.

Les 40 animaux utilisés pour l'étude sont nés et élevés dans des établissements agréés. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance (inoculations du parasite et prélèvements de sang sous anesthésie, limitation des volumes prélevés). Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte l'apparition d'éventuels effets inattendus. Le vétérinaire de l'installation sera alerté dès le moindre signe de souffrance afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés en modules individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

1145. Les infections chroniques par les virus de l'hépatite C (VHC), de l'hépatite B (VHB) et de l'hépatite Delta (VHD) sont un problème majeur de santé publique du fait de leur prévalence élevée (3% de la population mondiale, soit 170 millions d'individus infectés par le VHC et 4.2% soit 240 millions par le VHB). L'infection par le VHD est concomitante à une infection par le VHB et entraîne une aggravation de la maladie hépatique. La sévérité de des complications, cirrhose hépatique et carcinome hépatocellulaire (CHC), font de ces infections l'une des indications majeures de la greffe de foie. La mise au point d'un vaccin contre le VHC a été entravée par le manque d'un petit modèle animal idéal pour l'infection par ce virus. De même, l'investigation de traitements permettant l'éradication du VHB et/ou du VHD ne peut se faire que grâce à la mise au point d'un modèle in vivo permettant le développement d'une infection chronique.

L'objectif du projet est de valider l'efficacité et l'innocuité de médicaments empêchant l'entrée du virus, en développement dans notre laboratoire, et leur combinaison à d'autres molécules antivirales ciblant le cycle répliatif des virus. Ces investigations peuvent se faire grâce à un modèle murin basé sur l'utilisation de souris « humanisées » au niveau du foie et qui peuvent être infectées par ces virus hépatotropes (cf demande d'autorisation : « Production en routine de souris chimériques humanisées au niveau du foie, en vue de leur utilisation ultérieure en expérimentation dans des études d'infection par les virus de l'hépatite C, de l'hépatite B et de l'hépatite Delta. »).

La présente demande concerne différentes approches expérimentales : l'évaluation d'inhibiteurs d'entrée basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant les récepteurs des virus (anticorps anti-hôte) ou les virus eux même (anticorps neutralisants), l'évaluation d'inhibiteurs de protéines kinases ou de phosphatases, et enfin la combinaison de ces 2 approches avec des antiviraux ciblant le cycle répliatif des virus afin d'observer des effets additifs ou synergiques des différentes molécules testées. Le nombre total de souris utilisées pour le projet devrait avoisiner les 200. Afin de réduire ce nombre des expériences pilotes sur de petits groupes seront réalisées. Afin de raffiner au mieux notre méthodologie, nous avons mis en place des points limites que sont les signes de douleurs persistants plus de 48h post-greffe pour les souris uPA-SCID, ainsi que les dosages de l'albumine humaine sérique. En effet des souris avec des taux inférieurs à 50µg/mL ne pourront être utilisées ultérieurement en expérimentation du fait du faible nombre d'hépatocytes ayant repopulés le foie. Des signes de souffrance préétablis sont également utilisés afin de suivre au mieux les animaux. Afin de remplacer le plus possible l'utilisation d'animaux pour l'étude des virus hépatotropes, nous réalisons, quand cela est possible un maximum de tests in vitro en lignées cellulaires.

1146. Les infections chroniques par les virus de l'hépatite C (VHC), de l'hépatite B (VHB) et de l'hépatite Delta (VHD) sont un problème majeur de santé publique du fait de leur prévalence élevée (3% de la population mondiale, soit 170 millions d'individus infectés par le VHC et 4.2% soit 240 millions par le VHB). L'infection par le VHD est concomitante à une infection par le VHB et entraîne une aggravation de la maladie hépatique. La sévérité de des complications, cirrhose hépatique et carcinome hépatocellulaire (CHC), font de ces infections l'une des indications majeures de la greffe de foie. La mise au point d'un vaccin contre le VHC a été entravée par le manque d'un petit modèle animal idéal pour l'infection par ce virus. De même, l'investigation de traitements permettant l'éradication du VHB et/ou du VHD ne peut se faire que grâce à la mise au point d'un modèle in vivo permettant le développement d'une infection chronique. Récemment la molécule NTCP pour "Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide" a été montrée comme étant un récepteur pour les virus VHB et VHD. Cette molécule constitue donc une nouvelle cible thérapeutique pour lutter contre les infections par ces virus. De plus, des résultats obtenus in vitro dans notre laboratoire indiquent que le NTCP pourrait également intervenir dans l'entrée du VHC. Le NTCP pourrait donc être un déterminant commun à ces virus hépatotropes.

L'objectif du projet est donc de valider in vivo l'implication du NTCP humain dans l'entrée de ces 3 virus en inhibant son expression dans le foie de souris chimériques humanisées (uPA-SCID), en augmentant son expression dans le foie de souris « normales » ou en introduisant chez la souris une version humanisée du NTCP.

La présente demande concerne donc l'utilisation d'approches visant à surexprimer ou sous-exprimer le NTCP dans le foie de différents modèles de souris via l'injection de vecteurs viraux (adénovirus, AAV) permettant l'expression du NTCP ou exprimant des molécules d'ARN (shRNA) pour réduire son expression ou l'utilisation de souris génétiquement modifiées exprimant une version humanisée du NTCP.

Ce projet devrait nécessiter 900 à 1100 souris au total. Il n'est pas improbable que ce nombre soit revu à la baisse car certaines souches pourraient ne pas convenir à l'établissement d'un tel projet. Afin de réduire et d'affiner ce nombre, des expériences pilotes devront être réalisées. Afin de raffiner au mieux notre méthodologie, nous avons mis en place des points limites que sont les signes de douleurs persistants plus de 48h post-greffe pour les souris uPA-SCID, ainsi que les dosages de l'albumine humaine sérique. En effet des souris avec des taux inférieurs à 50µg/mL ne pourront être utilisées ultérieurement en expérimentation du fait du faible nombre d'hépatocytes ayant repopulés le foie. Des signes de souffrance préétablis sont également utilisés afin de suivre au mieux les animaux. Afin de remplacer le plus possible l'utilisation d'animaux pour l'étude des virus hépatotropes, nous réalisons, quand cela est possible un maximum de tests in vitro en lignées cellulaires.

1147. En élevage avicole conventionnel, des litières dégradées (très humides) sont très fréquemment observées, conduisant à une dégradation du bien-être animal et de leur croissance. Elles sont attribuées en partie à des diarrhées liées à des troubles digestifs non spécifiques (TDnS) attribués eux-mêmes au microbiote digestif, et sont actuellement traitées par des antibiotiques.

Les alternatives actuelles sont moins efficaces et d'effet plus variable que les antibiotiques. Pour comprendre leurs mécanismes d'action, plusieurs équipes ont proposés des modèles de dégradation de l'environnement de l'animal, dont l'alimentation, mais à ce jour, il n'existe pas de modèle correspondant aux conditions rencontrées en pratique.

Plusieurs origines sont suspectées. Elles relèvent de facteurs de prédisposition de l'animal (conditions de démarrage du poussin, potentiel de croissance), et de facteurs déclencheurs (Alimentation, environnement d'élevage), dont l'importance relative n'est pas connue. Il s'agit d'interactions complexes de plusieurs de ces facteurs avec différentes conséquences physiologiques qui ne peuvent être évaluées que sur les animaux eux-mêmes.

L'objet de ce travail de recherche est donc de mettre au point un modèle de TDnS plurifactoriel, prenant en compte à la fois les conditions de démarrage du poussin (Paramètre 1), l'alimentation (Paramètre 2), et l'environnement d'élevage (Paramètre 3). Le potentiel de croissance des animaux est aussi pris en compte, en les suivant selon leur catégorie de poids (faible, moyen fort).

L'espèce animale retenue est le poulet de chair à croissance rapide (mâles) fortement concernées par ces TDnS. Les caractéristiques des trois paramètres retenus ont été définies d'après les conditions rencontrées en pratique d'élevage en France. Chacun de ces trois paramètres est décliné en deux conditions : optimale et dégradée. L'objectif étant de mimer les conditions pratiques en élevage avicole, les animaux seront élevés au sol, ce qui leur permet par ailleurs d'acquérir leur microbiote digestif. Ils seront regroupés en parquet de 2.5 m² avec une litière, à une densité d'animaux / unité de surface correspondant à la pratique (maximum de 42 kg/m²), chaque parquet représentant une unité expérimentale pour les mesures non invasives. Chaque condition expérimentale (appelé traitement par la suite) sera effectuée en 6 répétitions. Ainsi, le protocole expérimental sera composé de 8 traitements : 2 conditions de démarrage de poussin x 2 types d'aliments x 2 conditions d'élevage, avec 6 répétitions / traitement expérimental (une répétition : parquet comprenant initialement 60 poussins), soit environ 2 880 animaux.

Afin de réduire le nombre d'animaux dans le cadre de cet objectif de recherche en plus des critères d'évaluation de la croissance des animaux, différents paramètres de la santé digestive seront évalués sur les différents groupes d'animaux dans le but de retenir les plus adaptés sans devoir effectuer une seconde expérimentation avec les traitements d'intérêt. Ces paramètres seront à la fois non invasifs (consommation d'aliment et d'eau, état des pattes, propreté des plumes), peu invasif (par prise de sang) ou effectués après euthanasie des animaux (2 animaux / parquets soit 12 animaux / traitement) pour une à trois catégories de poids et à différents âges (14, 21, 28 et 35 jours). Le nombre de répétitions a été déterminé en fonction de la variabilité des mesures effectuées.

Le modèle issu de cette étude pourra ensuite être utilisé pour rechercher des solutions de contrôle de la santé digestive réduisant la dégradation des litières et améliorant le bien-être animal et leur croissance.

1148. L'anxiété affecte 15-25% de la population dans les pays développés et constitue un problème majeur de santé publique. Parmi les médicaments les plus fréquemment utilisés, on peut citer le Valium, le Prozac, le Buspar et le Zoloft.

Cependant les thérapeutiques actuelles présentent des effets secondaires majeurs. Par exemple, le Valium entraîne des troubles de la mémoire, une somnolence, une addiction ainsi qu'un syndrome de sevrage. Ainsi, la recherche de nouveaux médicaments sans les effets notoires des anxiolytiques actuels reste un défi.

Nos modèles d'anxiété basés sur l'analyse du comportement de rats ou de souris demeurent à l'heure actuelle les plus pertinents et les seuls validés par la communauté scientifique. Ces modèles ont permis d'étudier les mécanismes physiopathologiques des troubles anxieux et permettent ainsi de développer de nouveaux traitements, pharmacologiques ou comportementaux.

Lors de nos travaux, nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soins aux animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10-20 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 2500 souris et 7000 rats est envisagée.

1149. La maladie de Parkinson est une pathologie causée par la dégénérescence progressive et chronique des neurones dopaminergiques (secrétant la dopamine, un neurotransmetteur) localisés dans la substance noire.

Les signes moteurs sont la rigidité, le tremblement, l'instabilité posturale et une réduction significative dans la capacité d'exécuter des mouvements volontaires (akinésie). Cependant, la maladie de Parkinson entraîne aussi des complications cognitives (principalement exécutives), de la dépression, des comportements compulsifs, de l'apathie, des troubles digestifs et des problèmes de sommeil entre autres. L'administration orale de dopamine (levodopa) peut pallier l'absence de synthèse de ce neurotransmetteur par les cellules dopaminergiques dégénérées pendant 5 à 8 ans. Passé cette période, la prise de levodopa plusieurs fois par jour entraîne une libération pulsatile de dopamine dans le cerveau créant des complications motrices secondaires sévères et invalidantes (dyskinésies) et exacerbe les troubles non-moteurs. Une libération de dopamine plus constante et physiologique pourrait éviter ce type de complication et prolonger la durée du traitement. La thérapie génique (utilisation d'un virus non-pathogène pour exprimer une molécule d'intérêt de façon continue à long terme) est en phase de test clinique pour la maladie de Parkinson. Les résultats sont encourageants mais l'essai en cours ne concerne que les aspects moteurs de la maladie.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de la thérapie génique sur les troubles non-moteurs de la maladie de Parkinson dans un modèle primate non-humain de la maladie. L'efficacité de cette stratégie pour corriger les symptômes moteurs a déjà été démontrée dans notre laboratoire sur ce même modèle. Le projet s'inscrit dans une démarche translationnelle. Il

permettra, à terme, de valider au stade préclinique la possibilité de corriger les troubles cognitifs en même temps que les déficits moteurs, et ainsi d'améliorer la prise en charge et la qualité de vie des patients parkinsoniens.

Les primates non-humains étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité, dans des élevages reconnus. Leur nombre, qui s'élève à 16, a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données significatives afin d'évaluer l'effet du traitement à différentes doses. Le modèle primate non-humain se justifie par la possibilité d'évaluer les fonctions motrices et cognitives dans une espèce proche de l'homme, en utilisant des échelles et tests de comportement disponibles en clinique. De même, la résolution des images IRM et TEP permet d'appliquer le même suivi longitudinal chez l'animal et chez l'homme afin de disposer d'index prédictifs de la maladie et de sa progression avant, pendant et après traitement.

L'évaluation fonctionnelle sera menée en utilisant des techniques indolores et non-invasives telles que l'imagerie IRM et TEP, ainsi que l'étude du comportement moteur spontané et du comportement cognitif à l'aide d'écrans tactiles. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Des échelles cliniques journalières, un soutien nutritionnel et l'application de critères d'arrêt permettent de veiller au bien-être des animaux.

1150. Il apparaît de plus en plus clairement que seule la combinaison de plusieurs traitements qui ciblent différents processus liés au cancer aura une réelle efficacité dans la lutte contre ce problème de santé publique majeur. Ce projet repose sur l'idée que l'inhibition de la croissance des vaisseaux qui alimentent une tumeur permettrait de la détruire. Nous avons démontré que la protéine Tis11b cible simultanément plusieurs molécules clés de la vascularisation et de la croissance tumorale in vitro. Ces observations nous ont amenés à mettre en place une nouvelle stratégie anti-tumorale basée sur les propriétés multi-cibles de cette protéine. Nos premiers résultats ont été très encourageants. Nous avons établi que l'injection intra-tumorale de Tis11b dans des tumeurs sous-cutanées, pré-établies chez des souris immunodéficientes, ralentit la croissance de ces tumeurs et inhibe de façon spectaculaire leur vascularisation. Le projet de recherche que nous soumettons ici vise à optimiser notre stratégie en augmentant l'efficacité de la protéine Tis11b. Nous avons récemment généré une version tronquée de Tis11b qui s'est révélée beaucoup plus stable et plus active. Notre objectif est d'évaluer l'efficacité anti-tumorale de cette nouvelle protéine chez des souris sans système immunitaire acceptant la greffe de cellules tumorales humaines du sein (lignée humaine MDA-MB-231) et des souris équivalentes mais possédant un système immunitaire (lignée murine 4T1). L'optimisation de notre stratégie pré-clinique ouvre des perspectives prometteuses et représente une approche novatrice dans le domaine des thérapies anti-tumorales existantes.

Le projet portant sur des approches thérapeutiques, il n'est pas possible d'obtenir l'ensemble des réponses en utilisant un modèle cellulaire. Nous avons retenu un modèle rongeur, élevé dans des établissements agréés. Seul cet animal est suffisamment connu et caractérisé génétiquement pour pouvoir comprendre les mécanismes mis en jeu. Le nombre d'animaux (n=144) a été déterminé grâce aux expériences réalisées dans le cadre d'un précédent projet. Cette approche nous a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille d'observation clinique permettant de limiter les contraintes pour les animaux. L'utilisation de cette grille nous permet d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements antalgiques appropriés.

1151. Les recherches entreprises depuis une quinzaine d'années sur les anticorps spécifiques de récepteurs cellulaires ont montré que certains d'entre eux peuvent induire des effets thérapeutiques significatifs chez l'homme et s'avérer plus efficaces que les médicaments issus de la pharmacopée classique. Ces résultats ont eu deux conséquences principales. Premièrement, la mise sur le marché d'anticorps médicaments prescrits pour différentes pathologies. Deuxièmement, le développement de travaux ayant pour objectif de produire des anticorps spécifiques de nouveaux récepteurs cellulaires afin de couvrir un nombre accru de maladies ou de procurer des médicaments plus efficaces pour le patient.

L'obtention d'anticorps spécifiques de récepteurs cellulaires est, la plupart du temps, réalisée par immunisation d'animaux car les méthodes alternatives d'immunisation "in vitro" s'avèrent inefficaces. Notre service possède une expertise dans la production d'anticorps chez l'animal de laboratoire et dans la production de substances immunisantes hautement immunogènes qui peuvent être injectées en faible quantité et présentent, de ce fait, un risque faible pour l'animal. Cette expertise est mise au service de projets de recherche menés en relation avec des industriels du médicament ou des partenaires académiques pour tenter de produire des anticorps spécifiques de récepteurs cellulaires et d'évaluer leur potentiel thérapeutique.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages agréés et sont nés et élevés en captivité. Leur nombre (960 rongeurs) a été réduit au minimum nécessaire tout en restant suffisant pour ne pas compromettre la validité pour 7 séries d'expériences qui seront menées. Nous avons pour objectif d'obtenir des anticorps polyclonaux spécifiques de différents récepteurs exprimés à la surface de cellules et présentant un intérêt thérapeutique vis-à-vis de divers pathologies (cancer, maladies inflammatoires, maladies infectieuses, etc...). Pour cela, nous immuniserons dans un premier temps les rongeurs et réaliserons par la suite des prélèvements de sang afin d'obtenir les anticorps polyclonaux et de les caractériser pour leur capacité à reconnaître la cible cellulaire. Ces travaux, qui permettront une première évaluation du potentiel des anticorps induits, constituent un préalable indispensable avant la préparation des anticorps monoclonaux et la sélection de ceux qui pourraient présenter la plus grande efficacité pour une utilisation en thérapeutique humaine.

