



**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 (15)

1501- Notre projet de recherche consiste à utiliser des souris pour produire des anticorps qui vont amener un médicament anticancéreux afin de tuer les cellules cancéreuses. Les souris prévues pour la mise en oeuvre de ce projet au nombre de 35 sont : des souris non immunisées et des souris immunisées avec des cellules cancéreuses.

REPLACER : Les anticorps sont utilisés pour détecter une maladie ou traiter celle-ci. La majorité est obtenue chez l'animal malgré des tentatives pour les produire avec des cellules. Cependant ces derniers sont de mauvaises qualités et ne sont pas aboutis.

REDUIRE : Des tests statistiques sont utilisés afin d'obtenir le nombre d'animaux nécessaires par groupe expérimental et permettre ainsi l'obtention de résultats exploitables.

RAFFINER : Les prélèvements de sang sont réalisés dans la région maxilo-faciale contrairement aux prélèvements de sang au niveau du sinus retro-orbital plus contraignant pour l'animal.

Les animaux auront recours à une surveillance quotidienne tout au long de l'expérimentation, à une désinfection locale après chaque injection, à une euthanasie en cas de perte significative de poids et d'infection locale cutanée.

1502- Acquis à la naissance et stabilisé vers l'âge de 3 ans, le microbiote intestinal humain reste remarquablement stable en conditions normales chez l'adulte. Composé de centaines d'espèces intimement adaptées à l'écosystème intestinal, il est en interaction constante avec les cellules, tissus et organes de l'hôte. De nombreuses conditions liées au mode de vie moderne et aux pratiques cliniques constituent néanmoins des facteurs de perturbation de la symbiose microbiote-hôte. Dans le cadre d'une convention de recherche signée en décembre 2014, une StartUp va développer avec l'INRA des processus standardisés et sécurisés pour une reconstruction rapide et complète de la symbiose microbiote-hôte par transplantation de contenus intestinaux.

La transplantation pratiquée aujourd'hui est couramment allogénique, d'un donneur sain vers un receveur malade. Elle est pratiquée depuis plus de 50 ans chez l'Homme avec une guérison totale dans la colite à *Clostridium difficile* chez plus de 90% des patients. La microbiothérapie autologue, pour laquelle le sujet est son propre donneur, pourrait être une alternative dans le cas de perturbations anticipées du microbiote à l'hôpital ou dans la vie courante.

Il y a aujourd'hui une réelle demande des cliniciens et pharmaciens d'hôpitaux pour des processus standardisés de conditionnement des échantillons fécaux pour la transplantation, et un fort potentiel d'amélioration des processus actuels qui respectent mal les exigences physiologiques du microbiote intestinal.

Le présent travail a pour objet de valider in vivo chez le rongeur un processus de collecte et conditionnement de selles humaines pour la microbiothérapie autologue.

Il comporte trois procédures qui impliqueront 176 rongeurs au total :

La procédure 1 vise à analyser l'impact du processus de conditionnement sur l'écologie intestinale reconstruite en rongeurs axéniques. Par comparaison avec un témoin constitué d'une suspension de selles humaines fraîchement collectées et administrées sans conditionnement, des échantillons de ces mêmes selles conditionnés selon diverses méthodes et administrés immédiatement après conditionnement mais aussi après une période de stockage seront testés. Cette procédure utilisera un maximum de 140 souris adultes.

La procédure 2 vise à comparer l'impact de la microbiothérapie autologue par rapport à la transplantation allogénique. Cette procédure utilisera 24 rats adultes.

La procédure 3 vise à évaluer la dynamique d'implantation et de stabilisation d'un microbiote humain dans un modèle de rat axénique.

1503- La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative héréditaire caractérisée par l'apparition progressive de symptômes moteurs et cognitifs extrêmement invalidants. Cette maladie est due à une mutation affectant le gène HTT, qui se traduit en protéine huntingtine (htt). Bien que l'expression de cette protéine soit ubiquitaire, la toxicité de la htt mutée affecte majoritairement le striatum en premier lieu, pour ensuite s'étendre à d'autres structures du cerveau.

Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement permettant de ralentir l'évolution de cette maladie chez les patients. Une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques est nécessaire pour trouver de nouvelles thérapies.

Selon notre hypothèse de travail, des gènes sélectivement exprimés dans le striatum pourraient être impliqués dans la vulnérabilité du striatum dans un contexte de maladie de Huntington. En partant de cette hypothèse, une analyse transcriptomique à haut débit nous a amené à étudier plusieurs « marqueurs striataux », protéines spécifiquement exprimées dans le striatum et dont l'expression est réduite dans la maladie de Huntington.

Dans le présent projet, la fonction des trois marqueurs striataux que nous étudions est totalement inconnue. Nos résultats préliminaires indiquent cependant qu'ils protègent contre la toxicité de l'huntingtine mutée. Ils pourraient donc constituer des cibles thérapeutiques pour soigner la maladie.

Le présent projet cherche à comprendre quels mécanismes moléculaires expliquent ces effets, dans les modèles animaux de la maladie de Huntington. A l'heure actuelle, ce projet ne peut ni être réalisé à l'aide de modèles cellulaires, ni être simulé par des techniques informatiques.

Les rongeurs, modèles étudiés dans le cadre de ce projet, sont nés et élevés dans des élevages agréés. Le projet prévoit le recours à un minimum nécessaire de 840 rongeurs. Ce nombre maximum (comprenant des groupes témoins de référence) a été déterminé en fonction des expériences à réaliser et des différents groupes expérimentaux requis pour pouvoir répondre à notre question scientifique. Une simulation statistique précise a été réalisée pour déterminer le nombre minimum d'animaux par groupe, nécessaire pour observer des effets significatifs compte tenu des valeurs attendues. Cette simulation est fondée, d'une part, sur des données obtenues dans la littérature scientifique et, d'autre part, sur les valeurs que nous avons observées dans le passé lors d'expériences utilisant des analyses similaires.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. 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.

1504- La température corporelle est une variable physiologique essentielle dont toute fluctuation reflète des modifications physiologiques de l'organisme. Il convient de distinguer la température périphérique (par exemple : les membres ou la peau) de la température interne qui fait référence à la température profonde du corps. La température interne se situe entre 36°C et 37,5°C chez l'Homme. Elle est soumise à des variations liées à de multiples facteurs : variations circadiennes et saisonnières, variations mensuelles chez la femme en fonction des phases du cycle menstruel ; l'alimentation, le stress et toutes situations pathologiques peuvent également influencer la température corporelle interne.

Plusieurs dispositifs de mesure de la température cutanée ont été développés dans le but d'établir les périodes d'ovulation et de fertilité chez la femme. Ces dispositifs ne permettent pas d'obtenir une corrélation entre la température corporelle et la période du cycle menstruel car la température cutanée subit les variations thermiques du milieu environnant. Les mesures répétées de la température interne (vaginale ou rectale) avec les thermomètres conventionnels étant source d'erreur, des dispositifs intra-vaginaux ont ainsi été développés afin d'obtenir des mesures plus précises et plus fiables.

L'objectif de ce projet est d'évaluer un nouveau dispositif intra-vaginal de mesure de la température chez un modèle primate non humain. Une étude de preuve de principe sera initialement conduite pour valider la stratégie développée. Les résultats de cette étude pourraient conduire à une optimisation du dispositif pour de futures applications cliniques. Ce projet est soutenu par l'Organisation Mondiale de la Santé. Le dispositif testé pourrait être utilisé dans deux applications majeures : prédire la période de fertilité chez la femme et contrôler, lors d'études cliniques, l'adhésion des femmes à un traitement microbicide anti-VIH à l'aide d'anneaux vaginaux.

La législation impose des études précliniques sur des modèles animaux pour évaluer les performances et la sécurité de tout nouveau dispositif médical. Dans le cadre de ce projet, elles permettront de démontrer la conformité du dispositif aux exigences fixées avant la réalisation d'essais chez l'Homme. Pour des raisons anatomiques et physiologiques (cycle menstruel), le modèle de primate non humain choisi pour ce projet est le plus pertinent pour obtenir des résultats de valeur prédictive chez l'Homme.

Le nombre d'animaux inclus dans l'étude pilote a été réduit au minimum nécessaire pour valider la conformité du dispositif. L'étude de preuve de principe prévoit d'utiliser au maximum 18 animaux nés et 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 dispositif/prélèvement de sang 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.

1505- Les cellules cancéreuses ont la particularité de recruter les vaisseaux sanguins afin de promouvoir et soutenir le développement tumoral et sa progression grâce à l'apport d'oxygène et de nutriments. Des traitements, dits anti-angiogéniques, inhibent le réseau vasculaire tumoral et ralentissent la progression de certains cancers. Néanmoins, ils induisent des résistances qui entraînent fréquemment des récurrences métastatiques. Nous avons récemment montré grâce à des modèles cancéreux chez la souris que le système nerveux est également sollicité dans le contrôle du développement des tumeurs primaires et des métastases. Les nerfs sympathiques régulent l'initiation tumorale alors que les nerfs parasympathiques contrôlent le processus métastatique. Chez l'Homme, nous avons montré que l'agressivité des tumeurs prostatiques et leur évolution clinique sont significativement associées au degré d'innervation du cancer.

Dans ce projet, nous proposons d'étudier la neurogénèse tumorale et le rôle des nerfs dans la formation des vaisseaux sanguins intra-tumoraux à différents stades du développement de la tumeur. Le rôle des nerfs tumoraux et de leurs voies de signalisation sur le développement de la tumeur et sa résistance aux thérapies anti-angiogéniques sera également étudié.

Aucune modélisation in vitro ne permet d'appréhender le développement concomitant des nerfs et des vaisseaux en 3D au sein d'un adénocarcinome. L'utilisation de modèles animaux est donc nécessaire pour tester et valider nos hypothèses de travail avant la réalisation d'essais cliniques chez l'Homme. Comme dans nos études déjà publiées, nous utiliserons deux modèles tumoraux : 1. des cellules tumorales prostatiques humaines greffées dans la prostate de souris immunodéficientes 2. des tumeurs de la prostate transgéniques, qui reproduisent in vivo le développement de tumeurs humaines.

Nous utiliserons 500 rongeurs nés et élevés dans un établissement agréé. Ce nombre correspond au minimum nécessaire pour valider statistiquement les conclusions scientifiques. L'ensemble des protocoles expérimentaux a été conçu pour minimiser les effets indésirables et la détresse des animaux :

- Les animaux seront hébergés dans une zone protégée et silencieuse dédiée à ce projet, en groupe de 5 individus par cage. Leur environnement est enrichi afin de maintenir leur bien-être tout au long de l'expérimentation.

- La fonction des innervations adrénergique sympathique et cholinergique parasympathique sera caractérisée par ablation nerveuse chimique ou chirurgicale, ainsi que par voie pharmacologique et génétique.

- Les prélèvements de sang les actes chirurgicaux et les tatouages seront effectués sous anesthésie.

- Le développement tumoral et sa progression seront suivis sous anesthésie générale par imagerie bioluminescente, échographie Doppler avec et sans produits de contraste.. et tomographie par émission de positons (TEP) .

- Des critères d'arrêt sont également prévus (poids, taille des tumeurs, animaux prostrés et/ou isolés, caractéristiques du pelage...), sous le contrôle du vétérinaire de l'établissement, afin d'éviter toute souffrance des animaux et déviance des protocoles.

1506- La connaissance des perturbations et anomalies de la perfusion et de l'oxygénation microvasculaire (c'est à dire des plus petits vaisseaux permettant les échanges avec les organes) est fondamentale pour améliorer notre prise en charge des patients dans les situations de maladies ou traumatisme aiguë. Son intérêt est grandissant dans les pathologies chroniques.

Dans les états de choc, qu'ils soient d'origine infectieuse, cardiaque ou hémorragique, la microcirculation et l'oxygénation tissulaire sont compromises et vont être à l'origine du développement de défaillances d'organes secondaires. Dans de nombreuses maladies chroniques comme le diabète et l'hypertension, le nombre de micro-vaisseaux va diminuer et contribuer à restreindre le transport d'oxygène et de nutriments.

Les dysfonctions de la microcirculation vont se caractériser notamment par une réduction de vitesse et de débit des globules rouges. Leur étude est essentielle pour la compréhension des altérations observées dans un certain nombre de maladies. Les dispositifs existants mesurent un seul type de paramètre et sont limités dans leur résolution spatiale et temporelle. Ils permettent essentiellement des mesures semi quantitatives.

Nous développons un nouveau prototype d'étude de la microcirculation permettant des mesures de plusieurs paramètres métaboliques au niveau tissulaire à très haute résolution. Ce dispositif faisant l'objet d'une protection intellectuelle, à la demande des services juridiques de la SATT, nous ne pouvons actuellement communiquer aucune caractéristique technique sur les paramètres étudiés, ni préciser ces paramètres.

Le but de ce travail est d'évaluer in vivo les différentes conditions d'utilisation de ce prototype et de le comparer aux méthodes de références actuelles.

L'ensemble des procédures expérimentales sera réalisé sous anesthésie générale comprenant une composante hypnotique et une composante analgésique (buprénorphine).

Les animaux utilisés seront des rats Wistar, au nombre maximum de 105. Ce nombre prend en compte de l'incertitude des études pilotes.

Pour chaque étape, dès que le nombre d'animaux requis pour obtenir une puissance statistique suffisante (et donc des conclusions valides) sera atteint, les expérimentations seront stoppées. Le succès de chaque étape est nécessaire pour passer à l'étape suivante.

Compte tenu des contraintes des études cliniques, des expérimentations animales sont indispensables avant d'envisager de l'évaluer chez l'homme. Ces travaux n'ont pas été réalisés d'après la littérature. Le recours à l'analgésie et à l'anesthésie est systématique pour limiter au maximum l'inconfort de l'animal.

1507- Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans le monde, et le développement de nouvelles thérapies est requis de façon urgente. Environ la moitié des cancers du poumon présentent une déficience dans certains mécanismes de réparation de l'ADN. Ceci participe à la survenue du cancer, mais représente aussi des opportunités thérapeutiques pour ne tuer que les cellules cancéreuses sans atteindre les cellules normales.

L'étude de modèles de cancer pulmonaire avec déficience en certaines enzymes participant à la réparation de l'ADN montre que les cellules tumorales déficientes sont significativement plus sensibles à un inhibiteur du métabolisme cellulaire que les cellules non déficientes. Ces résultats ont été retrouvés et reproduits sur plusieurs types de cellules de cancer du poumon - rendant ainsi ces observations robustes. L'efficacité de cet inhibiteur du métabolisme n'a jamais été évaluée chez des patients porteurs de cancer du poumon déficients en enzymes de réparation de l'ADN. Cette évaluation est l'objectif ultime de nos travaux. L'étape clé manquant actuellement avant une évaluation chez l'être humain est une évaluation chez l'animal,

précisément chez la souris. En effet, dans le cadre de développement de nouveaux médicaments pour des populations bien définies (médecine personnalisée), il est essentiel de valider les résultats obtenus sur des cellules (in vitro) et par des modèles animaux du fait de la nécessité de prouver ces approches sur un organisme vivant entier, avec tous ses systèmes (dont le système immunitaire).

L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'efficacité du médicament inhibant le métabolisme sur des xénogreffes de tumeurs du poumon avec déficience dans un mécanisme de réparation de l'ADN. Un nombre minimal d'expériences essentielles au projet sera fait pour limiter le nombre d'animaux. Pour obtenir des résultats solides et statistiquement satisfaisants, un nombre de 280 souris sera nécessaire. Pour le bien-être animal, nous prévoyons pour tout acte pouvant engendrer un stress ou une douleur, l'utilisation d'anesthésie (isoflurane) et/ou d'analgésique (ketoprofène à 2%).

1508- La technologie des anticorps monoclonaux, publiée en 1975 par Milstein et Köhler, a constitué une avancée majeure aussi bien pour le domaine de la recherche biomédicale que pour le diagnostic ou le traitement de certaines pathologies notamment en cancérologie. Les progrès réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire et la meilleure compréhension des mécanismes cellulaires, y compris du système immunitaire, ont offert de nouveaux champs d'utilisation des anticorps monoclonaux qui continuent à connaître un essor spectaculaire. En fusionnant des lymphocytes B normaux provenant d'une souris ou d'un rat préalablement immunisés avec des cellules de myélome capables de proliférer indéfiniment on peut disposer d'une source inépuisable d'anticorps monoclonaux. Les cellules hybrides obtenues dites hybridomes produisent les mêmes anticorps que les lymphocytes B et peuvent être maintenues indéfiniment en culture. En pratique, on immunise des souris Balb/c ou des rats Lewis contre un antigène qui peut être une protéine purifiée ou un mélange complexe telle qu'une cellule entière. On teste ces souris ou ces rats lors du protocole d'immunisation et on utilise les lymphocytes de la rate pour faire la fusion avec la lignée de myélome. La culture cellulaire issue de la fusion est ensuite soumise à un processus de sélection qui va permettre d'éliminer les cellules non fusionnées et sélectionner les clones cellulaires reconnaissant spécifiquement l'antigène d'intérêt.

Pour ce projet nous estimons à 120 le nombre de souris et à 40 le nombre de rats à que nous utiliserons sur la base de 2 souris (12 fois par an) et 2 rats (4 fois par an) par immunisation.

Règle des 3 R - Les 2 procédures proposées n'induiront que des souffrances modérées liées à l'injection de l'antigène par voie intrapéritonéale et à l'euthanasie par gradient de CO₂. Pour chaque immunisation, nous n'utilisons que des lots réduits d'animaux, 2 pour la souris et 2 pour le rat. La production des anticorps ne se fait plus in vivo par implantation de l'hybridome dans le péritoine et production d'ascite mais in vitro par des techniques de cultures optimisées. Ces techniques sont beaucoup plus coûteuses et moins efficaces que la production in vivo mais elles évitent de faire souffrir des animaux.

1509- Le staphylocoque doré est un problème de santé publique majeur. La première étape nécessaire pour établir une infection à *Staphylococcus aureus* est la colonisation des tissus. Le rôle des facteurs de virulence (toxines et molécules inhibitrices de l'immunité) dans la colonisation est encore mal défini. L'objectif de ce projet est donc de comprendre le rôle ainsi que le mode d'action de ces facteurs de virulence sur la cellule hôte. Puis, fort de cette compréhension, d'investiguer dans un modèle murin la relevance de ces interactions, le rôle des toxines dans la colonisation puis dans l'infection par *S.aureus*. Ce projet est en conformation avec les 3Rs car les tests animaux arrivent après une forte caractérisation in vitro des systèmes permettant de cibler spécifiquement les questions posées dans l'animal. De plus, le nombre d'animaux sera réduit au maximum dès que se sera possible, et les points limites ont été définis pour limiter la souffrance de la souris (dos vouté, poils ébouriffés, animal léthargique, perte de plus de 20% de sa masse). Si une souris atteint un point critique, celle ci sera euthanasiée. Ce projet fait suite à une étude bibliographique afin de raffiner au maximum les expériences.

Nombre d'animaux: 346 souris.