L'état de santé et de bien-être des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus.

Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

1152. Le SIDA est une maladie infectieuse due au virus de l'immunodéficience humaine (VIH). On considère qu'environ 34 millions de personnes sont infectées dans le monde. Il n'existe, à ce jour, aucun traitement capable d'éradiquer le virus chez les personnes infectées, les traitements actuels permettant seulement de ralentir la progression de la maladie, ni aucun vaccin efficace pour prévenir l'infection. Néanmoins, de nombreuses stratégies vaccinales ont été testées mais aucune n'a montré une efficacité supérieure à 30% lors des essais cliniques. Il est donc nécessaire de développer des approches vaccinales plus efficaces. Les objectifs de ce projet sont d'évaluer l'innocuité, l'immunogénicité et l'efficacité d'un nouveau candidat vaccin anti-VIH. Ce candidat vaccin a pour objectif de mobiliser deux lignes de défenses anti-infectieuses : des anticorps capables d'empêcher l'entrée du VIH dans ses cellules cibles et des cellules immunitaires spécifiques du virus capables d'éliminer les cellules infectées par le VIH. Ce candidat vaccin a été optimisé pour induire une réponse immunitaire plus efficace.

Les évaluations d'efficacité vaccinale ne pouvant être réalisées que sur des organismes entiers, il est actuellement impossible de ne pas recourir à un modèle animal pertinent. Le modèle choisi pour ce projet est un primate non humain (PNH). Sa physiologie et son système immunitaire étant proches de ceux de l'Homme, la réponse vaccinale est semblable à celle obtenue chez l'Homme. De plus, les PNH infectés par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) ou par des virus chimères SIV/VIH (SHIV) constituent le seul modèle expérimental reproduisant la pathogénèse observée chez l'Homme infecté par le VIH. C'est donc le seul modèle permettant de tester à la fois la sûreté, l'immunogénicité et l'efficacité d'un candidat vaccin anti-VIH.

Le nombre d'animaux (24) inclus dans ce projet a été réduit au minimum nécessaire pour permettre une analyse statistique robuste des données. Tous sont nés et ont été élevés en captivité dans des élevages reconnus.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administration du vaccin/du virus et prélèvement de sang sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés). Des critères d'arrêt ont été définis afin de limiter la durée de l'infection et de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Le cas échéant le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Les animaux seront hébergés par paires avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

1153. La thérapie génique a pour but de traiter les maladies d'origine génétique. Elle consiste à introduire chez un patient la copie normale (gène sain) du ou des gènes déficient(s) responsable(s) de sa maladie pour lui faire produire la protéine manquante dans les cellules cibles. Il peut également s'agir de modifier l'expression du ou des gène(s) délétère(s) impliqué(s) dans une pathologie. Afin d'introduire le gène-médicament, on utilise des vecteurs capables de pénétrer les cellules cibles et de permettre à l'ADN-thérapeutique (gène) d'aller dans le noyau. Ces vecteurs sont en général des virus, comme les rétrovirus (virus à ARN) ou les adénovirus (virus à ADN) auxquels on a ôté toute capacité à se multiplier et dont une partie du génome est remplacée par la séquence à faire exprimer.

Les AAV (Adeno-Associated Virus) sont une troisième catégorie de vecteurs qui ont l'avantage d'être très répandus chez l'homme et de ne pas être pathogènes. Ils sont caractérisés par une forte capacité de pénétration in vivo d'une grande variété de cellules. Les AAV permettent une expression très longue in vivo du produit issu du gène thérapeutique vectorisé. Toutefois, des administrations répétées d'AAV sont susceptibles d'induire une réponse du système immunitaire avec production d'anticorps qui neutralisent les AAV administrés, et donc à terme d'atténuer l'effet thérapeutique de cette catégorie de vecteurs.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier la possibilité de prévenir (atténuer ou abolir) la mise en place d'une réponse immunitaire anti-AAV par traitement à l'aide d'immunosuppresseurs. De telles études ne peuvent être réalisées que sur des organismes entiers. Le modèle animal est donc nécessaire pour réunir le maximum d'informations avant la réalisation d'essais cliniques chez l'Homme.

Le modèle animal retenu pour ce projet est un primate non-humain : le macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Ce choix est guidé par la grande similarité de la nature de la réponse immunitaire entre le macaque et l'homme. Le nombre d'animaux dans chacun des trois groupes expérimentaux (un groupe témoin de 3 animaux et deux groupes expérimentaux constitués de 6 animaux chacun) a été réduit au maximum tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques adaptés aux petits effectifs pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies afin d'éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administrations et prélèvements sous anesthésie, limitations des volumes prélevés...). La durée de la phase d'administration a été réduite au maximum (91 jours au total), alors que l'ensemble des analyses biochimiques et pharmacologiques s'étalera sur deux ans.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 15 animaux provenant d'élevages autorisés. Les différentes procédures expérimentales de ce projet imposent un hébergement individuel des animaux afin de maîtriser les éventuelles surexpositions virales et les contaminations croisées entre individus. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires). Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation mettra en œuvre des traitements appropriés ou décidera d'une euthanasie.

1154. - Raison du projet : étude réglementaire

- Objectif du projet : L'étude est une étude de confirmation de dose pour évaluer l'efficacité d'un nouvel antiparasitaire externe. Ce produit a montré des résultats prometteurs d'efficacité et d'innocuité lors d'études conduites chez des bovins infestés artificiellement par des tiques ou naturellement par des tiques et des puces. Le produit sera administré une fois à la dose de 1 mg/kg chez des bovins infestés naturellement par les poux, et comparé à un groupe également infesté et traité avec un placebo. L'innocuité du produit sera également évaluée.
- Après l'allotement de 16 animaux aux 2 groupes de traitement (allotement au hasard en fonction du nombre de poux et du poids des animaux), les animaux seront traités. Une observation clinique sera réalisée quotidiennement pendant 84 jours maximum. Le comptage des poux et les examens cliniques seront effectués en aveugle de manière hebdomadaire.
- Bénéfice attendu du projet : évaluation de l'efficacité et de l'innocuité du produit testé dans les conditions de l'étude, pour une potentielle obtention d'une autorisation de mise sur le marché du produit testé.
- Animaux : 16 bovins âgés de 4 à 24 mois seront utilisés.
- Dommages attendus : l'hébergement et les soins aux animaux sont conformes à l'arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles. La seule souffrance attendue correspond à l'administration unique du produit testé ou du placebo, et à la manipulation hebdomadaire des animaux pour l'examen clinique et le comptage des poux sur le corps de l'animal. La souffrance attendue est classée légère. Conformément à la loi, les animaux ayant reçu le produit en développement seront euthanasiés (dans les conditions fixées dans l'arrêté du 1er février 2013). Les animaux ayant reçu le placebo pourront être gardés en vie ou remis dans le circuit commercial. Tous les animaux de l'étude proviennent d'une réutilisation (classée en souffrance légère).
- Application des 3Rs :
 - . remplacement : l'utilisation d'animaux est requise réglementairement.
 - . réduction : le nombre d'animaux est celui requis pour obtenir l'analyse valide requise par la ligne directrice WAAP.
 - . raffinement : l'espèce choisie est l'espèce cible du produit testé. La souffrance légère induite par l'étude est nécessaire pour évaluer l'efficacité et l'innocuité du produit en développement.

1155. La fibrose est la conséquence de mécanismes de réparation tissulaire et de réactions inflammatoires chroniques et non résolues. Elle est caractérisée par une augmentation du dépôt de protéines matricielles qui désorganisent l'architecture des organes touchés. Dans les pays développés, il est estimé que 45% de la mortalité pouvait être associée à des pathologies ayant une composante fibrotique. La fibrose hépatique est une résultante commune aux pathologies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine virale (hépatite C), parasitaire, biliaire ou consécutive à une stéatohépatite alcoolique (ASH) ou non alcoolique (NASH). La progression de la fibrose hépatique conduit à terme à la cirrhose, source de morbidité et de mortalité élevées.

A ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement spécifique de la fibrose hépatique. L'objectif de ce projet est de démontrer l'efficacité thérapeutique de molécules dans la prévention et le traitement de la fibrose hépatique, et ainsi de pouvoir proposer à terme de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les pathologies fibrotiques dont la prise en charge représente des enjeux majeurs de santé publique.

Actuellement, aucun des modèles de rongeurs disponibles ne reproduit fidèlement la physiopathologie humaine de la fibrose. Aussi, l'évaluation thérapeutique de nos molécules sera réalisée dans plusieurs modèles, afin de notamment pouvoir déterminer leurs propriétés anti-fibrotiques dans des contextes pathologiques de natures différentes. Une étude rigoureuse de la littérature a été réalisée afin de sélectionner des modèles fiables et pertinents pour la mise en place et le développement de la fibrose hépatique.

L'évaluation de molécules d'intérêt pour le traitement de la fibrose hépatique sera réalisée au cours de la durée couverte par ce projet avec 3990 souris.

Une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3 R's. L'évaluation finale du potentiel thérapeutique des produits dans des modèles animaux reste cependant nécessaire. En effet, l'administration des composés dans le contexte d'un animal entier permet d'évaluer la réelle efficacité des composés dans un système biologique complexe et « global ». La fibrose hépatique est une pathologie complexe, chronique et de longue durée dans sa genèse et son développement, et la pertinence thérapeutique de nouvelles molécules est difficilement caractérisable autrement qu'avec des animaux.

Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle du raffinement, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant.

1156. La fibrose est la conséquence de mécanismes, de réparation tissulaire et de réactions inflammatoires, chroniques et non résolus. Elle est caractérisée par une augmentation du dépôt de protéines matricielles qui désorganisent l'architecture des organes touchés. Dans les pays développés, il est estimé que 45% de la mortalité pouvait être associée à des pathologies

ayant une composante fibrotique. La fibrose hépatique est une résultante commune aux pathologies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine virale (hépatite C), parasitaire, biliaire ou consécutive à une stéatohépatite alcoolique (ASH) ou non alcoolique (NASH). La progression de la fibrose hépatique conduit à terme à la cirrhose, source de morbidité et de mortalité élevées.

A ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement spécifique de la fibrose hépatique. L'objectif de ce projet est de démontrer l'efficacité thérapeutique de molécules dans la prévention et le traitement de la fibrose hépatique, et ainsi de pouvoir proposer à terme de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les pathologies fibrotiques dont la prise en charge représente des enjeux majeurs de santé publique.

Actuellement, aucun des modèles de rongeurs disponibles, ne reproduit fidèlement la physiopathologie humaine de la fibrose. Aussi, l'évaluation thérapeutique de nos molécules sera réalisée dans plusieurs modèles, afin de notamment pouvoir déterminer leurs propriétés anti-fibrotiques dans des contextes pathologiques de natures différentes. Une étude rigoureuse de la littérature a été réalisée afin de sélectionner des modèles fiables et pertinents pour la mise en place et le développement de la fibrose hépatique.

L'évaluation de molécules d'intérêt pour le traitement de la fibrose hépatique sera réalisée au cours de la durée couverte par ce projet avec 7600 souris et 3245 rats.

Une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3 R's. L'évaluation finale du potentiel thérapeutique des produits dans des modèles animaux reste cependant nécessaire. En effet, l'administration des composés dans le contexte d'un animal entier permet d'évaluer la réelle efficacité des composés dans un système biologique complexe et « global ». La fibrose hépatique est une pathologie complexe, chronique et de longue durée dans sa genèse et son développement, et la pertinence thérapeutique de nouvelles molécules est difficilement caractérisable autrement qu'avec des animaux.

Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle du raffinement, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant.

1157. Si les molécules antirétrovirales disponibles actuellement empêchent la progression des patients infectés par le VIH-1 vers le stade SIDA, un rebond de la virémie plasmatique est systématiquement observé quelques jours après l'interruption du traitement. Ce rebond est dû à un réservoir de cellules infectées par le VIH-1, qui persiste malgré le traitement. Ce réservoir est aujourd'hui l'obstacle majeur à la guérison des patients infectés.

Le réservoir est constitué de cellules très rares dans l'organisme, qui se trouvent dans un état quiescent et infectées de manière latente (infection non productive). L'étude ex vivo de ces cellules non reconnues par le système immunitaire et insensibles aux traitements est extrêmement limitée en raison de leur rareté. Qui plus est, la plupart des études chez l'Homme ne peuvent être menées que sur le sang périphérique alors que l'essentiel des cellules réservoirs est localisé dans les tissus. Leur détection implique également une étape d'activation in vitro qui modifie considérablement leur biologie. Enfin, les modèles in vitro actuels ne reproduisent pas fidèlement les mécanismes de l'infection latente in vivo.

Afin de mieux caractériser les cellules réservoir et de mieux comprendre les mécanismes d'établissement et de maintenance de ce réservoir à long terme, notre équipe a pour objectif de développer un nouveau modèle in vivo pour l'étude de la latence et de la persistance du VIH-1 chez le primate non-humain (PNH). En effet, les caractéristiques de l'infection par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) de primates non-humains sont en tous points similaires à la physiopathologie de l'infection par le VIH-1 chez l'Homme. Les PNH infectés par le SIV sont donc le modèle de référence pour l'étude de l'infection de l'homme par le VIH-1. Notre équipe a de plus développé un système rapporteur de l'infection in vivo permettant de distinguer directement les cellules infectées de manière productive des cellules porteuses de virus latents.

Ce modèle établi chez le primate non-humain permettra d'identifier les différents types cellulaires impliqués dans la persistance virale, de mettre en évidence des sanctuaires anatomiques (tissus dans lequel le VIH échappe au traitement) chez les animaux traités, d'établir de façon définitive l'existence ou non d'une réplication virale à bas bruit sous traitement antirétroviral, d'identifier la source du rebond viral après interruption du traitement, et enfin, d'identifier des marqueurs spécifiques des cellules réservoir. L'utilisation de ce modèle est le seul moyen d'atteindre ces objectifs et d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à l'éradication du VIH-1 chez l'Homme.

Les 18 animaux prévus dans ce projet sont nés et élevés dans des établissements agréés. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire tout en répondant aux objectifs du projet. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administrations et prélèvements sous anesthésie, limitation des volumes prélevés). Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés par paires avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

1158. Le vigabatrin est le traitement antiépileptique de première intention administré dans les cas de spasme infantile. Malheureusement, chez ces enfants comme pour les adultes traités par ce médicament, on observe une constriction irréversible du champ visuel, initialement attribuée à un dysfonctionnement des cônes, cellules responsables de la vision des couleurs.

Les études déjà menées considèrent uniquement l'atteinte de la rétine externe et des photorécepteurs, nous avons donc entrepris de regarder l'effet de la déplétion en taurine sur la rétine interne et plus spécifiquement sur les cellules ganglionnaires des animaux traités au vigabatrin. Cette atteinte cellulaire résulterait d'une diminution des taux en taurine dans l'organisme, consécutive à la prise de vigabatrin. Notre objectif est de prouver chez le primate non humain le lien étroit entre vigabatrin et taurine. Nous induirons une déplétion en taurine chez le primate non humain en administrant de la bêta alanine (5%) dans l'eau de boisson et analyserons en détail les effets de cette carence sur la rétine sur 1 année de traitement.

Le projet mettra en œuvre au total un maximum de 9 primates non humains adultes de sexe indifférent, répartis au maximum en 3 séries identiques de 3 animaux. Les 3 premiers animaux seront traités à la bêta alanine pendant une durée de 1 an. Les concentrations de bêta alanine et taurine seront évaluées tous les 2 mois. L'imagerie du fond d'œil ainsi que la fonctionnalité de la rétine (déterminée par électrorétinogramme ERG) sera effectuée tous les 4 mois. L'effectif est réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ces animaux sont nés et ont été élevés dans des élevages reconnus.

Toutes les interventions se feront sous anesthésie générale pour réduire la contrainte imposée aux animaux. Ce projet s'appuie sur des études préalables *in vitro* et *in vivo* chez des modèles rongeurs. La mise en œuvre d'un suivi longitudinal non invasif par imagerie *in vivo* permet de diminuer le nombre d'animaux. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement s'il y a un signe de souffrance et de veiller au bien-être des animaux. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

1159. Le projet correspond à une activité d'hébergement, d'élevage (reproduction) et de maintenance à façon de lignées de rongeurs génétiquement modifiés. L'utilisation des animaux est donc imposée par la nature même du matériel qui nous est confié. L'élevage de rongeurs génétiquement modifiés nécessite une identification individuelle des individus et une biopsie pour obtenir le génotype de l'individu (caractérisation de la lignée).

En fonction des contraintes des études phénotypiques réalisées sur ces animaux, deux types d'identifications sont envisagés :

- Par transpondeur injecté en sous cutané sur le dos
- Par bague à l'oreille

Ces deux techniques sont coûteuses et imposent la présence à demeure d'un élément (transpondeur et bague) ce qui peut gêner les études expérimentales dans ces deux cas. L'alternative est d'utiliser les identifications par :

- Marquage à l'oreille
- Tatouage
- Excision de la dernière phalange des pattes postérieures et antérieures. Cette technique sera utilisée uniquement si les autres méthodes ne peuvent être appliquées (par exemple l'âge de l'animal, ou des contraintes expérimentales).

Le principe de la biopsie est de prélever suffisamment de matériel pour en extraire l'ADN pour réaliser un génotypage. Les biopsies correspondent à :

- Un prélèvement de 0.5 cm du bout de la queue.
- Biopsie d'oreille couplée à l'identification à l'oreille
- Excision des phalanges couplée à l'identification par les phalanges

Les animaux seront soit sacrifiés (lignées sans intérêt), soit placés dans un autre établissement utilisateur (lignées présentant un intérêt pour la recherche scientifique).

Le nombre d'animaux à identifier et à prélever est basé sur la taille et la fréquence des mise-bas. Le nombre de mise-bas est estimé à 4000 par an pour l'élevage rat et 4000 par an pour l'élevage souris. Le nombre de petits par portée est estimé à 10 pour la souris et à 7 pour le rat. Le nombre d'animaux qui seront soumis à une des techniques d'identification et/ou de biopsie sur 5 ans est donc estimé à 200 000 pour l'espèce souris et 140 000 pour l'espèce rat.