1510- Les personnes souhaitant pratiquer des actes de chirurgie sur animaux de laboratoire doivent suivre une formation réglementaire. Cette formation comprend différents modules imposés par la réglementation (tels que anesthésie analgésie, soins pré-opératoires, bonne utilisation des instruments par exemple). La mise en place de travaux pratiques (TP) in vivo à la suite des enseignements théoriques permet de mettre en application les notions enseignées. En chirurgie expérimentale sur rongeur, les gestes techniques à effectuer sont souvent délicats et le suivi d'un entraînement technique de bonne qualité est essentiel. En matière de remplacement, de nombreux gestes peuvent (et sont lors de la formation) être acquis lors de travaux pratiques ex vivo mais certaines techniques (notamment, la mise en place de cathéters vasculaires, certaines techniques d'injection ciblées et de prélèvement) ne peuvent être totalement maîtrisées qu'après essais sur animaux anesthésiés. En matière de réduction, le bon apprentissage de ces techniques permettra de réduire les échecs des futurs expérimentateurs dans leurs projets. Par ailleurs, ce projet utilisera des animaux surnuméraires d'une activité d'élevage. Enfin, plusieurs techniques chirurgicales seront enseignées sur chaque animal pour réduire le nombre d'animaux utilisés. Au total, 130 souris seront utilisées sur 5 ans pour la formation de 30 stagiaires, dans deux procédures sans réveil. Enfin, en matière de raffinement, les animaux sont anesthésiés très profondément pendant toute la durée de la formation et mis à mort par administration d'une surdose d'anesthésique en fin de formation.

1511- Ce projet s'inscrit dans la recherche d'un traitement pour le syndrome de Netherton (SN), qui est une maladie génétique rare de la peau caractérisée par des manifestations allergiques et inflammatoires. Les patients atteints de cette maladie sont affligés d'une destruction complète ou partielle de la partie la plus externe de la peau qui sert de barrière protectrice à l'organisme. En l'absence de cette protection, le malade est extrêmement susceptible aux infections et à une

déshydratation. Ceci explique que la période néo-natale et l'enfance sont des périodes critiques durant lesquelles des complications fréquentes et sévères menacent le pronostic vital.

Des souris génétiquement modifiées montrent des signes cliniques similaires (allergies et inflammations) aux patients atteints de ce syndrome. A la différence de la pathologie humaine, ces souris vivent normalement et ne montrent que des signes légers d'inflammation de la peau durant les 6 premiers mois. Ces signes s'aggravent au-delà et à partir d'un an des lésions cutanées irritantes se développent. Dans le cadre de ce projet, les animaux seront exclusivement utilisés avant l'âge de 6 mois et sont suivis quotidiennement. Ces souris seront utilisées pour tester des traitements à visée thérapeutique pour lutter contre l'inflammation et restaurer une barrière cutanée protectrice. Ces deux paramètres seront suivis comme ils le sont chez l'homme avec prise de sang et biopsie cutanée.

Pour limiter au maximum la douleur liée à la biopsie cutanée, les animaux seront anesthésiés et traités avec des antalgiques, puis la cicatrisation sera étroitement surveillée.

A l'heure actuelle aucun modèle de substitution n'est disponible pour faire ce travail, principalement parce que les patients sont peu nombreux et les modèles cellulaires pouvant être dérivés de ces patients ne permettent pas d'étudier l'inflammation et/ou la barrière cutanée.

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, les traitements à tester seront pré-sélectionnés sur des tests biochimiques in vitro permettant d'évaluer leur puissance et leur sélectivité afin de garder ceux ayant le plus fort potentiel de réussite.

Ce modèle de souris transgénique représente une réelle opportunité pour développer un médicament visant à soigner les malades atteints du syndrome de Netherton. Il est représentatif de la pathologie humaine permettant ainsi d'évaluer l'efficacité et la tolérabilité de nouvelles thérapies. Dans ce cadre, il est prévu d'utiliser 1000 animaux durant les 5 ans du projet soit 200 animaux par an.

1512- Les bactéries intestinales, ou microbiote intestinal, participent à de nombreux processus physiologiques. Cependant, un déséquilibre de cette flore ou dysbiose entraîne des répercussions sur l'immunité et peut être responsable de pathologies telles que l'obésité, les maladies auto-immunes et le cancer. Or, chez les patients atteints de cancer, de nombreux facteurs concourent à l'installation de cette dysbiose, comme la toxicité des chimiothérapies sur l'épithélium intestinal, la prescription d'antibiotiques à large spectre pendant la neutropénie ou les corticoïdes entraînant l'anergie lymphocytaire. Nous avons montré que certaines bactéries intestinales sont nécessaires à l'efficacité de certaines chimiothérapies et qu'une dysbiose induite par des traitements antibiotiques a des conséquences néfastes sur l'efficacité anti-tumorale de ces traitements, en particulier au niveau de l'immunité anti-tumorale. A présent, nous souhaitons approfondir les mécanismes d'action des chimiothérapies en relation avec le microbiote intestinal et améliorer les réponses aux chimiothérapies via les bactéries intestinales.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. En effet, les modèles de tumeur disponibles ont été développés chez la souris et les modèles de souris transgéniques sont indispensables à l'étude de l'immunité anti-tumorale après traitement par chimiothérapie.

Durant ce projet, 510 souris seront utilisées pendant la période décrite de 1 an. Ce nombre se justifie par la diversité des bactéries, des voies de signalisation et des modèles de tumeurs étudiés durant cette étude. Une resoumission annuelle précisant l'état d'avancement ainsi que les directions futures du projet est prévue. Ce projet nécessitera plusieurs expérimentateurs.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement, d'une part, car elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur), et d'autre part, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en terme de statistiques. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Ainsi, les prélèvements sanguins hebdomadaires réalisés à la veine sous-mandibulaire n'excéderont pas 50 µl 2 fois par semaine ou 100 µl 1 fois par semaine. Les prélèvements sanguins intracardiaques terminaux seront réalisés sur les souris après anesthésie sous isoflurane, suivis de l'euthanasie des animaux par dislocation cervicale.

1513- Notre processus de production assure la production d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques et privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par un immunogène. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est à dire portant des réceptions qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de 5 ou 6 acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un anticorps monoclonal est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitations, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses à mener à la génération de différents médicaments, pour le cancer du sein et le cancer du colon. Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisant (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

L'approche envisagée pour l'obtention d'AcM, se base sur la technique d'hybridation cellulaire développée par Cesar Milstein et Georges Kohler, pour laquelle ils ont obtenus le prix Nobel Médecine et Physiologie en 1984. Son principe repose sur deux étapes principales, à savoir :

- injection d'une protéine d'intérêt (antigène) à des souris, afin de permettre la production, par des lymphocytes B, d'anticorps contre cette molécule qui est reconnue par le modèle murin comme du "non soi".

- les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'anticorps monoclonal synthétisé par son lymphocyte parental.

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

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car le génome des souris présente environ 95 % d'homologie avec celui de l'homme. De plus, les souris sont des animaux de petites tailles et faciles à élever. Les souris permettent d'utiliser à la fois des cellules de myélomes et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 protocoles représentant 250 souris.

Le temps minimum d'immunisation des souris est 63 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible, la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine d'une semaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité modérée. La procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le week end) et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation. Au cours du processus d'immunisation, des échantillons de sang de l'animal seront prélevés pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire).

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

1514- L'objectif de ce projet de recherche est d'explorer l'impact de différents saveurs élémentaires (e.g. amer, sucré, gras, umami, etc.) sur la fonction de vidange gastrique et les signaux hormonaux de faim et de satiété. Le tube digestif est pourvu d'une grande quantité de récepteurs gustatifs très similaires à ceux présents sur la langue, et ces récepteurs du goût pourraient jouer un rôle majeur dans la régulation de l'appétit et de la prise alimentaire. L'activation de certains de ces récepteurs juste avant un repas pourrait ainsi modifier la vitesse de vidange gastrique et la sécrétion d'hormones gastro-intestinales. Quatre groupes expérimentaux de 10 porcelets Large White femelles de 20 kg environ seront constitués pour cette étude, afin de tester quatre solutions administrées par gavage oral juste avant un repas test (aliment granulé réduit en bouillie) : solution contrôle (eau), solution amère (e.g. quinine), plus deux autres solutions parmi des solutions à saveur umami (glutamate monosodique), à saveur grasse (acide oléique) ou à saveur sucrée (saccharose). Juste après le repas, la vitesse de vidange de l'estomac sera étudiée par imagerie scintigraphique digestive sur animaux vigiles. Pour cela, le repas test est marqué avec une molécule radioactive, le technétium 99, ce qui permet de suivre le décours du bol alimentaire dans le tube digestif, de manière non invasive. En parallèle, des prises de sang seront réalisées à différents intervalles (10 prélèvements de 5 mL étalés sur 2h) pour mesurer les variations plasmatiques de diverses hormones gastro-intestinales. Le même repas test (sans radiomarquage), précédé du même gavage oral avec une solution sapide, sera donné une à deux semaines plus tard aux animaux, suivi de leur euthanasie pour prélèvements de tissus et organes en vue d'explorations en biologie moléculaire. Compliance à la règle des 3R. Réduction : le nombre d'animaux prévu par groupe (N=10) permettra une puissance statistique satisfaisante pour les variables étudiées ; quatre groupes seront utilisés car nous souhaitons comparer un composé amer à une substance contrôle (eau) ainsi qu'à au moins deux composés gustatifs différents pour lesquels des données bibliographiques sont disponibles (saccharose, acide oléique ou glutamate). Raffinement : pour mesurer le temps de vidange gastrique, une méthode de référence non invasive a été choisie, la scintigraphie gastrique ; elle n'occasionne aucune douleur ni stress à l'animal et est reconnue pour son efficacité ; la seule contrainte pour ces mesures est de placer les animaux dans un hamac pendant 2h, procédure indolore et bien tolérée à laquelle les animaux seront progressivement habitués pendant deux semaines avant l'expérience ; la seule intervention invasive prévue sur les animaux est l'implantation d'un cathéter veineux jugulaire préalablement aux prélèvements sanguins ; le protocole d'anesthésie est décrit en détails dans le document et a été conçu sur la base de la douleur induite par la pose d'un cathéter veineux. L'analgésie au cours de

l'intervention sera réalisée par l'administration en perfusion de Fentanyl (18µg/kg/min soit 0,4 ml/min). L'analgésie sera complétée au réveil par une dose de morphine (chlorydrate de) par voie sous-cutanée (10 mg in toto). Remplacement : le modèle porcin est le plus approprié pour ce type d'étude puisqu'il s'agit de l'espèce animale qui possède le système digestif le plus proche de l'Homme, et l'objectif est de transposer les résultats obtenus à l'Homme ; n'importe quel autre modèle serait moins pertinent.