1160. Au cours des deux dernières décennies, les progrès en génétique ont permis de développer de nouvelles stratégies pour l'élaboration de candidats vaccins dirigés contre des maladies parasitaires, virales ou bactériennes. Parmi ces stratégies, la délétion de gènes de virulence de l'agent pathogène et l'expression de gènes codant des antigènes majeurs sont fréquemment employées.

Chacune de ces modifications génétiques qui conduiront à l'obtention de souches vaccinales nécessitent de nombreux passages en culture cellulaire, passages qui génèrent progressivement une atténuation de la virulence du parasite. Cette dérive de la virulence parasitaire est préjudiciable pour nos études car :

1. elle n'est pas maîtrisée ce qui est préjudiciable d'un point de vue réglementaire
2. elle ne permet pas de comparer la virulence des souches entre elles car le nombre de passage en culture cellulaire diffère d'une souche à l'autre,
3. elle peut être néfaste pour l'efficacité de nos candidats vaccins.

Un passage du parasite chez l'animal restaure la virulence de celui-ci et permet de lutter efficacement contre la dérive observée après les passages successifs en culture cellulaire. En conséquence, après élaboration d'un candidat vaccin obtenu

par modification génétique, nous souhaitons l'inoculer à des souris pour limiter l'atténuation due aux passages en culture cellulaire et nous sollicitons le Comité d'Ethique pour obtenir les autorisations nécessaires à ces expérimentations. Au cours des 5 prochaines années, 50 candidats vaccins seront élaborés et nécessiteront un passage chez la souris pour restaurer leur virulence. Avec deux souris par candidat vaccin, le nombre maximum d'animaux utilisés sera donc de 100 souris.

1161. La toxoplasmose est une maladie infectieuse provoquée par un parasite, *Toxoplasma gondii*, qui affecte l'ensemble des espèces à sang chaud et notamment les ovins, les félins et l'Homme. Actuellement, malgré une forte demande aucun vaccin efficace, sûr et pratique d'utilisation n'est disponible sur le marché.

Pour évaluer l'efficacité d'un candidat vaccin, des expériences sont généralement réalisées chez l'animal. Elles comprennent typiquement une phase de vaccination dans laquelle l'animal reçoit le vaccin et une phase de challenge dans laquelle l'animal reçoit une dose infectieuse de l'agent pathogène. L'observation des signes cliniques dans le lot vacciné et dans le lot témoin non vacciné permet d'estimer l'efficacité du candidat vaccin. Bien entendu, le challenge doit mimer au mieux l'infection naturelle et notamment la voie d'administration, le stade infectieux, la dose, etc... Dans le cadre de *Toxoplasma gondii*, deux voies de contamination sont majoritairement admises :

- L'ingestion de parasites présents sous forme de kystes (i.e. bradyzoïtes) dans la viande d'animaux infectés par le parasite. Ce mode d'infection touche principalement les carnivores (chat, Homme, etc...).
- L'ingestion de parasites présents sous forme d'oocystes excrétés dans les fèces de chats infectés et qui viennent souiller des aliments. Ce mode d'infection touche principalement les herbivores (mouton, Homme, etc...).

Nous disposons d'un candidat vaccin contre la toxoplasmose. Afin d'étudier l'efficacité de ce candidat vaccin et pour répondre aux exigences des instances réglementaires pour l'enregistrement de médicaments vétérinaires et humains, plusieurs expérimentations de vaccination / challenge sont nécessaires et nous devons disposer de parasites sous forme d'oocystes mais également sous forme de bradyzoïtes. Les oocystes étant très stables, nous disposons de cette forme parasitaire au laboratoire. Au contraire, les bradyzoïtes, qui ne peuvent être produits *in vitro*, nécessitent un maintien et une production chez l'animal et notamment chez la souris.

L'objectif du présent document est de décrire les expérimentations permettant le maintien de la production du parasite *T. gondii* sous forme bradyzoïte, pendant 5 années (une souris par mois soit 60 souris) et pour la production de doses de challenge nécessaire pour une expérimentation de vaccination / challenge (108 souris). Nous sollicitons le Comité d'Ethique pour obtenir les autorisations nécessaires à ces expérimentations.

1162. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, elles sont à l'origine de 30% de la mortalité mondiale totale. L'ischémie du myocarde est une pathologie cardiovasculaire très répandue qui est à l'origine de dysfonctions vasculaire et cardiaque (arythmies et infarctus du myocarde). L'infarctus du myocarde touche 120 000 personnes par an en France et provoque le décès de 50 millions d'Hommes chaque année dans le monde. Cette pathologie qui survient à la suite de l'obstruction d'une artère coronaire privant ainsi une partie du myocarde d'oxygène, entraîne à long terme une dysfonction du ventricule gauche du cœur qui aboutit à l'insuffisance cardiaque. La dysfonction ventriculaire et la fatigue qui en résultent, sont encore mal prises en charge par les traitements actuels et nécessitent donc la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques. L'ischémie du myocarde et l'insuffisance cardiaque fonctionnelle qui en découlent sont des processus intégrés et complexes qui ne sont pas modélisables *in vitro* mais qui peuvent être étudiés au laboratoire grâce aux modèles précliniques chez l'animal et ainsi permettre la découverte de nouvelles thérapies. La dysfonction ventriculaire qui en résulte, dans les modèles animaux, est mesurée au moyen d'imagerie clinique non invasive, ou de mesures hémodynamiques. Ces examens permettent de mesurer finement les effets d'un candidat médicament et ainsi limiter le nombre d'animaux utilisés. L'expérience consistera à comparer la taille de l'infarctus et l'évolution de la fonction ventriculaire gauche entre un groupe soumis à un candidat médicament et celui soumis à placebo ou traitement de référence au décours de l'infarctus du myocarde.

Ce projet a pour but de démontrer l'efficacité d'un composé sélectionné, il interviendra en toute dernière phase de la description d'une molécule.

L'induction d'une sténose coronaire chez la souris est réalisée par une intervention chirurgicale sous anesthésie générale complétée d'une analgésie. L'état général de la souris est surveillé en post-opératoire afin de s'assurer qu'elle a bien récupéré son état de santé normal (sutures, masse corporelle, activité locomotrice...). Elle est ensuite placée en cage individuelle avec nourriture et eau à volonté. Un enrichissement de milieu type cocoon lui permettant d'exprimer son instinct de nidification est placé dans la cage afin de réduire le stress occasionné par la chirurgie et l'isolement. En cas de constatation d'un signe de souffrance, la souris sera retirée de l'étude en fonction de points limites prédéfinis.

Ce modèle expérimental est pertinent pour l'étude de l'infarctus du myocarde mais également du développement de l'insuffisance cardiaque *in vivo*. Les mesures des paramètres physiologiques, tels que la pression artérielle, la fréquence cardiaque et les altérations de l'électrocardiogramme sont réalisables uniquement chez l'animal vivant. Le suivi longitudinal de la fonction cardiaque par échocardiographie (technique non invasive et indolore qui peut être réutilisée au cours du temps sur un même animal) permet de réduire le nombre d'animaux par étude et est réalisé sous anesthésie gazeuse suivie du réveil, afin de limiter le stress.

Nous travaillons avec des animaux jeunes au développement mature car l'objet du projet est de travailler avec des souris adultes en évitant l'impact du vieillissement.

Les données de la littérature chez la souris indiquent une utilisation de 15 animaux par groupe : 'contrôle', 'infarctus', 'infarctus traité médicament', 'infarctus traité médicament de référence' pour étudier les effets hémodynamiques d'un composé sur la taille d'infarctus ou le développement de l'insuffisance cardiaque. Nous prévoyons d'utiliser ce protocole au maximum 5 fois par an, ce qui représente 300 souris par an, soit environ 1500 souris sur la durée totale du projet (5 ans).

1163. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, elles sont à l'origine de 30% de la mortalité mondiale totale.

Il est possible de prévenir ces pathologies (principalement cardiopathie coronarienne et accident vasculaire cérébral) 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 et ainsi permettre la découverte de nouvelles thérapies. Ce projet s'inscrit dans le cadre du screening secondaire, à savoir que seuls les produits ayant une activité pharmacologique intéressante observée sur des tests *in vitro* et/ou *ex vivo* seront étudiés afin d'évaluer leur efficacité *in vivo*.

Dans le cadre de nos recherches dans le domaine cardiovasculaire, il est nécessaire de mesurer les paramètres physiologiques, tels que la pression artérielle et la fréquence cardiaque, mesures réalisables uniquement chez l'animal vivant. L'évaluation de ces paramètres hémodynamiques est indispensable à la sélection d'un nouveau candidat médicament, à la fois pour documenter son efficacité thérapeutique mais également son innocuité.

Pour ce faire, deux méthodes existent. La première, la télémétrie, est une méthode de référence permettant la mesure des paramètres hémodynamiques à distance, en temps réel, sur une période pouvant aller jusqu'à 6 mois au sein de l'animalerie, sans contrainte pour l'animal et dans son environnement habituel. Cette technique nécessite

la mise en place de l'implant sous anesthésie générale pendant toute la durée de l'acte chirurgical avec réveil. Les contraintes techniques de ces implants obligent un hébergement individuel. Les données obtenues par cette technique sont fiables et reproductibles. Les animaux sont utilisés à plusieurs reprises après une période de récupération « wash-out » permettant ainsi de réduire le nombre utilisé.

La seconde technique consiste en l'implantation de cathéters en voie artérielle et veineuse afin de mesurer les paramètres hémodynamiques chez l'animal vigile dans son environnement habituel. La mise en place des cathéters est réalisée sous anesthésie générale pendant toute la durée de l'acte chirurgical. Pour une bonne récupération post-opératoire, les animaux sont placés en hébergement individuel. Les animaux peuvent être réutilisés une fois, en respectant une période de récupération entre chaque administration, contribuant aussi à une utilisation d'animaux diminuée. Un enrichissement du milieu est apporté à tous les animaux en hébergement, quelle que soit la technique dans laquelle ils sont ou doivent être inclus, sous la forme de bâtonnets de bois à ronger. Cet apport permet en particulier de limiter les contraintes liées aux hébergements individuels imposés par ces techniques.

Le choix de ces deux techniques ainsi que l'enrichissement de milieu associé contribuent donc au raffinement et à la réduction, composantes de la règle des 3R.

Ce projet nous permet d'évaluer les effets hémodynamiques de produits pharmacologiques en phase aiguë et/ou chronique et ainsi obtenir des informations sur la tolérance et sur la cinétique des effets hémodynamiques. La durée du traitement oriente principalement le choix de la méthode expérimentale. En effet, dans le cas d'un traitement chronique, la télémétrie est favorisée. En revanche, dans le cadre de produits à tester en phase aiguë, la chirurgie plus légère nécessaire à l'implantation des cathéters est privilégiée.

Le rat est un modèle expérimental pertinent pour la mesure des différents paramètres hémodynamiques *in vivo*. De plus, des souches mutantes présentant une hypertension artérielle existent. La taille de cet animal permet également de réaliser différents prélèvements en quantité suffisante pour les évaluations *ex vivo*.

Nous travaillons avec des animaux au développement mature car l'objet du projet est de travailler avec des rats adultes jeunes (à partir de 10 semaines) et des rats adultes vieux (à partir de 50 semaines) pour étudier l'effet de l'âge sur le système cardiovasculaire. Un âge de maintien maximum de 65 semaines a été déterminé afin de limiter le risque d'accidents vasculaires cérébraux et la survenue de signes de détérioration de l'état général.

Les données de la littérature chez les rongeurs indiquent une utilisation de 6-9 animaux par groupe : 'contrôle', 'traité' pour étudier les effets hémodynamiques d'un composé.

Nous estimons une utilisation de 300 rats par an pour la télémétrie et d'environ 250 rats implantés de cathéters. Ainsi, sur la durée du projet évaluée à 5 ans, environ 2750 animaux seront nécessaires.

1164. Les champignons du genre *Aspergillus* sont des moisissures banales de l'environnement qui se propagent par l'intermédiaire de spores microscopiques; elles peuvent infecter les mammifères (dont l'homme) et les oiseaux, en général après l'inhalation de ces spores en suspension dans l'air. Chez l'individu immunocompétent, les défenses de l'organisme s'opposent au développement des spores. En revanche, chez les individus immunodéprimés, l'inefficacité de la réponse immunitaire aboutit à une infection dont le site initial de développement est le plus souvent l'appareil respiratoire.

Les particularités anatomiques et physiologiques des oiseaux les rendent particulièrement réceptifs et sensibles aux aspergilloses, même chez les individus immunocompétents. L'infection aspergillaire demeure ainsi une dominante pathologique chez des espèces d'oiseaux sauvages en liberté (rapaces), en captivité (manchots), ainsi que chez des espèces de volière (Psittacidae) et d'élevage (dindes, cailles et dans une moindre mesure, poulets).

L'apparition des symptômes est souvent brutale et la mortalité aviaire liée à l'aspergillose reste élevée, même lors de l'administration d'un traitement antifongique. Par ailleurs, la seule molécule antifongique utilisée dans les logements

d'élevage avicole (énilconazole) n'a pas d'autorisation de mise sur le marché pour l'emploi chez les oiseaux. Chez l'homme, l'augmentation constante du nombre de patients réfractaires au traitement antifongique avec un pronostic fatal a incité la communauté scientifique à développer des modèles d'infection chez les mammifères (souris) afin d'étudier les réactions immunitaires suite à l'infection par *Aspergillus fumigatus*.

Toutefois, l'immunité anti-infectieuse développée lors de l'invasion de l'appareil respiratoire par *A. fumigatus* est encore mal connue, et on ne connaît pas les analogies entre les modèles mammifères et oiseaux lors de l'infection de l'appareil respiratoire. Notre projet est d'effectuer une étude comparative de l'aspergillose respiratoire pour identifier des cibles communes pour le traitement et/ou la prévention de la maladie.

Objectifs du projet

1. Adapter la dose infectieuse d'*A. fumigatus* par inoculation intratrachéale chez la dinde en comparant des protocoles d'inoculations unique et répétées.

2. Décrire la réponse immunitaire anti-infectieuse locale (poumon) dues au développement d'une aspergillose pulmonaire invasive (aigüe) chez la dinde.

3. Décrire la réponse immunitaire anti-infectieuse locale (poumon) dues au développement d'une aspergillose pulmonaire invasive (aigüe) chez la souris immunodéprimée, comparer la réponse immunitaire lors de l'infection aspergillaire pulmonaire entre le modèle murin et le modèle aviaire.

A la fin de l'expérience, tous les animaux seront sacrifiés et prélevés afin de quantifier la charge aspergillaire dans les organes atteints.

Le nombre minimal est de 7 animaux par lot. Pour l'ensemble du projet, 15 groupes seront testés et 3 procédures seront réalisées, ce qui représente 21 (procédure 1) et 42 (procédure 2) dindonneaux et 42 souris (procédure 3).

Les lots d'oiseaux et de souris seront maintenus dans des hébergements confinés de type A3. L'entretien des animaux sera quotidien et répondra aux besoins spécifiques des animaux par rapport à leur âge : accès à l'aliment et à l'eau, hygiène (renouvellement des aliments, de l'eau et de la litière), contrôle de la température et de la photopériode, hébergement en groupes. L'étude de la réponse immunitaire locale dans un organe rend indispensable le recours à des modèles animaux. Les animaux seront suivis tous les jours tout au long du protocole expérimental, et l'application du décret 2013-118 et du principe des 3Rs pour le bien-être animal seront respectés dans le but de limiter leur souffrance, notamment en cas de l'apparition de signes cliniques trop sévères (ex. difficulté respiratoire et prostration) qui conduiraient à une euthanasie compassionnelle.

1165. L'objectif général du projet est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de la douleur. Pour ce faire, nous nous intéressons aux neurones présents dans les ganglions rachidiens qui génèrent les influx nerveux signalant la douleur. Les expériences sont effectuées chez la souris.

Les neurones des ganglions rachidiens sont les senseurs des signaux douloureux, et les envoient dans la moelle épinière où d'autres neurones relaient l'information vers le cerveau. Les neurones communiquent entre eux par des signaux chimiques, et les neurones des ganglions rachidiens et ceux de la moelle utilisent parfois les mêmes molécules pour communiquer. Afin d'étudier spécifiquement le rôle des neurones des ganglions rachidiens vs. ceux de la moelle, il est important de pouvoir les cibler différenciellement. Ce projet propose de contrôler l'expression de molécules nécessaires à la neurotransmission spécifiquement dans les ganglions rachidiens afin d'évaluer leur rôle dans la transmission de la douleur et dans l'effet d'analgésiques, en particulier cholinergiques.

Notre projet utilisera des expériences de comportement, et des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* et *in vitro*. Au total, le projet utilisera jusqu'à 720 souris pour les cinq années du projet. La règle des 3R, qui vise à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, ainsi qu'à raffiner les approches expérimentales et à remplacer, quand cela est possible, les expériences utilisant des animaux par des expériences n'en utilisant pas, a été prise en compte dans l'élaboration des procédures. Ces expériences seront effectuées sur des souris contrôles ou génétiquement modifiées ; nous utiliserons également un modèle de douleur neuropathique afin d'étudier la plasticité du système cholinergique dans cette situation, et les possibilités de le stimuler pour soulager les douleurs.

Allant au delà de l'amélioration de notre compréhension de l'analgésie cholinergique, notre projet va élucider une partie de la microcircuiterie neuronale impliquée dans la sensibilité à la douleur, et apporter une nouvelle lumière sur le mode d'action d'analgésiques classiques. Notre projet devrait ainsi contribuer à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de la douleur chronique.

1166. Chez les oiseaux, au moment de la formation de l'oeuf, l'organisme maternel va transférer plus ou moins d'hormones stéroïdiennes dans le jaune. De grandes différences dans les contenus en hormones peuvent être observées au sein d'une même espèce en fonction de l'environnement rencontré par la mère ou en fonction de ses propres caractéristiques (ex: l'âge). Chez les espèces nidifuges et domestiques il a été montré que ces concentrations en hormones dans les oeufs influencent la croissance des jeunes mais également la construction de leur phénotype comportemental. La motivation à interagir avec des congénères, la réactivité face à la nouveauté ou face à l'homme sont autant de caractéristiques qui peuvent être modulées avant l'éclosion par la concentration en hormones d'origine maternelle. Ces comportements conditionnent grandement les capacités des oiseaux à s'adapter aux conditions d'élevage, il apparaît donc important de mieux comprendre leur construction. L'objectif de ce projet sera de mieux comprendre dans quelle mesure l'environnement hormonal prénatal peut orienter la construction des comportements socio-émotionnels. Nous étudierons également les conséquences de cet environnement prénatal sur les capacités d'apprentissage. Nous analyserons également les conséquences neurobiologiques à l'aide de

marqueurs de plasticité cérébrale. L'effectif de 100 cailles a été défini sur la base de travaux préliminaires. Cet effectif permet de s'assurer de la fiabilité des tests statistiques (puissance de tests) tout en limitant le nombre d'animaux utilisés.

Nous caractériserons le comportement de jeunes cailles japonaises issues de lignées sélectionnées de manière divergente sur la base de la concentration en testostérone dans les œufs. Nous utiliserons 50 cailles de la lignée dite haute, et 50 cailles de la lignée dite basse. Des tests non-invasifs consistant à observer l'animal seront utilisés. Les observations seront réalisées les 6 premières semaines de vie. 15 cailles de chaque lignée (total = 30) seront sacrifiées pour l'étude de la plasticité cérébrale.

1167. Dans le contexte du changement climatique et de la nécessité d'économiser les ressources énergétiques en élevage, nous étudions différentes stratégies pour limiter ces coûts tout en augmentant la robustesse des animaux domestiques. Une technique pour réaliser ces deux objectifs en production avicole est la modification des paramètres d'incubation des œufs, qui sont actuellement constants en pratique. Ceci ne reflète pas la diversité des conditions de température vécues par l'œuf lors d'une couvaison en extérieur, qui pourrait faciliter l'adaptation ultérieure de l'oiseau à des conditions climatiques variables. Notre stratégie est d'améliorer dès l'incubation des œufs la résistance ultérieure des poulets aux fluctuations de températures (notamment au froid) tout en améliorant la durabilité de l'élevage. Notre stratégie est de moduler dans l'incubateur les mécanismes de thermorégulation des volailles pour améliorer leur résistance ultérieure aux fluctuations de leur environnement thermique ou à des températures d'élevage plus fraîches, tout améliorant la durabilité de l'élevage.

Deux études sont prévues, la première pour déterminer les conditions favorables de températures plus fraîches d'incubation des œufs et de démarrage des poussins qui garantissent l'éclosabilité, le taux d'éclosion, le bien-être et le bon développement des poulets. Cette étude permettra également de déterminer les mécanismes métaboliques mis en jeu dans la tolérance à des températures d'élevage plus fraîches. En effet, il est parfois difficile de stabiliser dans les bâtiments la température élevée préconisée de 33°C au démarrage. La seconde expérimentation vise à l'évaluation multicritère de variations de températures d'incubation en fonction de la température de démarrage des poussins, conditions choisies à partir de la première expérience. Deux répétitions sont prévues, l'une en fin de printemps, l'autre en fin d'automne, pour prendre en compte les variations saisonnières de température extérieure qui conditionneront dont dépendent les dépenses de chauffage, coûts énergétiques de l'élevage. Nous mettrons au total en incubation 2400 œufs provenant d'un élevage commercial de lignée (Ross). Les études seront menées chacune sur 1200 œufs puis respectivement 576 et 832 poulets en élevage au total. Dans la première expérience, trois procédures seront appliquées, à savoir un élevage en cages individuelles, une exposition à des températures fraîches et des prises de sang. Nous soumettrons 384 poussins à des conditions d'élevage, en continu ou de manière cyclique, de 5°C plus basse au démarrage que la température habituelle de 33°C. Dans cette première expérimentation sur animaux élevés en cages, nous réaliserons des prises de sang sur un total de 120 animaux mâles à l'éclosion et à 24 jours, en réduisant respectivement le nombre d'animaux prélevés à 10 poulets/traitement à chacun des deux âges. Ces nombres d'animaux sont nécessaires et suffisants pour pouvoir tirer des conclusions significatives en tenant compte de nos expériences précédentes et de la variabilité interindividuelle attendue pour nos analyses (Réduire) biochimiques et moléculaires. Dans la deuxième expérimentation au sol portant sur l'analyse multicritère de la combinaison des effets de variations de la température d'incubation et des conditions d'élevage au démarrage, l'unique procédure utilisée sera l'exposition à une température plus fraîche au démarrage de 416 poussins élevés au sol. La question biologique posée sur la nature de la capacité adaptative d'un animal à s'adapter à des variations de température ambiante nécessite l'utilisation d'animaux vivants et exclut la possibilité de réaliser ces expériences sur lignées cellulaires pour Remplacer l'utilisation d'animaux. Les procédures seront interrompues en cas d'atteinte des points limite définis (Raffiner) pour ces études.

1168. La dourine est une maladie sexuellement transmissible des équidés causée par le parasite *Trypanosoma equiperdum*. Les multiples signes cliniques de cette maladie incluent : fièvre, œdèmes, éruptions cutanées, incoordination motrice, anémie, cachexie... Bien que certains animaux puissent présenter des guérisons spontanées, cette infection se termine dans 50 % des cas par le décès de l'animal. A ce jour, la dourine n'est pas reconnue par l'OIE (Organisation mondiale de la santé animale) comme étant curable et l'organisation préconise qu'un animal atteint soit euthanasié. L'Europe est indemne de dourine à l'exception de l'Italie où plusieurs épisodes ont été observés dont une épidémie notable en 2011.

T. equiperdum, est très proche du parasite *Trypanosoma evansi*, l'agent infectieux du surra (maladie transmise par des insectes piqueurs atteignant de nombreuses espèces). Cette similitude est telle que de nombreux scientifiques remettent en cause la pertinence de différencier ces deux parasites. La question de cette différenciation est extrêmement importante du point de vue sanitaire, puisque contrairement à la dourine, le surra est reconnu officiellement comme curable. Des études ont montré l'efficacité du traitement du surra contre *T. equiperdum*, permettant la disparition des symptômes chez des chevaux atteints. Toutefois, les autorités internationales excluent l'officialisation de ce traitement, tant que sa capacité à éliminer *T. equiperdum* de l'ensemble de l'animal et en particulier du liquide céphalo-rachidien (LCR) n'aura pas été démontrée. C'est pourquoi, ce protocole vise à déterminer si ce traitement du surra permet une élimination totale des *T. equiperdum*. Dans l'hypothèse où nous confirmerions l'élimination complète du parasite, nos résultats permettraient une révision du code terrestre de l'OIE évitant l'euthanasie des animaux atteints de dourine.

Lors de ce protocole, 12 ponettes seront infectées par *T. equiperdum*. Après apparition des symptômes, un traitement antiparasitaire sera administré à au moins 5 d'entre elles. L'efficacité du traitement sera évaluée cliniquement puis le cas échéant, un traitement immunodépresseur sera utilisé pour permettre l'éventuelle réémergence de parasites ayant échappé au traitement. A l'issue du protocole, tous les animaux seront euthanasiés et une recherche de parasites sera effectuée dans le LCR et différents tissus.

Remplacement : la dourine étant une maladie exclusivement équine pour laquelle il n'existe pas de modèle expérimental alternatif, l'utilisation d'un autre modèle ne permettrait pas de répondre à l'objectif du protocole.

Réduction : le nombre d'animaux par lot a été déterminé de manière à répondre aux exigences émises par la Pharmacopée européenne, quant au nombre d'animaux requis pour les tests d'efficacité de produits pharmaceutiques, tout en gardant un nombre d'animaux aussi limité que possible.

Raffinement : pour leur bien-être, les animaux seront hébergés sur paille avec zone de couchage et zone d'exercice ; les groupes sociaux seront préservés. Leur état général sera évalué au moins deux fois par jour et les souffrances, seront évaluées avec une fiche de suivi spécifique. A n'importe quelle étape du protocole les animaux pourront être euthanasiés s'ils répondent aux critères d'exclusion définis.

Une formation au prélèvement de liquide céphalorachidien échoguidé sera réalisée par tutorat sur une ponette autre que celle utilisée dans la procédure d'infection. Le nombre total d'animaux utilisé dans ce projet sera donc de 13.

1169. La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus couteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après l'étude multicentrique STAR*D, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement. En outre, les patients rétablis à la suite d'un premier épisode dépressif présentent un risque de récurrence dans les 6 mois évalué à 50% en cas d'arrêt du traitement et il a été montré qu'en l'absence de traitement 15% des patients succombent à la suite d'un suicide et qu'entre 60% et 80% des suicides (entre 10000 et 15000 par an en France) sont le fait d'individus fortement dépressifs. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements et la compréhension des mécanismes physiopathologiques et étiopathologiques sous-jacents. Certains de ces mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant l'utilisation de techniques d'immunohistochimie par exemple.

Une restriction pour les recherches précliniques qui veulent étudier le mécanisme d'action des antidépresseurs (ADs) chez l'animal est qu'elles sont surtout réalisées chez des animaux normaux, qui ne sont pas dans un état « dépressif-like » (similaire à un état dépressif ou « depressed-like state »). Or les traitements aux antidépresseurs induisent très peu d'effets chez l'homme sain. Ces études ont été une première étape pour définir le spectre des actions possibles des ADs mais demeurent limitées pour déterminer les effets qui sont réellement nécessaires à l'action thérapeutique. C'est la raison pour laquelle nos travaux se basent sur l'utilisation du modèle du stress chronique léger imprédictible (SCI). Il s'agit d'un protocole initialement développé par Willner et al. (1987) que nous utilisons au laboratoire. De façon intéressante, il s'agit du seul modèle pour lequel il existe une signature moléculaire commune entre la dépression humaine et celle existant après stress chronique imprédictible chez la souris. Ce modèle de stress chronique imprédictible a également été validé pharmacologiquement, et semble le mieux adapté et le plus pertinent pour étudier la pathophysiologie de la dépression et le mécanisme d'action des ADs.

Le but de cette expérience est d'évaluer les effets d'un stress chronique sur l'expression de MKP-1 dans le cortex cingulaire. En effet, cette protéine est parfois associée aux états dépressifs et le cortex cingulaire antérieur est l'une des régions cérébrales les plus fortement associées aux états dépressifs. Nous envisageons donc d'exposer des souris à un stress chronique, de prélever le cortex cingulaire antérieur pour effectuer ensuite des dosages biochimiques. D'autres zones du cerveau seront aussi prélevées dans un but comparatif. Il s'agit en particulier de l'hippocampe, de l'amygdale et de la région de l'habenula, car ces trois zones sont impliquées dans les états dépressifs.

Pour cette expérience, 30 souris réparties en 2 lots sont requises.

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

Raffinement : les stress appliqués aux animaux peuvent être qualifiés de léger à moyen, sans stress physique de type nociceptif. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chronique chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire in vitro n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=15 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

1170. Chlamydia trachomatis est une bactérie responsable d'infections génitales et oculaires qui représentent un problème majeur de santé publique. En effet, cette infection est la première maladie bactérienne sexuellement transmissible dans les pays industrialisés, avec une prévalence estimée entre 2 et 10 % chez les sujets jeunes. Chlamydia trachomatis est le principal agent responsable des urétrites chez l'homme et des cervicites chez la femme. La rectite à Chlamydia trachomatis est un diagnostic fréquemment retrouvé chez les patients ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes. Elle correspond à la phase primaire de la lymphogranulomatose vénérienne, une maladie systémique grave aux complications sévères, en recrudescence ces dernières années. De nombreuses complications graves ont également été rapportées chez la femme jeune,

avec des conséquences sur la fertilité et un risque de stérilité. Non-traitées, les infections génitales à *Chlamydia trachomatis* augmentent le risque de transmission du Virus de l'Immunodéficience Humaine et des autres infections sexuellement transmissibles. Cette bactérie est également responsable du trachome, une maladie oculaire connue depuis l'Antiquité, qui est la première cause de cécité dans le monde.

La fréquence élevée du portage asymptomatique et son risque de transmission à « bas bruit », associés aux conséquences graves de l'infection sur la fertilité, la vision et la transmission du VIH, rendent capitale l'évaluation de stratégies préventives afin de protéger les populations à risque et ainsi de limiter la propagation de cet agent pathogène chez les sujets jeunes les plus fortement exposés.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'immunogénicité et l'efficacité de nouvelles stratégies vaccinales ainsi que de développer une nouvelle approche de prophylaxie médicamenteuse chez un modèle de primate non humain. L'efficacité préventive de ces nouvelles stratégies sera évaluée dans des modèles expérimentaux d'infections génitales et oculaires à *Chlamydia trachomatis* utilisant des souches bactériennes impliquées en pathologie humaine. Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche européen dont l'objectif est d'améliorer les connaissances scientifiques dans le domaine de la vaccinologie pour développer une nouvelle génération de vaccins plus efficaces. Les résultats de ce projet pourraient conduire à la mise en place d'essais cliniques.

Le primate non humain choisi pour ce projet est le modèle le plus pertinent pour corrélérer les données d'immunogénicité et d'efficacité à ceux qui seront obtenus chez l'Homme et, pour évaluer l'efficacité d'une prophylaxie médicamenteuse dans des conditions métaboliques proches de l'homme.

Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour permettre l'interprétation des résultats. Le projet prévoit d'utiliser au maximum 120 animaux nés et élevés dans des élevages reconnus.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administration vaccinale et médicamenteuse / prélèvements / inoculations bactériennes sous anesthésie, limitation des volumes prélevés). Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition de signes inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

1171. La fragmentation des habitats naturels est une des causes majeures de perte de biodiversité de nos jours, provoquée par l'accroissement continu des réseaux routiers. En séparant les individus les uns des autres, les routes affectent le bon déroulement de la reproduction et le maintien de flux génétiques, indispensables à la survie de la population. Chez le hamster d'Europe (*Cricetus cricetus*) en particulier, un déclin des populations est observé depuis les années 1970 en Europe de l'Ouest et s'étend aujourd'hui à toute son aire de répartition jusqu'en Ukraine. Des mesures de protection en Europe de l'Ouest n'ont pas suffi à enrayer ce déclin. Parmi les causes évoquées du déclin, la fragmentation de l'habitat du hamster d'Europe est une cause majeure, modifiant l'habitat de l'espèce et déconnectant les populations et les individus les uns des autres.

La mise en place de corridors (passages à faunes) connectant les différents habitats permet de reconnecter les populations de différentes espèces et ainsi d'éviter l'impact de la fragmentation sur la diversité génétique des populations. Toutefois, les corridors étant des « passages toute faune », il a été démontré que la prédation au niveau des passages nuisait gravement aux populations de micromammifères. Afin de pouvoir limiter la prédation au niveau de ces passages, notamment sur le Grand Hamster d'Europe, il est nécessaire de mettre en place des systèmes anti-prédation à l'intérieur des passages à faune.

Dans ce projet, nous allons déterminer quelles structures anti-prédations sont les plus efficaces. Pour cela, nous allons évaluer le comportement des hamsters face à des passages à faunes avec installation de dispositifs anti-prédation de différents formats et dans différentes conditions (présence/absence de : pression de prédation, d'autres micromammifères, d'aliments appétants de l'autre côté etc.). 14 hamsters seront utilisés dans le cadre de ce projet la première année, plus leur descendance estimée à 100 animaux, dont 30 seront étudiés lors des années suivantes. Tous feront l'objet d'un suivi non-invasif et conservés jusqu'à leur mort naturelle.

Concernant la recommandation des 3 R. Cette étude comportementale ayant spécifiquement pour objet la protection d'une espèce, le Grand Hamster, en danger d'extinction en France, il n'était pas possible d'envisager un modèle de substitution. Toutefois, les individus utilisés sont tous nés en captivité, les effectifs engagés pour les tests comportementaux, en condition contrôlé au laboratoire ou relâchés dans un grand enclos collectif, ont été ajustés au minimum requis pour les statistiques.

Concernant les animaux étudiés en captivité des alternatives de raffinement ont été mises en place, comme l'enrichissement des cages ou des manipulations limitant au maximum le stress, ceci afin d'améliorer le bien-être des animaux expérimentés. En ce qui concerne les individus relâchés, l'objectif est de limiter au maximum les interventions humaines en fréquence et durée grâce à l'utilisation de dispositifs de suivi automatisé (identification automatisée, caméras et pièges photos infrarouges). Dans la même logique, les rares interventions humaines seront limitées à la période diurne, c'est-à-dire la période d'inactivité et de repos dans le terrier, l'espèce étant crépusculaire/nocturne.

1172. 1-Objectifs :

Nos études visent à déterminer comment les hormones thyroïdiennes (HT) et leurs récepteurs nucléaires TR sont impliqués dans la régulation de la balance énergétique aussi bien en situation normale qu'en cas de stress métaboliques (le froid, le stress alimentaire, mais surtout en réponse à des excès de calories). Nous utilisons des souris génétiquement modifiées pour étudier l'effet de l'absence de l'un ou l'autre des deux récepteurs des HT, dans un ou plusieurs tissus de l'organisme, sur le développement par ces animaux de maladies métaboliques comme le diabète, l'obésité, ou l'athérosclérose. Plus récemment

nous nous sommes intéressés à la régulation des processus inflammatoires impliqués dans l'athérosclérose et qui sont modifiés en absence du récepteur TR α .