1515- 1-Objectif scientifique du projet:

La tularémie est une maladie infectieuse provoquée par *Francisella tularensis*, une bactérie intracellulaire (ou cytosolique). Deux études récentes suggèrent des interconnexions entre l'immunité cytosolique et la production de médiateurs lipidiques. Ces connexions restent mal caractérisées et le but de ce projet est de les étudier dans un modèle murin de tularémie. En effet, le modèle murin d'infection par *Francisella* permet d'étudier de façon robuste l'immunité cytosolique et ses conséquences in vivo. Les objectifs de ce projet sont : i) de déterminer le profil de médiateurs lipidiques lors de l'infection par *Francisella* et le rôle de l'immunité cytosolique dans cette production et ii) d'étudier les impacts des médiateurs lipidiques sur l'immunité cytosolique anti *Francisella*.

2- Retombées attendues

Ce projet devrait nous permettre de mieux caractériser la synthèse de médiateurs lipidiques induite lors d'une infection par *Francisella*, et comment ces médiateurs lipidiques affectent ensuite la réponse immunitaire de l'hôte. Une meilleure compréhension de ce système *Francisella*-immunité cytosolique-médiateurs lipidiques devrait aider au développement de nouveaux médicaments impliqués dans la réponse immunitaire chez l'hôte.

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

Ce projet est en conformation avec les 3Rs car les questions posées ici nécessitent un système complexe, et ne peuvent pas être investiguées dans des modèles in vitro ou dans des modèles in vivo utilisant des animaux invertébrés. Une étude pilote sera réalisée pour réduire au maximum le nombre d'animaux requis. De nombreux paramètres de l'hôte et de la bactérie seront étudiés sur chaque animal pour réduire au maximum le nombre de répétitions expérimentales. Une étude bibliographique a été réalisée pour raffiner au maximum les expériences.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Animaux inclus dans ce projet : 282 souris (au maximum, avec possibilité de réduire ce nombre après vérification par expérimentation que certains groupes sont possiblement redondants, comme les groupes contrôles)

1516- En France, les rejets de méthane, gaz à effet de serre impliqué dans le réchauffement climatique global, sont principalement liés aux activités d'élevage et en particulier liés à l'élevage de ruminants. La production de méthane par les animaux est également une voie de perte énergétique, qui contribue à diminuer l'efficacité d'utilisation de l'énergie de la ration. Dans un objectif de réduction des émissions de gaz à effet de serre par les animaux d'élevage et pour une meilleure efficacité de l'élevage, il est possible de moduler la production de méthane en faisant varier la composition en matière grasse de la ration, mais la mesure précise de la production de méthane par les animaux nécessite des équipements complexes. Le profil en acides gras du lait est dépendant de la composition en matière grasse de la ration. Il pourrait être envisagé, dans un contexte alimentaire relativement stable, d'utiliser la composition en acides gras du lait comme prédicteur de la production de méthane. Ainsi, l'objectif du projet est de modifier la composition en matière grasse dans l'alimentation afin de faire varier les composantes du bilan énergétique et notamment la production de méthane et la composition en acides gras du lait en utilisant des chèvres comme animaux ruminants. Le projet prévoit de tester 4 rations, différant par la nature de la matière grasse. Chaque ration sera testée sur 6 groupes de 2 chèvres au cours de 4 périodes successives de 3 semaines (soit 12 chèvres au total). Après 2 semaines d'adaptation à la ration, chaque groupe de 2 chèvres sera hébergé pendant une semaine en chambres respiratoires afin de mesurer leur niveau alimentaire, leur production laitière, leur production de fèces et d'urines, leur production de méthane et leur production de chaleur. Lors du dernier passage de chaque groupe en chambre respiratoire, les chèvres seront mises à jeun d'aliment pendant 24 heures, afin de déterminer leur métabolisme énergétique basal.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement: Les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de relier la production de méthane au profil en acides gras du lait en fonction des caractéristiques de l'alimentation et il n'existe pas de modèle mathématique ou in vitro permettant d'atteindre cet objectif. Réduction: Le nombre d'animaux et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs tout en limitant le nombre d'animaux. Ainsi, il est nécessaire de prévoir 6 mesures pour chaque aliment. Raffinement: L'utilisation des chambres respiratoires est requise car c'est la seule méthode permettant de mesurer précisément la production de méthane et la production de chaleur. Afin de limiter l'isolement social des animaux notamment pendant les périodes en chambre respiratoire, chaque mesure sera réalisée sur un groupe de 2 chèvres.

1517- Dans le contexte actuel en production porcine, la clé pour aller vers des systèmes plus durables, ce qui réduit les coûts d'alimentation et les impacts sur l'environnement, repose sur l'incorporation dans la ration d'une plus grande utilisation de coproduits de l'industrie (tourteaux, drèches), moins chers mais également plus fibreux. Dans ce nouveau contexte alimentaire, plusieurs pistes suggèrent une prédisposition génétique à mieux digérer les nutriments et l'énergie afin d'améliorer l'efficacité d'utilisation des aliments plus fibreux par l'animal. Cependant, des méthodes rapides pour caractériser la capacité digestive des animaux sont nécessaires. L'objectif du projet est donc d'élaborer une méthode de déterminer l'efficacité digestive des porcs s'appuyant sur la spectrométrie proche infrarouge (SPIR) en conditions expérimentales. L'effet

de la teneur en fibres de l'aliment sur l'utilisation digestive des nutriments et de l'énergie sera également étudié avec l'utilisation d'un marqueur indigestible, méthode déjà validée dans de nombreuses espèces (volailles).

Afin de répondre à cet objectif, 48 animaux seront logés en cages individuels permettant de contrôler leur consommation et de prélever les fèces de chacun séparément au moyen de plateaux récupérateurs pendant 18 jours. A la fin de la période expérimentale, l'ensemble des animaux restera dans la ferme expérimentale et sera nourris avec des aliments standards pour rétablir leur consommation et leur croissance jusqu'à l'abattage.

Ce protocole respecte la règle des 3R appliquées à l'expérimentation animal parce que le nombre d'animaux (6 par traitement) est le minimal à utiliser pour permettre de mettre en évidence une différence de digestibilité des nutriments entre traitements avec une puissance statistique de 90% et une confiance statistique de 95% (réduire). De plus, des mesures sur des animaux individuels limitent le nombre d'animaux expérimentaux (réduire, raffiner). Pour réduire le stress des animaux, les cages seront contiguës, ce qui permettra aux animaux de se voir et de se sentir afin d'éviter l'isolement social. Les animaux seront surveillés régulièrement, afin de permettre une intervention immédiate en cas de souffrance, maladie ou tout autre problème (raffiner). La réussite de ce protocole nous permettrait de s'affranchir d'une collecte totale et individuelle des fèces dans des conditions d'élevage porcins, ce qui fera respecter la règle de remplacement dans les expérimentations animales futures (et non présente dans cet étude).

1518- L'exploitation des gisements pétroliers profonds se développe depuis plusieurs années. Au cours de l'accident de la plateforme pétrolière Deep-Water Horizon dans le golfe du Mexique des dispersants chimiques ont été utilisés à grande profondeur (1500m de fond) pour limiter la formation de nappes de pétrole en surface ; or il n'existe aucune donnée sur les effets des dispersants chimiques sur des organismes susceptibles d'être exposés à d'importantes pressions hydrostatique comme peuvent l'être les espèces de fond ou les nombreuses espèces effectuant des migrations verticales dans la colonne d'eau.

L'objectif de ce travail est d'analyser en pression les effets d'une formulation commerciale de dispersant en présence d'un fuel de référence (Brut Arabe Léger, BAL) sur la capacité d'une espèce de poisson modèle, le turbot *Scophthalmus maximus*.

Les animaux seront exposés à une plongée simulée en caisson hyperbare (100 bars, l'équivalent de 1000 m de profondeur). Puis l'effet d'une contamination par hydrocarbure dispersé sera évalué à travers leur consommation d'oxygène. En tout, 360 animaux seront utilisés dans cette expérimentation.

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

- Il s'agit d'une étude écophysiological des effets métaboliques et intégrés au niveau de l'organisme pour laquelle le remplacement est impossible.
- néanmoins, le nombre d'animaux utilisés est limité au minimum permettant une étude statistique cohérente.
- Le raffinement est respecté au niveau des conditions d'hébergement des animaux et au niveau des procédures d'euthanasie.