2-Retombées attendues :

Les HT ont la capacité chez la souris et chez l'homme d'augmenter la dépense énergétique et d'entraîner une perte de poids. Malheureusement ces hormones ne peuvent pas être utilisées chez l'homme à cette fin à cause de leurs effets secondaires en particulier sur le système cardiaque. Notre approche a pour but de trouver dans quel tissu et par quels mécanismes les HT stimulent la balance énergétique. L'idée sous-jacente étant qu'avec les progrès de la pharmacologie de nouvelles molécules pourraient être générées qui ne stimulent que les activités métaboliquement bénéfiques des HT.

3-Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement.

Nos études sont avant tout des études de paramètres physiologiques, dans lesquelles nous évaluons la réponse globale de l'organisme en réponse à des mutations ciblées. Le maintien de la balance énergétique fait intervenir de nombreux organes comme le cerveau, le foie, les tissus adipeux blancs et brun ou le muscle, qui doivent dialoguer entre eux. Les paramètres mesurés comme la composition corporelle, la glycémie, l'insulinémie, sont une résultante de l'activité de ces différents organes. Pour l'ensemble de ces études il est impossible de se passer du modèle animal vivant. Pour les études mécanistiques nous utilisons autant que possible des modèles in-vitro mais nous serons aussi amenés à utiliser des cellules en culture dérivées des animaux génétiquement modifiés (limitant quand même de ce fait le nombre d'animaux utilisés). Autant que faire se peut les différentes procédures sous un régime alimentaire ou à une température particulière sont réalisées de façon séquentielle sur les mêmes lots d'animaux, si elles ne sont pas incompatibles pour limiter le nombre total d'animaux utilisés. Une période de récupération est prévue entre les différentes expérimentations pour limiter la souffrance des animaux. Pour l'ensemble des procédures les animaux sont observés quotidiennement, en cas de souffrance les mesures adéquates sont prises (traitement, retrait du protocole, sacrifice). Le nombre minimal d'individus nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement significatifs est utilisé.

4-Nombre total d'animaux inclus dans ce projet.

L'ensemble de ce projet utilisera 4115 souris.

1173. A ce jour, la dynamique et l'organisation des voies d'endocytose ont été principalement étudiées dans des systèmes modèles réductionnistes comme des cultures de cellules et d'organes. Bien que ces modèles expérimentaux aient permis d'élucider les mécanismes d'endocytose au niveau moléculaire, notre compréhension de la régulation et du rôle des mécanismes d'endocytose in vivo est limitée. Récemment, les progrès de la microscopie intravitale ont permis d'étendre l'imagerie d'animaux vivants vers l'observation des structures sub-cellulaires, révélant ainsi de nouveaux aspects des mécanismes moléculaires régulant le trafic membranaire qui n'ont pas été appréciés à leur juste valeur in vitro. Dans ce projet, nous allons utiliser la microscopie intravitale pour étudier la dynamique des puits et des plaques recouverts de clathrine. Ce projet fera usage de vecteurs « Adeno-associated virus » (AAV) exprimant des protéines marqueurs fluorescentes qui seront directement injectés dans des souris afin d'analyser la dynamique in vivo.

L'endocytose joue un rôle capital dans les fonctions métaboliques et catabolique du foie et cette étude ouvrira donc la voie dans le futur à l'analyse des capacités d'endocytose dans des conditions pathologiques tels que la déprivation en nutriment, l'exposition à l'alcool, la régénération hépatique, les hépatocarcinomes.

Ce projet vise à comprendre la dynamique de formation et de régulation de l'assemblage des puits recouverts de clathrine puits recouverts de clathrine (PRCs) et des plaques de clathrine in vivo dans deux tissus, le muscle et le foie de souris. Nous allons tester la dynamique des puits et des plaques directement dans le muscle et le foie de souris. Nous allons utiliser des vecteurs AAV déjà produits au laboratoire (AAV-AP2mCherry) permettant de suivre AP2 in vivo par des expériences de microscopie bi-photonique directement sur les muscles et le foie.

L'entretien des animaux et les expériences seront réalisés par un personnel titulaire des autorisations et formations nécessaires. Les animaux seront observés quotidiennement par l'animalier en charge de la lignée ou par les personnes en charge des protocoles. L'utilisation de vecteurs viraux de type AAV n'entraîne pas de douleurs et donc de mise en place de traitement particulier pour y palier. Pour tous les projets, des modifications importantes de comportement laissant supposer une douleur excessive (retrait ou vocalisation excessive à la manipulation, prostration ou agitation anormale) seront considérées comme critères d'arrêt et conduira à l'euthanasie des animaux concernés par dislocation cervicale. Des études précédentes sur nos différents projets ont permis de déterminer le nombre minimum de souris à utiliser afin d'évaluer de façon correcte les paramètres observés (entre 6 à 8 souris par groupes expérimentaux). Les analyses statistiques sur les paramètres mesurés sur ces groupes de petite taille sera réalisée par un test non paramétrique de type Mann-Whitney. L'ensemble de ces projets nécessite l'utilisation de 80 souris C56BL/6 sauvages dans la procédure expérimentale pour les 2 ans du projet.

1174. Les maladies du système nerveux (Parkinson, Alzheimer, Huntington, Autisme...) sont une préoccupation croissante en santé publique. De nouveaux outils diagnostiques associés à de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires pour améliorer la prise en charge des patients. Les modèles animaux sont des outils précieux et pertinents dans le développement de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques.

L'objectif de ce projet est de valider de nouvelles méthodologies non invasives en imagerie (Imagerie par Résonance Magnétique et Tomographie à Emission de Positons) et en neurochirurgie pour la modélisation et le traitement des pathologies du système nerveux. Le bénéfice de ces études est d'intégrer dans les projets de développement préclinique un arsenal d'outils expérimentaux permettant de raffiner les modèles, d'utiliser moins d'animaux et de développer des méthodes

alternatives. Au-delà du bénéfice pour les projets précliniques, ces nouveaux outils technologiques en imagerie et biologie moléculaire pourront trouver une application clinique et améliorer à terme la prise en charge des patients.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages agréés et sont nés et élevés en captivité. Le projet prévoit l'utilisation de 800 rongeurs et de 20 primates non humains. Leur nombre a été réduit au maximum afin d'obtenir des données suffisantes pour valider les nouvelles méthodologies sous différentes conditions. Le recours à l'animal est nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau en particulier les interactions structurelles et fonctionnelles de ces cellules.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir au bien-être des animaux.

1175. Chaque année des nouveaux stagiaires, étudiants, techniciens et chercheurs deviennent utilisateurs de notre plateforme d'expérimentation animale sur les souris. Nous voulons proposer à ces utilisateurs une formation leur permettant de pouvoir acquérir les gestes techniques de bases en expérimentation sur la souris en fonction de leurs besoins (contentions des animaux sans stress, injections, prélèvements sanguins, anesthésie, mise à mort, autopsie). Cette formation a lieu en présence d'un formateur compétent et titulaire du Niveau 1 ou 2 en expérimentation animale. Elle aura lieu sur une demi-journée (3 heures).

Cette formation de base est indispensable pour permettre aux utilisateurs de la plateforme de maîtriser les gestes techniques qu'ils seront amenés à réaliser dans le cadre des protocoles qu'ils devront mettre en œuvre. L'utilisation d'animaux est donc indispensable.

Le nombre de souris utilisées (N=10/personne) dans la procédure expérimentale associée à ce projet est réduite au maximum tout en permettant la répétition des actes expérimentaux sans pour autant mettre en péril le bien être de l'animal. Les gestes expérimentaux proposés sont tous d'une classe de gravité légère dans la mesure où ils sont bien maîtrisés. Des points limites prédictifs d'un échec de la maîtrise du geste ont été définis afin d'éviter toute souffrance de l'animal. Si ces points limites sont atteints, cela conduira à sa mise à mort immédiate par le formateur. Les gestes techniques le justifiant seront réalisés sous anesthésie. Les souris utilisées dans ces procédures sont toutes des souris de réforme adultes, produites en élevage au sein de notre plateforme et non incluses dans des projets (génotype non relevant ou sexe non compatible avec le projet). Les animaux retenus pour cette formation ne présenteront pas de phénotype délétère.

Nombre d'animaux

3000 souris sur cinq ans pour une prévision de 60 personnes formées par an.

1176. La radiothérapie des tumeurs solides est localisée avec une recherche de la conformation du dépôt de dose au volume tumoral. Cependant des observations cliniques ont montré des régressions tumorales à distance du champ d'irradiation. Le vecteur de cette efficacité n'est pour l'heure pas mis en évidence. L'implication du système immunitaire est cependant suspectée. En effet, la radiothérapie peut induire une réponse immunitaire. Cependant, les tumeurs peuvent réorienter l'activité du système immunitaire et développer de voies de résistance.

Certaines voies de signalisation sont impliquées dans l'échappement immunitaire de tumeurs murines et humaines en induisant l'inactivation du système immunitaire. En bloquant ces voies de signalisation, il serait alors possible de rétablir ou d'augmenter l'immunisation induite par l'irradiation et donc l'efficacité du traitement. Ce projet vise à associer un ciblage de ces voies de signalisation à la radiothérapie localisée, pour augmenter l'effet thérapeutique, y inclus à distance du champ d'irradiation. Le type d'interaction évalué est complexe et inclus le rôle de la tumeur, du système immunitaire et du micro environnement tumoral. Il n'existe pas de modèle in vitro permettant une telle étude. Le projet nécessite donc d'être mené sur un organisme vivant disposant d'un système immunitaire.

Pour mener à bien ce projet et avoir une idée correcte du potentiel en thérapeutique humaine de cette approche thérapeutique, 390 souris seront nécessaire à son évaluation. Cette estimation se base sur des analyses statistiques qui permettent de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans cette étude.

Cette approche pourra notamment améliorer la réponse de métastases loin du site de traitement.

1177. La fibrose est la conséquence de mécanismes, de réparation tissulaire et de réactions inflammatoires, chroniques et non résolus. Elle est caractérisée par une augmentation du dépôt de protéines matricielles qui désorganisent l'architecture des organes touchés. Dans les pays développés, il est estimé que 45% de la mortalité pouvait être associée à des pathologies ayant une composante fibrotique.

La fibrose hépatique est une résultante commune aux pathologies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine virale (hépatite C), parasitaire, biliaire ou consécutive à une stéatohépatite alcoolique (ASH) ou non alcoolique (NASH) et même d'origine auto immune. La progression de la fibrose hépatique conduit à terme à la cirrhose, source de morbidité et de mortalité élevées.

A ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement spécifique de la fibrose hépatique. L'objectif de ce projet est de démontrer l'efficacité thérapeutique de molécules dans la prévention et le traitement de la fibrose hépatique, et ainsi de pouvoir proposer à terme de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les pathologies fibrotiques dont la prise en charge représente des enjeux majeurs de santé publique.

Actuellement, aucun des modèles de rongeurs disponibles, ne reproduit fidèlement la physiopathologie humaine de la fibrose. Son induction pouvant être réalisée par voie chimique, alimentaire, infectieuse ou génétique. Les procédures expérimentales présentées ici font partie d'un large programme d'évaluation de nouvelles molécules ayant pour objectif de combattre les

maladies autoimmunes par une voie originale. Parmi toutes les pathologies auxquelles nous nous intéressons, certaines produiront une atteinte hépatique, lie du développement de la fibrose à l'origine de certaines formes de cirrhose ou d'hépatocarcinomes. Nous focaliserons donc ici nos travaux sur la composante Fibrose qui est associée à ces pathologies, quelqu'en soit son origine, le processus inflammatoire qui l'initie peut être combattu.

L'évaluation de l'efficacité de nos produits sur le paramètre fibrose sera réalisée dans un modèle de rongeurs chez qui ce trouble est induit chimiquement, les variantes des procédures expérimentales proposées permettront de mieux cerner les propriétés préventive ou protectrices des produit ou au contraire de mettre en avant une activité dite curative

L'évaluation de molécules d'intérêt pour le traitement de la fibrose hépatique sera réalisée au cours de la durée couverte par ce projet avec 2280 souris.

Une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3 R's. L'évaluation finale du potentiel thérapeutique des produits dans des modèles animaux reste cependant nécessaire. En effet, l'administration des composés dans le contexte d'un animal entier permet d'évaluer la réelle efficacité des composés dans un système biologique complexe et « global ». La fibrose hépatique est une pathologie complexe, chronique et de longue durée dans sa genèse et son développement, et la pertinence thérapeutique de nouvelles molécules est difficilement caractérisable autrement qu'avec des animaux.

Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle du raffinement, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal.

Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant.

1178. L'hépatite autoimmune (AIH) est une maladie chronique progressive du foie dont l'étiologie est aujourd'hui inconnue. Au cours de cette maladie hépatique évolutive on peut voir apparaître des signes cliniques divers allant de l'hépatite chronique modérée à l'insuffisance hépatique aigüe ou hépatite fulminante. Cette maladie évolue fréquemment en cirrhose et dans certains cas en hépatocarcinomes. Elle accompagne souvent d'autres maladies autoimmunes chez les patients qui en sont atteints. Elle est caractérisée par la présence d'autoanticorps spécifiques qui vont permettre de distinguer les deux classes de la maladie : AIH type I et AIH type II.

En dépit des pauvres connaissances sur l'AIH, les thérapies utilisées font appel à l'utilisation d'immunosuppresseurs dont les nombreux effets secondaires délétères sont relevés chez les patients. Il est nécessaire pour améliorer le confort des patients de développer des stratégies thérapeutiques alternatives aboutissant à une immunomodulation pour enrayer le processus inflammatoire chronique et cytotoxique qui détruit progressivement la fonction hépatique.

Le projet présenté ici fait appel à des modèles animaux de AIH, chez lesquels la pathologie est volontairement induite et qui permettent de cibler spécifiquement une voie de différenciation de cellules inflammatoires et de la neutraliser.

Ce programme utilisant des animaux qui permet d'étudier le processus complexe de protection via l'immunomodulation, s'insère dans un programme complet de découverte de médicaments dont l'objectif est la mise sur le marché de nouvelles molécules ayant des effets thérapeutiques.

Nous choisirons de focaliser l'essentiel de nos travaux lors de la phase précoce et d'utiliser un modèle permettant de développer notre stratégie d'immuno-modulation qui retardera les effets délétères bien avant que les animaux n'entrent dans une phase très sévère de la maladie.

Cette stratégie nous permet de définir préalablement des points limites éthiquement et scientifiquement acceptables, en tenant compte des objectifs de l'étude.

Ce projet engagera des souris dans un nombre estimé à 3280 unités pour la durée que couvrira ce projet. Le nombre d'animaux utilisé dans chaque lot de chaque procédure est réduit, il correspond au seuil minimal qui puisse nous permettre d'apprécier avec nos moyens techniques et en fonction de la variabilité inter-individus les effets désirés.

A terme nos travaux pourraient ouvrir de nouvelles voies de traitement de certaines formes de maladies auto-immunes, aujourd'hui ce besoin médical est clairement établi.

1179. Prendre des décisions dans des environnements complexes et changeants requiert une constante vérification des résultats de nos choix et une grande flexibilité pour les organiser et les modifier dès que nécessaire. Pour être effectifs, les choix doivent être contrôlés. Ce contrôle est désigné sous le vocable "contrôle cognitif". Une propriété importante du contrôle cognitif est son adaptabilité aux besoins de chaque situation. Ceci est particulièrement évident lorsque l'on compare des situations simples de décision avec peu de contrôle (e.g. choisir le carburant pour sa voiture) et des situations complexes (e.g. choisir quelle nouvelle voiture acheter).

Des altérations du contrôle cognitif sont observées dans différentes pathologies, en particulier psychiatriques, telles que la dépression, la schizophrénie, la maladie de Parkinson, les addictions. Ces pathologies sont caractérisées par des troubles de la décision et de l'adaptation (déficit de motivation à prendre des décisions, évaluations négatives, troubles dans l'ordonnancement des choix, troubles pour inhiber des actions mêmes lorsqu'elles ont une issue négative). Le contrôle cognitif est mis en place en particulier grâce au cortex préfrontal (CPF) et au cortex cingulaire antérieur (CCA), deux régions corticales particulièrement développées chez les primates. Ces deux régions anatomiquement proches l'une de l'autre, semblent

permettre la régulation du niveau de contrôle en fonction des situations, mais la réalisation du contrôle (choisir une réponse, sélectionner des cibles dans l'environnement ou en mémoire, etc.) prend sa source dans des relations à plus grande échelle avec des régions anatomiquement plus lointaines (plus en arrière du cerveau). Les hypothèses actuelles suggèrent que la régulation du niveau de contrôle dépende de relations entre le CPF/ACC et des systèmes dits neuromodulateurs impliquant des molécules telles que la dopamine et la sérotonine qui modifieraient les modes de fonctionnement des neurones de ces mêmes régions. Ces molécules sont d'ailleurs clairement impliquées dans les pathologies suscitées.

La réalisation des comportements les plus complexes serait donc dépendante de réseaux neuronaux à courte et longue distances, et sous l'influence régulatrice de neuromodulateurs. Ces relations multiples sont actuellement très mal comprises car la complexité de ce système est grande, impliquant plusieurs niveaux d'interactions. Cette complexité de nature est d'ailleurs à l'origine de l'ubiquité des altérations pathologiques chez l'Homme.

Les objectifs du présent projet sont i) de fournir les données nécessaires pour décrire clairement l'influence des cortex CPF et CCA sur les réseaux distants lors de l'adaptation du comportement, et ii) de montrer comment les systèmes neuromodulateurs influent sur ces interactions en particulier en agissant localement dans des régions préfrontales précises.