1519- L'amaurose congénitale de Leber est une forme particulière de rétinopathie pigmentaire entraînant précocement une quasi-cécité chez l'enfant. Les enfants atteints présentent des difficultés à fixer et à suivre du regard. L'aspect de leur fond d'œil est souvent normal les premiers mois mais évolue vers une atrophie irréversible de la rétine. Cette maladie concerne 10 à 20 % des enfants aveugles. On estime qu'elle touche 1000 à 2000 enfants en France. Plus largement, les rétinopathies pigmentaires sont des maladies génétiques qui s'attaquent progressivement aux cellules photoréceptrices de la rétine et conduisant petit à petit à la cécité. Leur taux de prévalence est d'environ une personne atteinte sur 4 000 dans les pays occidentaux

Antérieurement, nous avons montré l'importance du facteur RdCVF dans la survie des cônes. Alors que la plupart des facteurs neurotrophiques agissent sur les cellules cibles par le déclenchement d'une cascade de phosphorylation conduisant à l'inhibition de la mort cellulaire, l'effet trophique de RdCVF sur les photorécepteurs à cônes résulte de sa liaison à un récepteur de surface, le BSG1 qui est lui même complexé au transporteur de glucose GLUT1. RdCVF stimule l'entrée du glucose dans les cônes, une action qui est directement corrélée à son activité neuroprotectrice.

Il est donc intéressant de cerner les séquences en acide aminés cruciales pour l'interaction entre RdCVF, BSG1 et GLUT1 afin de préciser quels types de mécanismes secondaires sont déclenchés par la liaison à RdCVF à BSG1 pour l'activation de GLUT1.

Nous avons identifié qu'un variant du gène du gène codant pour le RdCVF (Nxn1), E64K, est associé à l'amaurose congénitale de Leber. Afin de vérifier l'importance de ce site, nous nous proposons ici de comparer l'effet protecteur du RdCVF de chacun de ces deux variants : E64 et 64K en transfectant ses deux produits à l'aide de vecteurs viraux à des souris rd1, modèle murin spontané de rétinopathie pigmentaire. Au total 36 animaux seront étudiés (incluant les animaux tests et témoins).

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des carrés de cellulose et des bâtons à ronger. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

1520- La mucoviscidose est une maladie génétique qui induit un défaut d'efflux chlorure lié à la déficience du gène qui code pour une protéine appelée CFTR et la principale cause de morbidité et de mortalité est liée à une obstruction des voies. A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement de cette protéine CFTR et une autre stratégie envisagée est d'activer les efflux chlorure d'autres canaux. En 2008, plusieurs équipes ont identifié un « nouveau » canal chlorure appelé TMEM16a ou ANO1.

Une activation de ce canal permettrait une restauration des efflux chlorure de façon indépendante de la mutation de CFTR. Des travaux antérieurs ont pu montrer que ce canal est en plus diminué au niveau pulmonaire dans la mucoviscidose.

Dans nos travaux de recherche nous avons pu montrer, qu'un microARN (miRNA), qui est une petite séquence inhibitrice des ARNs, est impliqué dans la dérégulation du canal ANO1 et qu'une inhibition de ce miRNA permet de réactiver ce canal. Dans un but thérapeutique nous avons trouvé une molécule qui permet de se fixer à la place de ce miRNA et permet ainsi d'augmenter l'expression et l'activité du canal ANO1.

Ce projet a pour but de valider des résultats déjà obtenus ex-vivo sur des cellules issues de patients atteints de mucoviscidose. En effet, les modèles cellulaires, bien qu'indispensable pour décortiquer les mécanismes moléculaires restent des modèles qui ne reflètent pas forcément ce qui est observé dans un animal entier. Le recours à un modèle animal paraît indispensable à la validation des résultats avant d'envisager une application clinique chez le patient.

Type d'animaux : B6;129-CFTR^{tm1Unc}

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 12 souris expérimentales pour une durée maximale de 6 mois. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement-Réduction-Raffinement :

Dans le cadre de cette étude, nous utiliserons des techniques déjà établies et publiées qui permettent de limiter le nombre de souris pour cette étude aux expériences indispensables permettant d'avoir assez de données pour un traitement statistique suffisant. Les souris seront anesthésiées par inhalation d'un mélange d'isoflurane et d'air ambiant. La profondeur de l'anesthésie est vérifiée par l'absence de réflexe de retrait suite au pincement des coussinets plantaire: la procédure est poursuivie uniquement quand l'animal est sous narcose profonde. L'instillation intranasale étant rapide, les souris seront anesthésiées pendant une période inférieure à 5 min afin d'éviter un refroidissement de l'animal. A la fin de la procédure, les souris seront remises en air ambiant et l'éveil de la souris sera contrôlé ainsi que la reprise d'une activité normale.

Dans cette étude nous aurons 6 souris traitées avec un placebo et 6 ayant les mêmes caractéristiques traitées avec la drogue d'intérêt.

1521- Les souris gnotobiotiques sont des souris de laboratoire spécialement élevées dans un environnement microbien contrôlé, de manière à ce que leur microbiote, en particulier leur microbiote intestinal (ensemble des microorganismes vivants de l'intestin), soit spécifique et parfaitement connu. Ce sont des souris nées dans des conditions stériles, dépourvues de tous microbes de l'environnement, et ensuite volontairement colonisées par un ou plusieurs microorganismes connus.

Le développement de ce type de modèles expérimentaux est nécessaire devant le manque de modèles représentatifs in vitro de co-cultures de cellules avec des bactéries pour l'étude des interactions hôte - microbiote. L'unique modèle de souris gnotobiotiques commercialisé depuis 50 ans, appelé Altered Schaedler Flora (ASF), est défini par une communauté de 8 bactéries peu représentatives de la flore intestinale, dont certains travaux révèlent de sérieuses limites pour des études précliniques. Par ailleurs, un nombre croissant d'études scientifiques sur le rôle du microbiote intestinal sont réalisées à partir de modèles gnotobiotiques différents, réduisant toute possibilité de comparaison rigoureuse.

Par conséquent, notre projet consiste à établir une lignée de souris gnotobiotiques possédant un microbiote intestinal contrôlé plus complexe que le modèle ASF. Cette nouvelle lignée permettra l'étude des mécanismes d'interaction entre hôte et microbiote intestinal, d'évaluer l'impact de candidats médicaments sur le microbiote intestinal et de valider le bénéfice pour l'hôte, et enfin, d'ouvrir la voie à des études de phases cliniques chez l'homme.

En tenant-compte de la variabilité intra-groupe in vivo, un total de 1257 souris sur 5 ans est prévu pour entretenir les colonies de souris et permettre l'analyse statistique des résultats. Afin de réduire au mieux ce nombre, nous prévoyons d'entretenir des colonies de sécurité et de mener plusieurs analyses de manière concomitante pour ne pas dupliquer inutilement les lots d'animaux et réduire également le nombre d'animaux témoins.

Cette lignée de souris gnotobiotiques constituera un modèle reproductible d'étude des interactions entre l'hôte et un écosystème bactérien intestinal contrôlé, permettant de réaliser des études homogènes et comparables entre elles.

La procédure expérimentale n'engendrant pas de souffrance ou de stress, aucun point limite n'est associé, mais les souris seront suivies individuellement tous les jours pendant toute la durée du projet.

1522- La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neuro-dégénérative caractérisée par des troubles cognitifs et psycho-comportementaux entraînant une perte d'autonomie. Avec le vieillissement de la population, cette maladie représente un véritable enjeu scientifique, humain, social et économique.

Dans des études antérieures, par des études d'association génétique, l'équipe a identifié que le taux d'expression du gène *Nxnl2* était un facteur de prédisposition à la maladie d'Alzheimer.

Dans la présente étude, nous nous proposons de déterminer le profil d'expression du gène *Nxnl2* dans des régions spécifiques du cerveau (cortex, hippocampe) et de regarder s'il existe un parallèle entre troubles comportementaux et mort des cellules qui n'expriment plus *Nxnl2*.

Ces études seront réalisées sur une lignée de souris transgénique possédant un gène rapporteur permettant de visualiser par test colorimétrique les cellules d'intérêt : souris *Nxnl2* KI. Au total, 30 animaux seront nécessaires pour cette étude.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des carrés de cellulose et des bâtons à ronger. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

1523- Le virus de l'hépatite E (VHE) est responsable chez l'homme d'hépatite aiguë en moyenne plus grave que l'hépatite A. Il s'agit d'un virus zoonotique pouvant être transmis de l'animal à l'homme par la voie alimentaire en cas d'ingestion de produits contaminés crus ou peu cuits. Le porc domestique est un réservoir très important du virus et la contamination tardive de celui-ci (peu de temps avant son abattage) ou de manière prolongée (infection chronique) constitue un risque important de persistance du virus au niveau du foie et donc d'introduction de foies contaminés dans la chaîne alimentaire. Des travaux récents décrivent des dynamiques d'infection très diverses selon les élevages conditionnés par la conduite d'élevage mais aussi potentiellement par les co-infections intercurrentes. Ainsi des virus immunodépresseurs peuvent entraîner une infection chronique chez le porc comme le circovirus porcin de type 2 (PCV2), qui est un virus très répandu chez le porc. Plusieurs publications rapportent des isolements simultanés VHE/PCV2 à partir de prélèvements de terrain. Cette co-infection semble donc fréquente et entraîne potentiellement une diffusion du VHE dans tout l'organisme du porc comme montré dans des travaux récents. Cette co-infection pourrait ainsi expliquer la variabilité observée en termes de durée d'excrétion du VHE, voire une certaine chronicité comme celle décrite chez l'Homme dans un contexte de traitement immunosuppresseur ou d'infections par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). L'objectif du projet est donc d'évaluer expérimentalement l'impact d'une co-infection PCV2 sur la durée d'excrétion du VHE chez le porc (N=25) et son potentiel de transmission à des porcs sentinelles (c'est-à-dire un échantillonnage d'animaux servant à assurer le suivi sanitaire d'une population animale donnée) sensibles au travers d'expériences de transmission en population co-infectée PCV2. Les expérimentations conduites seront faites dans le respect de la règle des 3R (ensemble de recommandations concernant les moyens à mettre en œuvre pour limiter l'utilisation des animaux : Remplacer, Réduire et Raffiner), en particulier, le nombre d'animaux utilisés est le plus faible possible tout en permettant l'obtention de résultats statistiquement robustes. De plus les deux virus étudiés provoquent une infection totalement asymptomatique en conditions expérimentales. Dans l'éventualité de signes cliniques provoqués par une synergie entre les deux virus occasionnant un mal-être chez l'animal, des points limites seront définis pour que les animaux soient euthanasiés avant que la souffrance ait atteint un seuil non acceptable.

1524- Au cours des 20 dernières années, la résistance aux antibiotiques a considérablement évolué alors que parallèlement la recherche de nouveaux antibiotiques s'est essouffée. L'émergence de bactéries dites toto-résistantes est devenue une préoccupation des pouvoirs publics. L'utilisation d'alternative aux antibiotiques devient aujourd'hui une priorité de santé publique. Nous avons développé des liens avec des industries spécialisées dans la fabrication de produits antibactériens. Ces produits, ont été testés in vitro dans notre laboratoire. Les résultats ont été suffisamment convaincants pour développer un projet d'étude in vivo pour leurs propriétés intrinsèques antibactériennes. L'utilisation des modèles animaux dans le cadre des anti-infectieux est un passage indispensable de la phase pré clinique d'évaluation. L'obtention de l'AMM nécessite l'évaluation des composés isolés en parallèle des mélanges comme preuve du concept. Les tests in vitro ont été validés (étude des CMI d'une population bactérienne étude de la cinétique de bactéricidie..). Ce projet sera réalisé dans le cadre d'un modèle expérimental de pneumopathie murine à *Acinetobacter baumannii* souche SAN, validé et publié antérieurement pour les essais thérapeutiques. Il s'agit d'un modèle aigu compartimentalisé de pneumonie qui garantit l'efficacité clinique des produits testés et donne des informations sur la pharmacocinétique sanguine et pulmonaire des produits testés. La justification du modèle de pneumonie est liée à l'importance de cette pathologie en milieu hospitalier particulièrement avec des bactéries résistantes aux antibiotiques. Le choix de la souche d'*Acinetobacter* est en lien avec cette multi résistance et le tropisme pulmonaire. S'agissant d'une pathologie infectieuse aiguë, il y a une mortalité importante. Comme dans le cadre des pathologies infectieuses, ces animaux survivants ne peuvent resservir à d'autres expérimentations en raison du développement de défenses immunitaires au cours de cette maladie

Nous utilisons 30 souris par lot (15 souris pour l'étude de la mortalité et 15 souris pour l'étude microbiologique et pharmacocinétique, 2 lots par molécule à tester sur 10 molécules, soit 600 souris au total, ce nombre correspondant aux règles préalablement établies des 3R :

-Remplacer : le recours aux animaux est limité à la souris

-Réduire : le modèle choisi est destiné à limiter le nombre d'animaux : afin de justifier de la validité et la reproductibilité des résultats obtenus, et pour les analyses statistiques ultérieures, un minimum de 15 souris par lot est nécessaire

-Raffiner : Le bien être de l'animal est pris en compte de manière à lui éviter toute souffrance ou stress inutile : le comportement général de l'animal sera surveillé (aspects du pelage, vivacité, bonne alimentation ...) 3 fois par jour afin d'évaluer la gêne ou la douleur qu'il ressent. Son poids sera contrôlé journalièrement. Le score clinique sera également évalué à chaque visite. Tout animal sera euthanasié s'il obtient un score clinique de 3 points. Pour la gestion de la douleur, du paracétamol sera administré toutes les 6 heures à raison de 15 mg/kg.

1525- Le glioblastome (grade IV) est le type le plus courant et le plus agressif de tumeur primaire du cerveau chez l'homme, avec une médiane de survie globale ne dépassant pas 15 mois. L'incidence et la mortalité par cancer du cerveau sont en constante augmentation, avec aujourd'hui 5 personnes sur 100 000 touchées dans les pays occidentaux. Le traitement standard de première ligne est actuellement basé sur une résection chirurgicale maximale, combinée à une

radiochimiothérapie simultanée, suivie d'une chimiothérapie adjuvante. Malheureusement, ce schéma thérapeutique n'améliore pas de façon significative la survie des patients.

Le mélanome est le cancer de la peau le plus agressif, dont l'incidence double tous les dix ans. C'est une des formes les plus courantes de cancer chez les jeunes adultes et la cause la plus fréquente de décès par cancer dans la population active. En France, environ 1600 patients atteints de mélanome meurent chaque année en raison de son fort potentiel métastatique invasif, source de complications fréquentes, mais aussi de sa grande résistance aux radio et chimiothérapies (seuls 10% des mélanomes répondent à la chimiothérapie traditionnelle).

Avec environ 53 000 nouveaux cas chaque année, le cancer du sein est le plus répandu des cancers féminins, représentant à lui seul 33,5% de l'ensemble des nouveaux cas de cancer chez la femme. Près d'une femme sur neuf sera concernée au cours de sa vie, le risque augmentant avec l'âge. Le cancer du sein est toujours une maladie mortelle avec 11 500 décès annuels, malgré d'importantes avancées dans les thérapies ciblées. Différents types de traitements sont aujourd'hui utilisés, seuls ou en associations, pour lutter contre le cancer du sein. Mais malgré ces avancées, le risque de rechute est important et l'évolution vers les métastases délétères, ce qui exige de nouvelles stratégies de lutte contre cette maladie.

La plupart des thérapies actuellement évaluées, ciblent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse tumorale) et le développement de la tumeur. Mais ces traitements se retrouvent face aux mécanismes de résistance mis en place par la tumeur, et peuvent même provoquer la diffusion et l'invasion des cellules tumorales, ce qui explique le manque d'efficacité de ces thérapies.

Récemment, de nouveaux traitements ont été développés en utilisant des anticorps monoclonaux ou des inhibiteurs d'enzymes (notamment de kinases), impliqués dans le développement de ces cancers. Mais les mécanismes de résistance développés par les cellules tumorales ainsi que leur capacité à échapper à la mort cellulaires, mettent en échec les traitements par chimiothérapie classique dans ces cancers.

Pour contourner ces problématiques auxquelles les composés conventionnels ne peuvent plus répondre, nous proposons d'évaluer, dans cette étude, l'efficacité anti-tumorale d'un composé peptidique de nouvelle génération.

1526- Le peptide Pepdeath cible une protéine de signalisation (PTPN4) qui régule une variété de processus biologiques, comme la croissance cellulaire, la différenciation, le cycle mitotique et la transformation oncogénique. Cette molécule PTPN4 possède également une fonction anti-apoptotique, qui empêche la mort naturelle et programmée des cellules. Le peptide Pepdeath a été conçu pour bloquer spécifiquement cette fonction de PTPN4 exprimée dans les tumeurs, pour conduire à la mort de ces cellules anormales.

Une étude préliminaire *in vitro* a permis de sélectionner 2 séquences peptidiques Pepdeath qui seront analysées dans cette étude *in vivo*. Ces séquences possèdent les meilleures affinités pour PTPN4 et les meilleurs potentiels inducteurs de mort cellulaire. Leur efficacité a été validée sur des cultures de lignées cellulaires tumorales, ainsi que leur toxicité et la dose thérapeutique à utiliser (référence bibliographique : Wolff, N., Lafon M, Cordier F, Terrien E, Babault N, Prehaud C, Lafage M International patent application PCT/FR10/000661 filed by Institut Pasteur on October 2, 2009 « Structural tools to design peptides promoting neuronal survival or apoptosis »).

L'objectif de cette étude est de tester maintenant *in vivo* ces 2 peptides Pepdeath, dans trois différents modèles de tumeurs (mélanome, cancer du sein et du cerveau).

Les modèles de greffes de cellules tumorales humaines chez des souris (dans leurs organes d'origine ou en sous-cutanée), sont actuellement le meilleur choix pour démontrer l'efficacité thérapeutique de nouveaux candidats médicaments. En effet, les modèles *in vitro* ne peuvent prendre en compte des paramètres essentiels pour cette étude tels que : la tumeur et son environnement proche, le développement spontané des tumeurs, le système immunitaire de l'organisme, et les mécanismes physiologiques mis en jeu et pouvant avoir un impact sur l'étude.

Afin d'obtenir des données statistiquement significatives, nous utiliserons des groupes de 10 souris par conditions expérimentales (soit 220 souris au total).

Dans le but de réduire le nombre d'animaux, nous utiliserons le système d'analyse par imagerie non invasive (NightOwl), qui permet de suivre la cinétique d'évolution des tumeurs et de calculer l'accroissement tumoral individuel. Grâce à ce système, nous pouvons appliquer dans notre étude, les critères utilisés en clinique humaine pour évaluer la réponse tumorale face à un traitement donné (critères RECIST).

De plus, les souris seront surveillées quotidiennement depuis l'injection jusqu'au sacrifice, pour détecter des signes éventuels de douleurs post-opératoires. Si un animal présente des symptômes traduisant l'apparition de douleurs, une injection en IP d'un analgésique sera effectuée 1x par jour.

Les souris seront également pesées et leur état général évalué 3 fois par semaine. Les données issues de ce suivi individuel seront enregistrées dans un tableau spécifique définissant les points limites expérimentaux, et aussitôt analysées. De ce fait, si un animal atteint à un moment donné de l'expérience, un de ces points limites définis, il sera immédiatement sacrifié.