Les expériences, menées chez le singe macaque rhésus (2 groupes de 3 animaux), consisteront à enregistrer l'activité corticale en couvrant de larges zones du cerveau pendant la réalisation de tâche cognitives qui requièrent une régulation du contrôle cognitif (enregistrements transcrâniens chroniques), puis en manipulant de façon locale (réversible: agonistes ou antagonistes aminergiques, ou irréversible: acide iboténique) les interactions entre CPF et ACC et les neuromodulateurs, et la fonction précise de ces régions. Chaque animal sera son propre contrôle dans ces expériences longitudinales permettant d'éviter l'utilisation de groupes contrôles supplémentaires (réduction). A des fins de raffinement, les expériences sont basées sur l'utilisation de protocoles et de matériels de dernière génération, avec renforcement de précision par l'utilisation d'imagerie anatomique cérébrale, et de neuronavigation. Les implants pour enregistrement électrophysiologique ont fait l'objet de développements spéciaux pour limiter l'utilisation de matériaux implantés (e.g. ciments chirurgical) et ainsi réduire les risques sanitaires.

1180. La production de neurones, ou neurogenèse, ne s'arrête pas brutalement à la naissance, mais persiste dans des régions spécifiques du cerveau antérieur des mammifères comme le bulbe olfactif ou le cortex frontal. À la naissance, ces nouveaux neurones sont générés par des cellules-souches qui résident des régions périventriculaires. Ces cellules-souches sont une source potentielle de cellules pour régénérer le cerveau antérieur postnatal après lésion.

L'hypoxie périnatale concerne près d'une naissance sur 1000. Elle peut entraîner des lésions ou des défauts du développement du cerveau, pouvant conduire à des séquelles neurologiques ultérieures. Des recherches ont montré une tentative du cerveau à se régénérer après une période hypoxique. Ainsi, une naissance de nouveaux neurones et d'oligodendrocytes est observée dans le cortex dans différents modèles animaux d'hypoxie ainsi que chez l'homme.

L'origine de ces cellules n'est à ce jour pas connue. De plus, la spécification des neurones nouveau-nés et leur intégration appropriée n'ont jamais été vérifiées. Ceci est dû au manque d'outils permettant d'identifier et de suivre sur le long terme des populations distinctes de cellules-souches et progénitrices.

Ce projet se concentrera à évaluer le potentiel régénératif des cellules-souches neurales de la zone Sous-Ventriculaire (ZSV) à régénérer le cerveau antérieur après hypoxie périnatale. Pour cela, nous utiliserons des souris transgéniques et des approches, précédemment établies dans mon groupe, qui nous permettent de marquer de façon permanente le devenir de populations précises de cellules-souches et progénitrices : populations latérales (à devenir GABAergique) et dorsale (à devenir Oligodendrocytaire et glutamatergique). Ces approches nous permettront de tester et de comparer le devenir de ces populations de cellules après hypoxie néonatale. Nous utiliserons aussi une nouvelle souris transgénique qui nous permettra de marquer à la naissance une large population de progéniteurs glutamatergiques, présents dans une zone intermédiaire du cortex, et qui pourrait être recrutée dans un contexte régénératif. Finalement, nous testerons une molécule pharmacologique que nous avons récemment montrée comme activant la voie de signalisation canonique Wnt et encourageant un devenir oligodendrogial et glutamatergique des cellules-souches de la zone sous ventriculaire. Cette molécule sera administrée par voie intranasale et son potentiel thérapeutique étudié.

Nous estimons qu'un nombre total de 340 souris transgéniques seront nécessaires pour accomplir ce projet de trois ans. Tout sera mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux utilisés ainsi que leur stress ou souffrance. Cela sera assuré par l'optimisation du nombre d'animaux par condition expérimentale, la mise en place d'un système optimal de banque de tissus, ainsi qu'une optimisation du design expérimental, comme détaillé dans ce formulaire.

1181. La résistance aux traitements est un problème clinique majeur, en particulier dans le cas des ostéosarcomes, tumeurs osseuses malignes les plus fréquentes touchant des patients jeunes (80 % sont des enfants ou adolescents). La chimiothérapie est le pivot central du traitement actuel, suivie d'une chirurgie selon le siège et le volume tumoral puis d'une poly-chimiothérapie sur 6 à 12 mois. Malgré cela, de nombreux ostéosarcomes sont ou deviennent résistants aux agents anti-prolifératifs et les récurrences avec métastases aux poumons et au cerveau sont fréquentes. Le taux de survie des patients (estimé à 30% à 5 ans) a très peu évolué ces dernières années faute de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces. Il est donc absolument nécessaire d'identifier des moyens de contrecarrer cette résistance aux traitements afin d'améliorer la survie des patients.

Les protéines métallothionéines sont produites en cas d'intoxication par des métaux lourds ou en présence d'agents chimiques dangereux pour le bon fonctionnement d'une cellule. Les cellules tumorales peuvent déclencher une forte synthèse de métallothionéine pour résister à l'administration de certains composés de chimiothérapie. Une augmentation artificielle

(par modification génétique) de l'expression de métallothionéine dans les cellules tumorales osseuses diminue la sensibilité des cellules à la chimiothérapie et à l'inverse, le blocage de l'induction de synthèse de métallothionéine renforce l'effet anti-tumoral de certains composés de chimiothérapie in vitro. En clinique, une étude préliminaire indique que pour des échantillons tumoraux prélevés lors du diagnostic et donc avant chimiothérapie, si les tumeurs expriment peu la métallothionéine MT2A, les patients seront bons répondeurs aux chimiothérapies alors que si le taux de MT2A est déjà élevé, les patients seront mauvais répondeurs avec un taux de survie réduit. L'ensemble de ces résultats suggère que le niveau d'expression de MT2A influence la réponse à la chimiothérapie et pourrait être utilisé comme marqueur pronostic dans le modèle de l'ostéosarcome. Les données in vitro suggèrent également que la réduction de l'expression de MT2A pourrait contrebalancer la résistance aux composés de chimiothérapie et ainsi favoriser l'action anti-tumorale de ces traitements. Cette étude consiste à valider l'effet sensibilisateur à la chimiothérapie de l'inhibition de MT2A observé et caractérisé in vitro, dans un modèle préclinique de tumeurs d'ostéosarcome, et apporter la preuve de concept de l'utilisation de MT2A comme cible thérapeutique potentielle dans le traitement des ostéosarcomes. Ce projet nécessite donc des tests sur organisme entier, incluant la réponse immunitaire, et donc sur des animaux vivants. Le modèle d'injection de cellules tumorales IM chez la souris est moins invasif (donc plus raffiné) et plus reproductible que des injections intra-tibiales et permet de limiter le nombre minimal d'animaux à 6 par groupe, avec un total pour le projet de 36 animaux. Les deux agents principaux de chimiothérapie (cisplatine et doxorubicine) seront testés pour des tumeurs dérivant de cellules parentales ou modifiées pour MT2A. Les expériences n'excéderont pas 4 semaines même si aucune dégradation importante de l'état général des animaux n'est observable avant 6 semaines. Aucun prélèvement ne sera réalisé durant l'expérimentation mais les tumeurs ainsi que les poumons seront collectés au sacrifice pour des analyses.

1182. La production de neurones, ou neurogenèse, ne s'arrête pas brutalement à la naissance mais persiste dans des régions spécifiques du cerveau antérieur des mammifères comme le bulbe olfactif ou le cortex frontal. A la naissance, ces nouveaux neurones sont générés par des cellules souches qui résident des régions périventriculaires. Ces cellules souches sont une source potentielle de cellules pour régénérer le cerveau antérieur postnatal après lésion.

Ce projet se concentrera à évaluer le potentiel régénératif des cellules souches neurales de la Zone Sous-Ventriculaire (ZSV) à régénérer des populations de neurones glutamatergiques après leur ablation ciblée. Pour cela, nous utiliserons des approches transgéniques ainsi que des approches, précédemment établies dans mon groupe, qui nous permettent de 1) marquer de façon permanente le devenir de populations précises de cellules souches et progénitrices : populations latérales (à devenir GABAergique) et dorsales (à devenir Oligodendrocytaire et glutamatergique) ; et 2) d'effectuer des ablations ciblées de populations précises de neurones glutamatergiques. Nous concentrerons notre analyse sur deux régions du cerveau antérieur: 1) le bulbe olfactif, structure dans laquelle une très forte neurogenèse a lieu ; et 2) le cortex, structure où la neurogenèse s'arrête avant la naissance. Ces approches nous permettront de tester et comparer le potentiel de populations précises de progéniteurs à changer de devenir et régénérer des populations de neurones autres que ceux qu'ils génèrent en temps normal. Dans un deuxième temps, nous testerons des molécules pharmacologiques que nous avons récemment montré comme activant la voie de signalisation canonique Wnt et encourageant un devenir oligodendroglial et glutamatergique des cellules souches de la zone sous ventriculaire. Cette molécule sera administrée par injection sous-cutanée et son potentiel thérapeutique étudié.

Nous estimons qu'un nombre total de 290 souris seront nécessaires pour accomplir ce projet de trois ans. Tout sera mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux utilisés ainsi que leur stress ou souffrance. Cela sera assuré par l'optimisation du nombre d'animaux par condition expérimentale, la mise en place d'un système optimal de banque de tissus, ainsi qu'une optimisation du design expérimental, comme détaillé dans ce formulaire.

1183. Les maladies infectieuses émergentes sont à l'origine d'épidémies et plus rarement de pandémies qui peuvent être particulièrement meurtrières. L'étude de la physiopathologie de ces maladies et de la réponse immune de l'hôte est un élément crucial pour proposer des approches vaccinales ou thérapeutiques pertinentes. En raison de la complexité des interactions hôte-pathogène chez l'individu infecté, les modèles primates non-humains (PNH) sont irremplaçables pour réaliser ces études. En effet, aucun test in vitro ou in silico ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité de la réponse immunitaire. Les modèles rongeurs ne permettent pas l'étude de toutes les maladies infectieuses humaines. Par exemple, il n'est pas possible d'y reproduire un SIDA tel qu'il est décrit chez l'Homme. La sensibilité de certaines espèces de PNH aux agents infectieux et les techniques de laboratoire existant dans ces espèces (caractérisation de la réponse immunitaire ou vaccinale) en font des modèles de choix (modèle « pathogène »). Par ailleurs, les animaux de certaines espèces de PNH, bien qu'infectés, ne développent pas de symptômes de la maladie (modèle « non pathogène »). Les études de ces deux modèles sont complémentaires et permettent de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu. Ces modèles sont souvent, par conséquent, une étape préclinique décisive dans le développement de vaccins ou de traitements des maladies infectieuses.

Nous avons déjà développé au sein de notre laboratoire différentes techniques d'exploration basées sur les approches utilisées en médecine humaine ou vétérinaire. Notamment, une technique de coloscopie permettant l'exploration macroscopique de la muqueuse vaginale. Nous souhaitons mettre au point de nouvelles techniques d'endoscopie et de fibroscopie, avec pour objectif de limiter les contraintes pour les animaux lors des études sur les maladies infectieuses (diminution des gestes chirurgicaux plus invasifs et des euthanasies pour collecte d'échantillons), en application de la règle des 3R.

En accord avec l'objectif de réduction du nombre d'animaux de la règle des 3R, les 20 PNH (au maximum) prévus dans ce projet ont déjà été inclus dans un projet précédent. Les animaux sont nés et élevés dans des élevages agréés. Au maximum 5

animaux de 4 espèces de PNH différentes seront utilisés à la fois pour le développement de la coloscopie et de la fibroscopie après des périodes de repos. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : les différents examens seront réalisés sous anesthésie générale, les animaux seront hébergés en groupe selon les règles d'hébergement en vigueur dans notre établissement. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus (anoxie pour la fibroscopie, diarrhée importante et durable pour la coloscopie). Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera sollicité afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

1184. Malgré les progrès considérables des traitements des hépatites B chroniques, ils ne peuvent qu'inhiber le développement du virus, sans l'éliminer de l'organisme. Tout arrêt du traitement relance l'activité virale et l'évolution de la maladie. Ainsi, malgré l'existence d'un vaccin efficace, l'infection chronique par le virus de l'hépatite B (VHB) demeure un problème de santé publique mondial avec 400 millions de porteurs chroniques dont 50% décéderont prématurément d'une cirrhose ou d'un cancer du foie. Il existe donc un besoin urgent de développer des options thérapeutiques alternatives afin de réellement guérir les porteurs chroniques du virus de l'hépatite B (VHB). Il est donc particulièrement important d'avoir accès à un modèle animal, immunologiquement proche de l'homme et infectable par ce virus puisque les mécanismes en jeux dans l'atteinte chronique due au VHB sont complexes et multifactoriels.

Nous avons récemment découvert la présence d'infections chroniques par VHB chez des primates non humains de l'Ile Maurice, avec près de 25% d'animaux positifs pour l'ADN du VHB (Hepatology 58(5) p1610 en 2013). De plus, le virus s'est avéré transmissible à des animaux naïfs avec apparition d'ADN du VHB et d'antigène HBs après infection. La séquence du VHB isolé chez ce primate non humain est de génotype D, (« VHB-DCyno »), génotype très répandu à travers le monde. De manière intéressante, nous avons pu identifier des variations génétiques de ce VHB qui pourraient s'avérer importantes, en particulier dans l'enveloppe du virus. Il s'agit d'une région clé d'interaction avec le récepteur du VHB sur les cellules du foie (hépatocytes) récemment identifié, le NTCP (Sodium taurocholate cotransporting polypeptide). Notre découverte a suscité beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique, en particulier sur l'origine de ces infections et la possibilité d'utiliser ce modèle pour évaluer des thérapeutiques contre l'infection chronique à VHB.

L'objectif général de ce projet est de caractériser in vivo l'immuno-virologie et les caractéristiques de l'atteinte du foie due à cette souche VHB-DCyno et valider le rôle du récepteur NTCP dans la susceptibilité des animaux à l'infection. Tout cela sera effectué en vue de l'établissement d'un nouveau modèle d'hépatites B chroniques. Pour résumer, il s'agit d'évaluer 1)

les capacités infectieuses

2) le pouvoir pathogène de la souche VHB-Dcyno.

De manière à réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire, l'étude est réalisée en deux étapes sur des animaux issus d'élevages reconnus. Nous veillerons au bien-être des animaux par des évaluations cliniques journalières et les critères d'arrêts sont définis antérieurement aux essais.

1/ Une étude pilote sera initiée avec 3 animaux pour vérifier l'infectiosité de la souche clonée VHB-DCyno.

Cette étude de faisabilité nous permettra de :

2/ Caractériser in vivo le profil immuno-virologique des primates non humains après l'infection avec la souche HBV-DCyno. Nous comparerons l'évolution des infections chroniques « naturelles » chez l'hôte avec un groupe de 6 animaux vis à vis des infections expérimentales de 18 animaux. Les résultats de cette étude seront essentiels pour la mise en place d'un nouveau modèle d'infection chronique par le HBV.

1185. Le glioblastome multiforme, principale tumeur primaire du système nerveux central, se caractérise par sa très forte agressivité, associée à une importante capacité invasive des cellules cancéreuses. Ainsi, malgré les traitements combinant la radiothérapie et la chirurgie, le glioblastome donne lieu à un très mauvais pronostic (médiane de survie d'environ 14 mois).

Ce projet a pour objectif de développer une nouvelle méthode de traitement des glioblastomes basée sur une administration plus directe du médicament (ou de la substance active) au niveau du cerveau, en utilisant la voie intranasale. Ce mode opératoire devrait également diminuer les effets secondaires généralement observés lorsque l'administration se fait par voie orale ou par voie intraveineuse. Les substances actives étudiées sont pour la plupart déjà connues et/ou validées pour leur efficacité. Elles luttent contre les tumeurs soit en bloquant la progression du cycle cellulaire soit en interférant avec la prolifération et/ou la migration ou la viabilité des cellules souches de gliome (CSG) ou des cellules souches et progéniteurs neuraux (CSPN).

Le protocole mis en jeu ici (utilisation d'une nouvelle voie anatomique) rend indispensable le recours à l'animal vivant. Aucune méthode alternative (modèle cellulaire ou simulation informatique) ne peut le remplacer. Le modèle retenu pour ce projet est le rongeur. Le nombre d'animaux par lot (15) a été ramené au minimum nécessaire pour assurer la validité des résultats. 1350 rongeurs nés et élevés dans des élevages reconnus, seront nécessaires à cette étude qui se déroulera sur 5 ans, soit 270 animaux par an.

Différentes lignées cellulaires de CSG ou de CSPN seront injectées, après anesthésie et analgésie, par stéréotaxie afin d'induire de façon reproductible et contrôlée des tumeurs dans une zone déterminée du cerveau (le striatum).

Un mois après l'injection des cellules, lorsque les greffes de cellules seront bien établies, les différentes molécules d'intérêt seront administrées par voie intranasale trois fois par semaine pendant deux semaines.

Les rongeurs destinés aux études d'histopathologies seront euthanasiés à différents moments après traitements. Ces animaux seront profondément anesthésiés puis euthanasiés afin de recueillir leur cerveau. Après dissection du cerveau, celui-ci sera utilisé pour des études d'histopathologies et des analyses de la dispersion des cellules à partir du point d'injection.

Parallèlement, des études de survie (méthode de Kaplan-Meier) seront effectuées afin de valider l'effet des drogues sur la survie des rongeurs. Dans cette procédure, les critères d'arrêt correspondants sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus. Toutes les procédures mises en œuvre dans ce projet comprennent l'utilisation d'analgésiques avant, pendant et après les expériences. Des échelles cliniques journalières et l'application de critères d'arrêt permettent de veiller au bien-être des animaux.

1186. Les maladies du système nerveux (Parkinson, Alzheimer, Huntington...) sont une préoccupation croissante en santé publique. De nouveaux outils diagnostiques associés à de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires pour améliorer la prise en charge des patients. Les modèles animaux sont des outils précieux et pertinents dans le développement de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques.