1527- Le cancer chez les enfants et les adolescents est un événement rare qui représente environ 1% de l'ensemble des cancers. Bien que rares, ils constituent la deuxième cause de mortalité entre 1 et 14 ans après les accidents et la première cause de décès par maladie pour cette tranche d'âge. Actuellement, les taux de guérison restent très faibles pour certaines formes de cancers avec moins de 10% pour les tumeurs cérébrales de haut grade et environ 30% des patients atteints de neuroblastome et sarcome d'Ewing restent en échec thérapeutique malgré des protocoles de radiothérapie et/ou de chimiothérapie à haute dose, qui peuvent être associés à une importante toxicité.

Compte tenu de la rareté du matériel tumoral, le développement de modèles de xénogreffes à partir du matériel tumoral issu des patients est essentiel pour pouvoir proposer les modèles expérimentaux les plus adaptés et les mieux caractérisés pour comprendre développement de ces maladies en échec thérapeutique mais également permettre l'exploration de l'activité de nouveaux médicaments. Pour respecter la règles des trois R, nous développons en parallèle des modèles alternatifs de type culture cellulaire pour soutenir nos hypothèses qui devront ensuite être validées in vivo, comme par exemple l'efficacité anti-tumorale d'un médicaments. Néanmoins, ces modèles alternatifs ne nous permettent pas encore de pouvoir appréhender le comportement tumoral dans son propre environnement qui peut être exploré dans modèles orthotopiques (xénogreffe dans le site originel du matériel tumoral) mais également la réponse au traitement qui implique souvent différents systèmes au sein de l'organisme et qui nécessite principalement des modèles de xénogreffes sous-cutanées autrement appelés PDX (patient derived xenograft). Pour cela, nous implanterons, dès réception, des greffons issus du matériel tumoral soit sous forme de suspension cellulaire pour les localisations orthotopiques qui impliquent des volumes d'injection faibles, soit sous forme de pièces tumorales de moins de 5 mm³ pour les localisations sous cutanées. Pour limiter la douleur engendrée par le développement de la tumeur, les animaux pourront recevoir un antalgique adapté (Pour limiter la douleur induite par la chirurgie, les souris reçoivent 0,1 mg/kg de buprénorphine par voie sous cutanée (10mL/kg) au décours de la chirurgie puis pendant 2-3 jours 2 fois par jour. D'après notre expérience passée, le taux de prise tumorale avoisine 50 % toutes tumeurs confondues et aucune modélisation statistique ne nous permet de modéliser le taux de prise tumoral qui reste très variable, même au sein d'une même indication. Dans ce contexte et afin d'obtenir un panel de modèles reflétant la variabilité inter-tumorale pour les différents types tumoraux, nous grefferons la totalité des tumeurs qui seront mises à notre disposition. Pour chaque tumeur, nous grefferons au maximum 10 souris sous anesthésie: 5 orthotopiques et 5 sous-cutanées, et pour limiter le nombre d'animaux utilisés, une seule tumeur par modèle (ortho vs sc) sera transplantée consécutivement trois fois de manière à évaluer leur stabilité et caractériser ces PDX en vue d'exploration fonctionnelle ou thérapeutique. Ce projet porte le nombre maximum théorique d'animaux utilisés à 10000 soit 2000 par an (si toutes les xénogreffes prennent à 100%). En pratique, d'après notre expérience, il est probable que ce nombre approchera en fait 1000 animaux par an soit un total de 5000.

1528- La Dengue est une maladie virale causée par un arbovirus et transmise par l'intermédiaire d'un vecteur, le moustique (*Aedes*). L'OMS considère qu'environ 40 millions de personnes sont potentiellement exposées à ce virus dans le monde. Dans 2,5% des cas, cette infection conduit à une forme hémorragique potentiellement mortelle chez l'Homme. Il n'existe à ce jour aucun traitement spécifique et aucun vaccin efficace permettant de se protéger de cette maladie.

L'objectif de ce projet est de sélectionner des « candidats vaccins » qui pourraient avoir des applications cliniques chez l'Homme à moyen terme. Il comprend plusieurs étapes : la mise au point du modèle expérimental (choix des souches de virus de deux sérotypes différents permettant de reproduire expérimentalement l'infection, choix de la voie d'inoculation du virus) puis deux essais de protection (un pour chaque sérotype Dengue) par différents candidats vaccins sur le modèle d'infection mis au point lors des premières étapes.

Les essais de protection par des vaccins ne peuvent être réalisés que sur des organismes entiers ; le modèle animal est nécessaire pour apporter le maximum d'informations avant la réalisation d'essais chez l'Homme. Actuellement, il est impossible de ne pas recourir à des modèles animaux. Le modèle animaux choisi pour ce projet est le macaque cynomolgus afin d'avoir d'une part une réponse vaccinale similaire à celle qui sera obtenue chez l'Homme et d'autre part un modèle d'infection par le virus de la Dengue comparable à la maladie humaine.

Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été réduit au maximum tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non-paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (limitation des volumes prélevés, prélèvements sous anesthésie...). Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de limiter la durée de l'infection (60 jours après infection) et de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires de la vaccination), le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 88 animaux pour la mise au point des procédures sur un sérotype puis 44 animaux pour l'autre sérotype. Ces animaux proviennent d'élevages reconnus et sont hébergés individuellement pour maîtriser les éventuelles surexpositions virales et les contaminations croisées entre individus, en conséquence, une attention particulière sera apportée sur le respect du programme d'enrichissement physique.

1529- Le but de ce projet est de développer de nouvelles méthodes de cartographie de la réplication du génome entier à l'échelle de la molécule individuelle d'ADN. La cartographie de la réplication des génomes animaux est une des questions les plus difficiles de la biologie moléculaire. Des méthodes génomiques récentes, basées sur la purification et le séquençage de différents types d'intermédiaires de réplication, ont permis des progrès significatifs mais montrent de sérieuses discordances. De plus, ces méthodes ne fournissent qu'un image moyenne de la réplication dans des populations de cellules. Seules l'analyse de molécules uniques d'ADN permet de révéler la variation des profils de réplication d'une cellule à une autre et les corrélations spatio-temporelles entre origines de réplication voisines. Cependant, ces techniques sont lentes et laborieuses, particulièrement dans le cas des génomes complexes des mammifères.

Nous proposons d'augmenter considérablement le rendement et la précision des techniques d'analyse de la réplication en molécule unique afin de les amener à la même puissance que les autres méthodes génomiques. L'intercalation quantitative de colorants fluorescents de l'ADN, l'incorporation de dNTPs fluorescents in vivo ou in vitro à des séquences

définies, la microfluidique, et la microscopie de fluorescence offrent la possibilité de cartographier rapidement la position des fourches de réplication et d'identifier la position génomique d'une population entière de molécules d'ADN étirées, sans requérir les étapes compliquées d'hybridation in situ et de révélation par anticorps fluorescents qui limitent actuellement les techniques de molécule unique. L'automatisation des outils de traitement des images et d'alignement sur le génome permettra une analyse à haut débit.

Ces innovations nous permettront de quantifier l'initiation, la terminaison et la progression des fourches tout au long du génome chez le xénope, la levure et des cellules humaines en culture. Ceci permettra de clarifier les controverses existantes, de contraster les stratégies de réplication de ces organismes, d'examiner les liens entre réplication, transcription et instabilité génomique et d'offrir à la communauté scientifique de nouvelles bases de données ainsi que des outils simples pour cartographier la réplication dans des systèmes très variés.

Le recours à l'expérimentation animale concerne la grenouille *Xenopus laevis* (xénope). Les oeufs de xénope servent à préparer des extraits qui permettent de répliquer in vitro de l'ADN nu ou des noyaux de spermatozoïdes de xénopes. La préparation des extraits d'oeufs nécessite l'induction de pontes par injection d'hormones sur femelles vigiles. La préparation de noyaux de spermatozoïdes nécessite le prélèvement de testicules sur mâles anesthésiés puis leur euthanasie. Les oeufs et spermatozoïdes seront éventuellement utilisés pour réaliser des fécondations in vitro afin d'obtenir le développement synchrone d'embryons.

Justification du choix de *Xenopus laevis*

La mise au point de ces nouvelles méthodes sera effectuée dans des extraits d'oeufs de xénope. Ce système, très utilisé de par le monde, est le seul qui permette de répliquer in vitro des noyaux eucaryotes avec une bonne efficacité et de façon régulée par le cycle cellulaire. L'efficacité de réplication avec des noyaux de spermatozoïdes de xénope est de 100%. On peut également utiliser des noyaux isolés de cellules en culture ou même de l'ADN purifié de n'importe quelle source mais l'efficacité est moindre. L'ADN purifié (tel que l'ADN du bactériophage lambda) incubé dans ces extraits est spontanément assemblé en chromatine puis en noyaux, dont la réplication mime fidèlement la réplication des noyaux de l'embryon précoce, mais dont la complexité génomique est bien moindre, ce qui est important pour simplifier les mises au point. L'absence de membranes plasmiques permet d'incorporer des dNTPs fluorescents avec une excellente efficacité et à une concentration parfaitement contrôlée. L'utilisation de cellules en culture nécessiterait de perméabiliser la membrane plasmique, ne permettrait de contrôler ni la durée ni l'intensité du marquage, offrirait une efficacité de réplication nettement plus faible et compliquerait l'analyse et la cartographie des molécules répliquées. Si notre but ultime est d'appliquer ces innovations au génome humain, leur mise au point ne peut se faire que par étapes de complexité croissante, à l'aide du système souple et efficace que représentent les extraits d'oeufs de xénope. En outre, le xénope est un animal robuste, largement utilisé par les biologistes du développement, dont le génome a été récemment séquencé et dont l'hébergement est relativement peu contraignant. Sur la durée du projet, le nombre d'animaux nécessaires est estimé à 200 dont seulement 20 seront euthanasiés. La réalisation du projet se fera suivant les règles de bonnes pratiques d'expérimentation animale.