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative incurable qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales, et notamment de la mémoire. Ses symptômes sont liés à des altérations du fonctionnement de l'activité des synapses, ces zones qui permettent la communication entre les neurones. Les travaux menés depuis dix ans ont montré que des cellules du système nerveux appelées astrocytes contribuent significativement à l'activité des synapses. Ce projet, primé par la Fondation de France et France Alzheimer et impliquant trois équipes de recherche françaises, a pour objectif de déterminer, à l'aide de nouvelles approches expérimentales encore jamais utilisées dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, le rôle de ces astrocytes dans un modèle rongeur de la maladie. Ce modèle animal est indispensable pour l'étude de ces synapses complexes dans un environnement pathologique pertinent, encore aujourd'hui trop imparfaitement modélisé in vitro.

Pour mener à bien ce projet, plusieurs expertises (in vivo, ex vivo, imageries cellulaires...) seront combinées. Les chercheurs testeront de nouveaux axes thérapeutiques visant à restaurer des fonctions vitales normalement assurées par les astrocytes par thérapie génique utilisant des vecteurs viraux (AAVs) et à en évaluer l'efficacité grâce à la mise en œuvre d'études précliniques.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet, provenant d'élevage reconnu, sont nés et élevés en captivité. Leur nombre a été ramené au minimum (256 animaux) nécessaire pour d'obtenir des données statistiquement suffisantes afin de répondre aux questions scientifiques posées.

L'évaluation fonctionnelle sera menée en utilisant des techniques non-invasives telles que l'imagerie IRM. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Des échelles cliniques journalières et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des animaux.

1187. La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui entraîne l'amnésie, l'apraxie (trouble ou perte du contrôle des mouvements), l'aphasie (trouble ou perte du langage) et l'agnosie (trouble ou perte de la conscience sensorielle). Elle se caractérise, sur le plan anatomo-pathologique, par la présence de plaques séniles, engendrées par l'accumulation de peptides A β , et de dégénérescences neurofibrillaires, résultant de l'accumulation d'une forme hyperphosphorylée (anormale) de la protéine tau (tubulin associated unit). La protéine tau hyperphosphorylée est retrouvée dans une région du cerveau appelée l'hippocampe, dont l'atteinte précoce dans la maladie d'Alzheimer serait responsable d'une grande partie des troubles de la mémoire rencontrés chez les patients. Dans un neurone sain, la protéine tau assure la stabilisation des microtubules permettant au neurone d'être fonctionnel. Lorsque la protéine tau est phosphorylée, elle interagit moins avec les microtubules et forme des fibrilles entraînant le dysfonctionnement du neurone.

La compréhension des mécanismes à l'origine de cette anomalie de tau dans l'hippocampe permettrait à terme de développer des thérapies innovantes. Les mécanismes à l'origine de l'hyperphosphorylation de tau restent à ce jour inconnus. Des données obtenues sur cellules en culture et à partir de coupe de cerveaux de patients post mortem suggèrent que l'expression anormale d'une protéine appelée SET jouerait un rôle important dans ce phénomène d'hyperphosphorylation de tau. Cependant la relation de cause à effet entre l'augmentation de SET dans l'hippocampe, l'hyperphosphorylation de tau et les conséquences sur la mémoire doit être établie in vivo avant d'envisager à plus long terme la recherche de thérapies ciblant cette protéine SET. La présente étude permettra d'aborder cette relation, jamais étudiée précédemment.

Notre projet a pour objectif de déterminer, dans un modèle rongeur où la protéine SET est surexprimée dans l'hippocampe, la corrélation entre l'hyperphosphorylation de tau et l'apparition de déficits cognitifs / de mémoire. Il est donc nécessaire d'utiliser un modèle animal dont la capacité à mémoriser des informations peut être testée, et dont l'organisation des neurones (connexions, architecture) dans l'hippocampe est très proche de celle de l'homme.

A l'heure actuelle, ce projet ne peut pas être réalisé à l'aide de modèles cellulaires et ne peut pas être simulé par des techniques informatiques.

Les animaux (rongeurs) étudiés dans le cadre de ce projet, sont nés et élevés en captivité dans un élevage agréé. Le projet prévoit le recours à un minimum nécessaire de 150 animaux. Ce nombre a été déterminé en fonction des expériences à réaliser et des différents groupes expérimentaux requis pour pouvoir répondre à notre question scientifique (dont des groupes témoins de références). Une simulation statistique précise a été réalisée pour déterminer le nombre minimum d'animaux par groupe nécessaire pour observer des effets significatifs. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Des échelles cliniques journalières, un soutien nutritionnel et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des rongeurs.

1188. L'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X (X-ALD) est une des leucodystrophies (maladies affectant la substance blanche du cerveau et la moelle épinière) les plus fréquentes. Elle est due à des mutations dans le gène Abcd1 qui

code pour la protéine ALD (ALDP), impliquée dans la dégradation des acides gras à très longue chaîne (AGTLC). Une des conséquences est l'accumulation d'AGTLC dans le plasma et les tissus des patients.

Deux formes majeures de X-ALD sont décrites :

(1) l'adrénomyélo neuropathie, caractérisée par une paraplégie spastique progressive qui affecte les hommes à l'âge adulte et 65% des femmes porteuses de la mutation et cause des troubles neuromoteurs progressifs ;

(2) une forme cérébrale démyélinisante (cALD) (la myéline, qui constitue la « gaine » des prolongements neuronaux, accélère la transmission du signal nerveux) de l'enfant qui peut se développer de façon occasionnelle à l'âge adulte. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement pour l'adrénomyélo neuropathie, la forme la plus répandue de la maladie. Presque tous les hommes atteints de X-ALD et atteignant l'âge adulte développent une adrénomyélo neuropathie qui touche la moelle épinière avec une paralysie sévère et progressive des membres inférieurs, une perte de contrôle moteur, des dysfonctionnements du sphincter, une impotence nécessitant l'utilisation d'une canne ou d'une chaise roulante dans les 10-15 ans suivant le début des symptômes.

Le but de notre projet est de développer une approche par thérapie génique pour traiter les hommes et les femmes porteurs d'une copie du gène muté et atteints de l'adrénomyélo neuropathie. La stratégie abordée est d'exprimer un gène (le gène *Abcd1*) spécifiquement dans les cellules de la moelle épinière précocement affectées, par injection d'un vecteur viral dans le liquide céphalo-rachidien.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet (484 rongeurs) sont nés et élevés en captivité dans des élevages reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données suffisantes et évaluer l'effet thérapeutique du traitement chez la souris.

Nous disposons d'un modèle de souris ayant une délétion du gène *Abcd1* et présentant une déficience en ALDP, justifiant l'utilisation de cette espèce.

L'évaluation fonctionnelle sera menée en utilisant des techniques indolores et non-invasives telles que des tests comportementaux. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Des échelles cliniques journalières, un soutien nutritionnel et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des animaux.

1189. Le développement et la bonne caractérisation des modèles expérimentaux susceptibles de refléter certains aspects des pathologies humaines constituent des étapes incontournables pour pouvoir évaluer l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans le cadre de ce projet, nous nous intéressons à un mécanisme de mort des cellules nerveuses du cerveau appelé dégénérescence neurofibrillaire. Cette dernière est caractérisée par l'accumulation et l'agrégation de protéines, les protéines Tau. Ce processus est observé dans la maladie d'Alzheimer et d'autres maladies neurodégénératives appelées Tauopathies.

L'objectif de ce projet est l'identification de biomarqueurs d'imagerie au sein des différents modèles expérimentaux de tauopathies qui seraient pertinents pour l'évaluation thérapeutique. Les techniques d'imagerie du système nerveux central que nous souhaitons utiliser sont : 1) l'autoradiographie du 2-déoxyglucose qui est utilisée pour cartographier la distribution spatiale de l'activité cellulaire au niveau du cerveau et 2) l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomographie par émissions de positons (TEP) qui sont des techniques d'imagerie dites « non-invasives » qui permettent de suivre in vivo sur le long terme la mise en place et le développement de processus pathologiques au sein des modèles expérimentaux. Les informations recueillies grâce à ces examens d'imagerie sont d'ordre anatomique, structural et fonctionnel.

Pour ce projet, le recours à l'animal est nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau, en particulier les interactions structurelles et fonctionnelles de ces cellules. Les modèles rongeurs sont pertinents pour les études d'imagerie in vivo du cerveau. Les animaux sont nés et élevés en captivité. Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet (5 ans ; 1850 rats et 2850 souris) a été réduit au maximum afin d'obtenir des données suffisantes pour caractériser les modèles expérimentaux par l'imagerie. Des échelles cliniques journalières et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des animaux. Les examens d'imagerie sont non invasifs et permettent d'obtenir des informations sur l'anatomie et la fonction du cerveau. Les résultats seront confrontés à l'histologie post-mortem.

Ce projet s'inscrit dans une démarche translationnelle. Il permettra, à terme, d'utiliser ces modèles expérimentaux pour valider de nouvelles stratégies thérapeutiques et ainsi améliorer la prise en charge et la qualité de vie des patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou autres Tauopathies en permettant : 1) l'aide au diagnostic et la prévention de l'apparition de processus neurodégénératifs et 2) l'évaluation précise de l'effet thérapeutique de candidats médicaments.

1190. L'ataxie de Friedreich, la forme la plus répandue des ataxies récessives héréditaires (qui ne s'expriment que chez les porteurs de deux copies du gène muté), se manifeste par une diminution progressive de la coordination motrice et des troubles de l'équilibre, fréquemment associés à une hypertrophie (développement important) du muscle cardiaque et à une atteinte du pancréas se traduisant par une sensibilité accrue au diabète. La cause de la maladie est une mutation du gène codant pour la frataxine, entraînant un déficit de frataxine dans les tissus. La frataxine est une protéine impliquée dans la production de composés constitués de fer et de soufre nécessaires au bon fonctionnement de la cellule. À ce jour, aucune approche thérapeutique efficace n'existe pour l'ataxie de Friedreich. Récemment la pathologie cardiaque d'un rongeur, modèle reproduisant la cardiomyopathie humaine, a été complètement corrigée par l'injection d'un vecteur viral codant pour le gène de la frataxine humaine. Ce résultat constitue la preuve de concept qu'une approche par thérapie génique est pertinente pour le traitement de l'ataxie de Friedreich. Différentes étapes sont maintenant nécessaires afin de tester cette approche chez

l'homme. En particulier, un essai préclinique doit être mené chez le primate non humain (PNH), seul modèle permettant une extrapolation aux conditions d'utilisation en pratique clinique chez l'homme.

Le but de notre projet est d'évaluer la meilleure voie d'administration et le meilleur type de vecteur viral afin de cibler le cœur, mais aussi le pancréas, le deuxième organe périphérique le plus atteint dans la pathologie.

Les primates non humains étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés dans un élevage agréé. Leur nombre de 18 a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données suffisantes afin d'évaluer l'efficacité de la méthode d'injection et comparer les types de vecteur.

La combinaison de méthodes de chirurgie réalisées « en l'état de l'art » par un groupe mixte, composé de chirurgiens qui mettront au point la technique d'injection sur le PNH et traiteront ensuite les patients, de vétérinaires spécialistes de la chirurgie et du bien-être des primates et de biologistes spécialistes de vecteurs, garantira la qualité des gestes chirurgicaux, leur efficacité et la meilleure maîtrise de l'anesthésie et de l'analgésie. Des échelles cliniques journalières, un soutien nutritionnel et l'application de critères d'arrêts permettront de veiller au bien-être des animaux.

1191. L'hyperplasie congénitale des surrénales est une maladie héréditaire due à un déficit de l'enzyme 21-hydroxylase (21-OH). Sa fréquence est de l'ordre de 1 cas pour 14000 naissances. Dans cette maladie, la mutation du gène CYP21 entraîne un déficit en cortisol et en aldostérone. La forme la plus fréquente et la plus sévère est caractérisée par une déshydratation pouvant conduire au décès en l'absence de traitement approprié, en particulier chez le nouveau-né, et une surproduction d'hormones androgènes entraînant une ambiguïté sexuelle à la naissance chez les filles et une virilisation chronique.

Le seul traitement actuellement disponible est un traitement hormonal substitutif à vie. Depuis une dizaine d'année, le dépistage néonatal permet de commencer un traitement rapidement et d'éviter la perte de sel chez les nouveau-nés. Cependant, ce traitement ne bloque pas suffisamment la synthèse d'androgènes et n'évite pas la virilisation des filles. Dans les formes les plus sévères de la maladie, des interventions chirurgicales répétées sont nécessaires pour corriger les anomalies des organes génitaux chez les filles. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques semble donc essentiel.

L'objectif de notre projet est d'étudier la faisabilité d'une approche de thérapie génique dans l'hyperplasie congénitale des surrénales, basée sur l'injection au niveau des surrénales d'un virus adéno associé (AAV) codant pour le gène humain CYP21. Le projet s'inscrit dans une démarche translationnelle. Il permettra, à terme, de valider au stade préclinique une nouvelle stratégie thérapeutique pour améliorer la prise en charge et la qualité de vie des patients.

Nous avons déjà établi la preuve de concept in vitro que des cellules déficientes en 21-hydroxylase peuvent être corrigées par surexpression du gène CYP21. Cependant, la complexité de l'approche par thérapie génique ne nous permet pas de passer directement aux études sur l'Homme et nous devons évaluer cette approche chez l'animal.

Les modèles animaux étudiés dans le cadre de ce projet (rongeurs, primates non humains) sont nés et élevés dans des élevages reconnus. 456 rongeurs au maximum seront utilisés ainsi que 9 primates non humains. Ces nombres ont été réduits au maximum afin d'obtenir des données suffisantes pour évaluer l'effet thérapeutique du traitement d'une part et sa toxicité potentielle d'autre part. L'utilisation de la souris se justifie par le fait que nous disposons d'une souche ayant une déficience spontanée en 21-hydroxylase, permettant d'établir la preuve de concept d'un traitement par thérapie génique. Ces modèles rongeurs sont pertinents car ils présentent les mêmes déficiences génétiques que l'Homme pour cette maladie. Les animaux seront utilisés pour les études de toxicité qui nécessitent l'utilisation de deux espèces dont une non murine. En outre, le modèle de primate non humain se justifie par la régulation neuroendocrinienne similaire avec l'Homme.

L'évaluation fonctionnelle sera menée en utilisant des techniques indolores et non-invasives telles que l'analyse d'urine et des tests comportementaux. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Des échelles cliniques journalières, un soutien nutritionnel et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des animaux.

1192. Actuellement, les maladies infectieuses sont un des principaux enjeux de santé publique. La vaccination a permis de lutter contre de nombreuses maladies, cependant nos connaissances actuelles dans ce domaine sont incomplètes. De meilleures connaissances devraient nous permettre de concevoir de nouveaux vaccins (en particulier contre les pathogènes et maladies qui « résistent » au développement des vaccins comme l'infection par le VIH et le SIDA, l'infection par Plasmodium et la malaria ou l'infection par Mycobacterium tuberculosis et la tuberculose), d'améliorer les vaccins existants et d'accélérer le développement de vaccins contre des maladies émergentes.

Notre projet vise à élucider les mécanismes moléculaires et cellulaires précis qui régissent l'induction et le maintien de la mémoire immunitaire après vaccination. Au-delà de l'objectif de vaccinologie fondamentale, notre projet a aussi pour but d'identifier des biomarqueurs sanguins d'immunogénicité des vaccins, de prédire le délai optimal entre la 1ère vaccination et le rappel et de modéliser les interactions entre immunité innée et immunité adaptative.

Pour mener à bien ce projet, le modèle de primates non humains vaccinés avec un virus de la vaccine atténué, le Modified Virus Ankara (MVA), est pertinent. La proximité phylogénétique entre les hommes et ces primates, et en particulier les similarités de leurs systèmes immunitaires, en font des modèles expérimentaux de choix en immunologie/vaccinologie. Le virus de la vaccine est le vaccin qui a permis d'éradiquer le virus de la variole. Le MVA présente un meilleur profil d'innocuité que le virus de la vaccine dont il dérive, il est tout aussi immunogène chez l'homme que chez le primate non humain. Le pouvoir protecteur du MVA contre la variole n'a pas pu être formellement démontré dans des essais cliniques, puisque le virus de la variole a été éradiqué, mais il est très probable sur la base, d'une part, d'essais précliniques en modèle primate non humain et, d'autre part, du type de réponse immunitaire induite chez les hommes. Le MVA est également un vecteur vaccinal très prometteur et largement testé dans des essais cliniques contre la malaria ou le SIDA, en particulier quand il est utilisé

avec d'autres stratégies vaccinales (dans des protocoles dits de primo-vaccination suivie de rappels hétérologues, par exemple une première vaccination avec un vaccin ADN suivie d'une 2ème vaccination avec le MVA).

Pour répondre à nos questions, plusieurs primates non humains seront vaccinés avec le MVA. Ils proviennent d'un élevage reconnu et sont nés et élevés en captivité. Au total, 30 animaux, répartis en 5 groupes, seront immunisés. Plusieurs délais entre la première et la deuxième vaccination seront comparés. Les réponses immunitaires seront suivies dans le sang au cours du temps. A certaines dates, les réponses immunitaires seront également étudiées dans d'autres compartiments clés comme les ganglions qui drainent le site d'injection du vaccin, le site d'injection lui-même, la moelle osseuse, la rate ou les muqueuses (qui correspondent au site d'entrée des pathogènes et au niveau desquelles une première ligne de défense immunitaire est essentielle à la protection contre l'infection et la maladie).

Le recours au modèle animal est irremplaçable. La mise en place d'une immunité et son maintien sont complexes et mettent en jeu de nombreux partenaires cellulaires et moléculaires. Aucune méthode alternative *in vitro* ou *in silico* n'existe à ce jour. Le nombre d'animaux inclus dans ce projet est le minimum requis pour une puissance statistique suffisante, sur la base de résultats préliminaires et de la littérature. En accord avec la règle des 3R, les procédures comprennent l'utilisation d'analgésique et des critères d'arrêt précis.

1193. Les récepteurs couplés aux protéines G régulent un grand nombre de fonctions physiologiques et les récepteurs opioïdes sont en particulier impliqués dans la perception de la douleur, les processus de récompense à des stimuli naturels ou des drogues ou encore le contrôle de l'humeur. Leur dérégulation contribue aux situations pathologiques que sont douleur, dépendance ou désordres psychiatriques. A l'heure actuelle, les informations disponibles sur la dynamique des récepteurs opioïdes ont été essentiellement obtenues en système non naturellement producteurs et en cellule isolée, conditions très éloignées de l'environnement natif que constitue le système nerveux. Notre objectif est donc de comprendre de quelle manière ces récepteurs répondent à une stimulation unique ou répétée par des opiacés exogènes telle la morphine ou réagissent à une libération ponctuelle ou répétée de peptides opioïdes endogènes induite par une situation comportementale. Pour ce faire, nous proposons une étude multimodale intégrant tous les niveaux d'analyse du moléculaire au comportement animal afin d'identifier les déterminants moléculaires et cellulaires par lesquels ces récepteurs modulent l'activité neuronale *in vivo*, induisent une réorganisation des connexions neuroanatomiques et modifient le comportement. Nous utiliserons comme modèles des souris génétiquement modifiées exprimant les récepteurs opioïdes mu et delta en fusion avec une protéine fluorescente respectivement rouge ou verte qui permettent leur visualisation directement dans le système nerveux. Ces souris seront également utilisées en combinaison avec des souris déficientes pour l'un des récepteurs pour préciser le rôle de chacun. Nous anticipons que, dans son ensemble, ce projet nécessitera 3214 souris. Il sera conduit en respectant la règle des 3R visant à optimiser les procédures et à remplacer ou réduire dès que possible le nombre d'animaux d'expérience. Au vu des données de la littérature et de la variabilité phénotypique interindividuelle, les groupes expérimentaux, explorant les comportements seront constitués de 12 à 20 souris par condition selon la procédure et ceux pour l'analyse *in vitro* de 2 à 8 animaux par condition selon la procédure. Ce projet comporte 14 procédures expérimentales. Cependant, ces dernières seront combinées dans la mesure du possible pour utiliser les mêmes animaux et ainsi limiter considérablement le nombre d'animaux nécessaire.

1194. Chez l'Homme mâle adulte, la spermatogenèse est un processus continu de production des spermatozoïdes à partir d'une réserve de Cellules Souches Germinales (CSG). Le stock de CSG se détermine dès l'embryogenèse avec l'émergence de précurseurs cellulaires fœtaux qui après la naissance se transforment en CSG. Les mécanismes génétiques et moléculaires régulant : (1) le développement et la production des précurseurs germinaux embryonnaires, (2) leur transformation en CSG, et (3) l'activité et le maintien des CSG tout au long de la vie adulte, restent encore largement méconnus.

Des anomalies génétiques, ainsi que des toxiques environnementaux, peuvent conduire à une réduction de la fertilité, voire à une stérilité, en ciblant spécifiquement les précurseurs fœtaux ou les CSG adultes. Une meilleure compréhension des propriétés et du fonctionnement de ces deux types cellulaires permettra de mieux préserver la fertilité masculine, mais aussi de limiter la fréquence des cancers testiculaires, et d'identifier les agents reprotoxiques.

Notre projet porte sur l'étude de gènes, ou groupes de gènes, dont les dysfonctionnements réduisent fortement la fertilité. Nous nous intéressons également aux conséquences sur les CSG d'agents environnementaux comme les rayonnements X ou gamma, utilisés dans le domaine médical. Il existe déjà un large éventail de rongeurs génétiquement modifiés présentant une fertilité réduite ou nulle, ce qui a permis d'identifier des gènes indispensables à la reproduction.

L'étude des rongeurs OGM permet de déterminer si ces gènes sont actifs au cours du développement embryonnaire ou dans les CSG adultes, et d'analyser leurs rôles. Ainsi notre projet porte sur la compréhension de mécanismes contrôlés par certains de ces gènes et l'identification des cellules du testicule dans lesquelles ils sont actifs.

Le nombre de rongeurs OGM a été réduit au minimum nécessaire en assurant une reproductibilité statistique optimum des expériences. La réduction progressive du nombre de rongeurs est rendue possible par le développement et l'utilisation de modèles de culture de cellules germinales adultes issues de rongeurs (OGM et normal), mais ces cultures ne produisent pas de spermatozoïdes ; le modèle rongeur reste donc incontournable.

Ces modèles de culture cellulaire permettront également de déterminer si des substances environnementales possèdent une activité reprotoxique, limitant ainsi le recours aux essais sur les rongeurs.

Le modèle rongeur nous permet également d'améliorer l'identification des CSG adultes humaines et d'affiner leur purification. La proximité génétique du rongeur avec l'Homme dans ce domaine favorise la transposition des connaissances acquises sur le

petit mammifère à la caractérisation et à l'isolement des CSG humaines. La culture des CSG humaines est en cours de mise en point, étape technique indispensable à l'analyse de la spermatogenèse humaine et de ses anomalies acquises ou induites. Les animaux utilisés, dans le cadre de ce projet, au nombre de 500, sont nés et élevés dans des établissements agréés. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux par la mise en place de protocole d'analgésie et d'anesthésie définis et validés par les équipes vétérinaires en charge de l'installation. L'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir leur bien-être

1195. Le cancer est une cause majeure de décès chez l'homme. La cellule cancéreuse a acquis une faculté nouvelle d'échapper au contrôle physiologique de la prolifération tout en tolérant que son génome soit instable puisqu'elle accumule des erreurs dans son génome à son avantage prolifératif. Ainsi, la principale caractéristique de la cellule cancéreuse est l'instabilité de son génome contenant de multiples erreurs en évolution constante.

Ces erreurs proviennent d'un détournement des nombreux processus de réparation et de surveillance de la stabilité du génome physiologique. De nouvelles approches thérapeutiques cherchent à transformer cet avantage propre de la cellule cancéreuse en une vulnérabilité, tout en préservant la cellule saine. Certains cas du cancer de sein chez la femme commencent à être traités cliniquement grâce à l'identification du mécanisme de réparation qui était la cause de la résistance au traitement par chimio- et radiothérapie.

Nous avons identifié une nouvelle protéine, phospho-Ku70, spécifiquement exprimée dans la forme résistante de leucémie B humaine. Chez l'homme, cette protéine est essentielle à la réparation et au maintien de la stabilité du génome à plusieurs niveaux. Nous avons établi dans des modèles cellulaires des implications de cette protéine à la fois dans le contrôle de la survie (prolifération) et de la mort cellulaire. Ainsi, la création d'un modèle rongeur, physiologiquement proche de l'homme pour la fonction de cette protéine, s'est imposée afin de déterminer son rôle exact dans un organisme entier. Cette étape est très importante car les études sur des modèles cellulaires ne nous permettent pas de nous prononcer sur la capacité de la protéine à prédisposer au développement de cancers spontanés ou induits par des faibles doses d'irradiation. Ce modèle rongeur permettra aussi d'aborder la question du ciblage de cette protéine à des fins thérapeutiques.

Dans cette étude, le nombre d'animaux (108 rongeurs) a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des réponses satisfaisantes sur la fonction de la protéine dans un organisme entier. Les animaux proviennent tous d'élevages agréés. Ils sont hébergés selon les règles en vigueur dans l'animalerie et les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors de leur mise en œuvre.

L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe garantissent leur bien-être. Le vétérinaire de l'installation sera alerté dès le moindre signe de souffrance pour mettre en œuvre des traitements appropriés ou décider d'une euthanasie.

1196. Les cancers sont des maladies dont l'ensemble des mécanismes moléculaires et cellulaires est encore mal connu. L'approfondissement des connaissances demeure un objectif majeur pour améliorer les différents traitements existants.

L'inflammation est un processus physiologique déclenché par des agressions internes ou externes. La réaction inflammatoire est salutaire dans de nombreux cas mais peut devenir pathologique en cas de chronicité, dans des phases aiguës non contrôlées et dans la progression tumorale. L'inflammation fait intervenir des cellules endothéliales et de nombreux types de cellules sanguines parmi lesquelles les macrophages qui ont un rôle majeur. Elle se caractérise par une phase précoce avec un recrutement d'effecteurs cellulaires (tels que les macrophages/monocytes) et la production de cytokines/chemokines suivie d'une phase tardive appelée « résolution de l'inflammation » correspondant au retour à l'état physiologique basal.

Le projet portant sur l'étude de la physiologie de réactions inflammatoires, il n'est pas possible d'obtenir les réponses en utilisant un modèle cellulaire.

Nous avons créé un modèle rongeur dans lequel un gène, trim33, est inactivé dans les macrophages, ce qui empêche la résolution de la réaction inflammatoire et induit un défaut de prolifération des cellules tumorales. Il nous reste à définir, par des études in vivo, les défauts cellulaires associés à la perte d'expression de trim33 dans les macrophages, et les gènes régulés par ce même gène au cours de l'inflammation induite et de la progression tumorale.

L'ensemble de ces recherches permettra de définir les rôles de trim33 dans la résolution de la réponse inflammatoire et dans la progression tumorale, les domaines et les interactions protéiques impliqués dans ces rôles, et les conséquences fonctionnelles de la perte de ce gène dans les macrophages.

Pour cette étude, nous avons retenu plusieurs modèles de rongeurs, élevés dans notre établissement. Le génotype de ces animaux, connu et maîtrisé par notre équipe, nous permettra de comprendre les mécanismes mis en jeu. Le nombre d'animaux (4250) a été déterminé grâce aux expériences réalisées dans le cadre d'un précédent projet. Il correspond au minimum nécessaire pour assurer la validité des expériences qui seront menées.

L'état de santé des animaux sera étroitement surveillé tout au long des expériences et évalué cliniquement afin de limiter leurs contraintes. L'application de critères d'arrêts des animaux hébergés en groupe nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements antalgiques appropriés ou de décider d'une euthanasie

1197. A l'heure actuelle, 80% des nouvelles infections par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) se produisent au cours d'un rapport sexuel, avec une transmission du virus par voie muqueuse. Jusqu'à présent, la majorité des études menées sur les mécanismes de la transmission muqueuse du VIH s'est focalisée sur le rôle des particules virales libres. Or les cellules infectées par le VIH, présentes dans les sécrétions génitales, pourraient également jouer un rôle important dans la

transmission de l'infection. L'étude de ce mode alternatif de transmission permettra de mettre au point des méthodes plus efficaces de prévention de l'infection par le VIH, méthodes capables de protéger contre l'infection par le virus libre mais également contre l'infection par les cellules infectées présentes dans le sperme.

Dans un premier temps, nous étudierons donc, chez le primate non humain (PNH), seul modèle animal reproduisant dans son ensemble la physiopathologie de l'infection de l'homme par le VIH, l'origine, la nature et le rôle des cellules du sperme infectées par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) dans la transmission de l'infection par voie vaginale. Dans un second temps, nous constituerons des stocks de globules blancs issus du sperme, du sang et de la rate de PNH infectés par SIV ou par des virus chimères SIV/VIH (SHIV). Ces globules blancs infectés seront caractérisés (phénotype, nombre de cellules infectées, infectiosité in vivo). Enfin, dans un dernier temps, ces stocks de globules blancs infectés seront utilisés pour inoculer par voie vaginale des femelles PNH afin d'étudier les mécanismes cellulaires, moléculaires, immunologiques et virologiques mis en jeu lors de la transmission de l'infection par ces cellules infectées. Ce projet inclura au maximum 82 animaux, nés et élevés en captivité et provenant d'élevages agréés. En accord avec la règle des 3R, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les prélèvements de sperme seront réalisés autant que possible sur des animaux mâles appartenant à d'autres projets autorisés. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (prélèvement de sang, de sperme et inoculations virales sous anesthésie). Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés en modules individuels contigus permettant des interactions sociales et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

1198. Le virus Ebola appartient à la famille des Filovirus. Ces virus sont hautement pathogènes et la récente épidémie à virus Ebola en Afrique de l'Ouest a mis en lumière le manque de moyens de lutte contre ce virus. L'objectif de ce projet est d'évaluer la réponse immunitaire induite par plusieurs candidats vaccins contre le virus Ebola.

L'évaluation de l'immunogénicité de candidats vaccins contre le virus Ebola nécessite d'utiliser des organismes vivants entiers, la totalité de la réponse immunitaire ne pouvant pas être reproduite in vitro. Le primate non humain (PNH) est le seul modèle pertinent pour évaluer à la fois la sûreté et l'immunogénicité d'un candidat vaccin contre le virus Ebola. En effet, le système immunitaire et la physiologie des PNH sont très proches de ceux de l'Homme. La réponse vaccinale du PNH est donc semblable à celle obtenue chez l'Homme.

Pour évaluer 10 modalités vaccinales, le projet prévoit le recours à 95 animaux au maximum, nés et élevés en captivité dans des établissements reconnus. Le nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire pour permettre une analyse statistique robuste des données. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administration du vaccin et prélèvement de sang et de fluides biologiques sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés). Des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Le cas échéant le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Les animaux seront hébergés par paires en hébergements contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

1199. Depuis le début de l'épidémie du SIDA, plus de 36 millions de personnes sont décédées. Actuellement, le VIH reste un problème majeur de santé publique notamment dans les pays en voie de développement où l'incidence de l'infection est particulièrement élevée. Les femmes en sont les premières victimes car elles ne contrôlent pas les modes de protection.

De nombreux efforts sont aujourd'hui déployés pour mettre au point des méthodes de prévention que les femmes pourraient utiliser et contrôler elles-mêmes. Une stratégie à base de microbicides (substances capables d'inactiver le virus) à usage vaginal est actuellement en cours de développement. Ces préparations s'appliquent directement sur la muqueuse vaginale, au site même de l'exposition sexuelle. Leur utilisation limiterait la transmission sexuelle du VIH et donnerait aux femmes la maîtrise de leur protection contre le VIH.

La plupart des études cliniques utilisent des microbicides à base d'une seule molécule antirétrovirale. Les molécules testées ciblent principalement les étapes de réplication virale. Leur utilisation pouvant conduire à l'apparition de résistance, des stratégies visant à empêcher l'entrée du virus dans la cellule cible sont à l'étude. Une nouvelle molécule capable de bloquer l'entrée du VIH dans les cellules avant même qu'il n'interagisse avec son récepteur a été récemment développée, et a démontré in vitro son efficacité.

L'objectif de ce projet est d'évaluer in vivo, chez un primate non humain, la sécurité, la pharmacocinétique et l'efficacité de ce nouveau composé. Les études précliniques chez l'animal sont nécessaires pour évaluer la faisabilité, l'efficacité et la toxicité des molécules candidates dans la complexité d'un organisme vivant. Elles apportent le maximum d'informations avant la réalisation d'essais chez l'Homme. Le modèle choisi pour ce projet, par sa proximité phylogénétique avec l'homme, est le plus pertinent pour obtenir des résultats de valeur prédictive chez l'Homme car son système immunitaire est très semblable à celui de l'homme et son infection expérimentale par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) ou des virus chimères SIV/HIV reproduit la physiopathologie de l'infection de l'homme par le VIH.

Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour interpréter des résultats. Le projet prévoit d'utiliser au maximum 33 primates non humains, nés et élevés dans des élevages agréés.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus, le

vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés en modules individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

1200. Nous allons étudier l'efficacité d'un traitement antalgique et régénérateur dans un modèle de dégradation de l'articulation du genou après rupture du ligament croisé antérieur chez le lapin. L'arthrose expérimentale induite par section du ligament croisé antérieur (ACLT : Anterior Cruciate Ligament Transection) chez le lapin est un modèle proche des conditions physiopathologiques rencontrées en clinique chez l'Homme.

La rupture du ligament croisé antérieur est un problème fréquent chez l'homme. Elle peut être causée par une dégradation ou une anomalie du ligament (personnes âgées, personnes ayant des genoux fragiles, ...) ou par une contrainte physique importante exercée sur le genou (sportifs).

La plupart des analgésiques et anti-inflammatoires classiques sont utilisés par voie générale et percutanée. L'effet de ces molécules est symptomatique et les traitements habituels n'ont pas d'effet démontré sur la lésion ligamentaire.

Dans la présente étude, nous allons induire une rupture du ligament croisé antérieur chez les lapins, le modèle « ACLT ». 40 lapins pour une étude avec 4 groupes expérimentaux – nous prévoyons de réaliser jusqu'à quatre essais par an soit un total de 160 animaux pour constituer un modèle d'arthrose articulaire, soit 800 lapins en cinq ans avec deux procédures expérimentales.

Le traitement sera administré soit par voie orale soit par voie intra articulaire suivi par des examens associés à des séances d'imagerie par rayon X et des analyses histologiques. L'efficacité clinique et antalgique sera évaluée par des examens cliniques quotidiens des animaux.

Tout au long de ces études in vivo, nous allons respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner).

Le projet consiste à créer un modèle d'arthrose chez le lapin par une opération où le ligament croisé antérieur sera sectionné (ACLT). A partir du 7ème jour, le produit à tester sera administré par voie orale dans l'eau de boisson pour une durée de 4 semaines.

Les animaux seront suivis quotidiennement pendant une période de 12 semaines avec la pesée de l'animal à une fréquence d'une fois par semaine, les examens cliniques et l'analyse sanguine. L'enrichissement du milieu sera apporté sous forme d'ajout de jouets dans les cages des animaux avant leur opération pour assurer leur bien-être psychologique et physique.

Pour vérifier le niveau d'arthrose et pour évaluer l'efficacité thérapeutique, des séances d'imageries (rayon X) seront réalisées, avant la chirurgie (Jour 0), avant le traitement (Jour 7), à la semaine 2, semaine 4, semaine 9 et avant l'euthanasie de l'animal à la semaine 12.

A la fin de l'étude, les lapins seront euthanasiés. Une analyse histologique sera également effectuée sur les genoux pour évaluer l'efficacité des traitements.

Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal.

Avant toute expérimentation, un protocole expérimental sera soigneusement rédigé avec des points limites et transmis aux personnels techniques. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de respecter leur bien-être.