Justification de l'application des 3R. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au strict minimum. Les seuls animaux dont l'euthanasie est prévue sont les mâles pour prélèvement de testicules. Les spermatozoïdes purifiés à partir de ces testicules se conservent indéfiniment à -80°C. Nous n'en décongelons que le strict minimum et n'en re préparons que lorsque le stock est épuisé. L'utilisation des femelles pour les pontes est réduite par réutilisation des grenouilles ayant déjà pondu après six mois de repos et par congélation des extraits d'oeufs comme pour les spermatozoïdes. Le projet nécessite l'utilisation d'extraits d'oeufs de xénopes car c'est le seul système permettant de répliquer in vitro des noyaux eucaryotes avec une excellente efficacité. Cependant les expériences remplaceront autant que possible les noyaux de spermatozoïdes par de l'ADN nu ou des noyaux de cellules en culture. L'environnement est raffiné par adjonction de tubes de PVC à bords lisses non coupants que les animaux peuvent utiliser pour s'abriter et qui n'affectent pas la qualité de l'eau.

1530- L'objet général du projet est d'évaluer la faisabilité et l'efficacité de l'administration de vecteurs de type virus adéno-associé (AAV), dont le rôle est de transporter et intégrer des gènes d'intérêt dans différentes parties du système nerveux (cerveau, moelle épinière, nerf périphérique). La capacité à atteindre des cibles spécifiques - régions, types cellulaires (neurone, astrocyte, oligodendrocyte, etc.) - sera également testée.

L'administration des vecteurs se fera par voie chirurgicale (intracérébrale, intrathécale, intracérébroventriculaire, intrasciatique). Les vecteurs exprimeront dans un premier temps des gènes rapporteurs (pour valider l'efficacité de la méthode d'administration) puis, pour chaque pathologie, le gène thérapeutique concerné. L'objectif final est de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour combattre des maladies neurodégénératives rares, graves et sans traitement aujourd'hui, en particulier les leucodystrophies génétiques de l'enfant, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Huntington. Ainsi, pour chaque pathologie ciblée, cette étude nous permettra de sélectionner la combinaison optimale d'administration (voie d'injection, sérotype de vecteur, promoteur).

Différentes espèces seront utilisées :

- des rongeurs pour valider la faisabilité technique des différentes approches dans une espèce de petite taille, en vue de l'utilisation ultérieure de rongeurs modèles des différentes pathologies ciblées, étape nécessaire pour établir la « preuve de concept » d'une approche thérapeutique.

- des primates non humains (PNH) car une espèce de taille moyenne est nécessaire pour aborder les problèmes de l'administration de grandes quantités de vecteur et du traitement d'organes de dimensions comparables à celles de l'homme. Le choix de l'espèce se fonde sur sa grande homologie avec l'homme, tant sur les plans anatomique et fonctionnel du système nerveux central que du point de vue immunitaire (tolérance comparable).

Tous les animaux utilisés sont nés et ont été élevés en captivité dans des élevages reconnus. Ce projet limitera leur nombre au strict minimum nécessaire (280 rongeurs et 33 primates), et veillera à ce qu'ils ne souffrent ni des procédures d'administration de vecteurs, ni de la présence de vecteurs de thérapie génique dans leurs organes. Des échelles cliniques journalières, un soutien nutritionnel et l'application de critères d'arrêt permettront de veiller au bien-être des animaux.

Tous les vecteurs et les préparations utilisées seront caractérisés *in vitro* avant leur utilisation chez l'animal.

Le choix d'administrer chez un même individu, le même vecteur ou différents lots de vecteurs, portant des gènes traceurs différents pour viser le même organe ou des organes différents diminuera par trois le nombre d'individus utilisés. La réalisation d'études pilotes avec des vecteurs porteurs de gènes traceurs permettra également de diminuer le nombre total d'animaux utilisés sur l'ensemble de l'étude.

Les interventions chirurgicales seront réalisées « en l'état de l'art » par un groupe mixte composé de chirurgiens humains (qui traiteront ensuite les patients par la voie ainsi mise au point), de vétérinaires spécialistes de la chirurgie et du bien-être des primates et de biologistes spécialistes de vecteurs. Cela garantit la qualité des gestes chirurgicaux, leur efficacité et la maîtrise de l'anesthésie et de l'analgésie. L'utilisation de méthodes non invasives, en particulier d'imagerie *in vivo* (échographie peropératoire, IRM), renforcera la qualité des interventions et leur efficacité.

1531- Le noyau subthalamique (NST) est une structure sous-corticale bien connue pour son rôle dans la régulation du mouvement. En effet,

le NST est hyperactif chez les patients parkinsoniens dont les symptômes moteurs bien connus se traduisent par une difficulté à se mouvoir. Par ailleurs, une lésion du NST ou la modulation de son activité par stimulation électrique haute fréquence (SHF) permet d'améliorer les symptômes moteurs associés à cette pathologie. Néanmoins, des observations cliniques et pré-cliniques récentes ont permis de montrer que le NST est également impliqué dans de nombreuses fonctions non-motrices et notamment dans le contrôle des comportements d'inhibition. Ainsi, le dysfonctionnement de l'activité du NST pourrait conduire à des attitudes pathologiques avec des patients présentant des comportements inutiles et sans but précis difficiles à contrôler et/ou à refréner comme c'est le cas chez les patients souffrant de troubles obsessionnel compulsif (TOC).

Les TOC affectent 2.1% de la population mondiale et représentent un coût élevé pour la société avec un coût total estimé à 8.4 milliards

de dollars en 1990 (OMS). Bien que des traitements pharmacologiques associés à des thérapies psycho-comportementales soient proposés pour traiter les TOC, 20 à 30% des patients ne répondent pas à ces approches ce qui est particulièrement problématique quand on sait que ces patients résistants sont fréquemment ceux qui présentent des symptômes sévères (par exemple des compulsions >4h/jour). Il apparaît donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de traiter ces patients TOC résistants. Malheureusement, il est aujourd'hui difficile d'envisager d'améliorer le traitement des TOC quand cette pathologie est encore elle-même très mal comprise. Des données expérimentales et pré-cliniques récentes associées à des modèles computationnels proposent néanmoins la voie reliant directement le noyau subthalamique au cortex (ou voie hyperdirecte) comme un candidat idéal impliqué dans les TOC. Dans ce contexte, la voie hyperdirecte corticosubthalamique étant encore mal connue, ce projet a pour objectif de mieux comprendre la neuroanatomie fonctionnelle de cette voie qui, lorsqu'elle dysfonctionne, semble jouer un rôle crucial dans les TOC.

Dans ce projet, cette voie subthalamo-corticale sera donc étudiée chez le macaque normal à l'aide d'une approche par optogénétique qui permet d'activer sélectivement une population neuronale donnée (ce que ne permet pas les techniques d'électrophysiologie classique) et ainsi d'étudier la connectivité anatomique et fonctionnelle précise des voies neuronales ciblées. Ce projet étant un projet pré-clinique, il doit être mené dans un modèle anatomiquement proche de l'homme afin de pouvoir transposer les connaissances obtenues dans cette étude sur la voie directe subthalamo-corticale chez l'homme et notamment chez le patient TOC. Dans ce cadre, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. C'est pourquoi ce projet sera réalisé chez le macaque et ne nécessitera que 4 animaux. Ce nombre d'animaux a été déterminé grâce à un test statistique (test non paramétrique de Mann-Whitney), ce qui 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. Par ailleurs, l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

1532- La Rétinopathie Pigmentaire (RP) est une maladie oculaire génétique grave qui touche environ une personne sur 3000 au niveau mondial. Cette maladie se caractérise par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet puis à cône, ce qui entraîne une perte progressive profonde de la vision ou une cécité. A ce jour aucun traitement efficace n'est connu.

Il y a quelques années, l'équipe a identifié que le gène *Nxn1* codait pour un facteur ayant un effet protecteur dans la survie des photorécepteurs à cône : le RdCVF « Rod-derived Cone Viability Factor ». Après de nombreuses études réalisées sur l'animal et les résultats prometteurs obtenus, le projet est à l'heure actuelle à la mise au point d'outils thérapeutiques pour des essais cliniques chez l'Homme (injection de RdCVF). Dans le cadre de ces études, l'équipe a détecté qu'il existe un variant du RdCVF chez l'Homme, non connu à ce jour, que l'on appellera ici RdCVF'PTR'.

A ce stade de notre étude, il est primordial de connaître quels sont les effets protecteurs de ce nouveau variant « humain » sur les photorécepteurs à cône.

La comparaison de l'effet protecteur de ces 2 formes de RdCVF (RdCVF « classique » vs RdCVF'PTR') sera testée sur 15 souris transgéniques déficientes en RdCVF et 45 souris rd10, modèle murin de rétinite pigmentaire couramment utilisé en science.

La fonctionnalité des photorécepteurs à cônes ne peut être mesurée que chez l'animal. Au total, cette étude utilisera 75 souris en incluant les animaux contrôles.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des carrés de cellulose et des bâtons à ronger. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

1533- L'ataxie de Friedreich (AF) est la forme la plus répandue des ataxies héréditaires (1/40000), elle se manifeste par une diminution progressive de la coordination motrice et des troubles de l'équilibre associés à une cardiomyopathie hypertrophique. Les tissus les plus affectés sont le système nerveux ainsi que le muscle cardiaque. La pathologie débute au niveau des ganglions dorso rachidiens (DRG) où se situent les gros neurones sensitifs qui dégèrent chez les patients évoluant en une dégénérescence des faisceaux spino-cérébelleux, qui partent du DRG et remontent vers le cerveau. Les patients développent de plus une atrophie d'un moyau cérébelleux profond. Le gène responsable de la pathologie code pour la frataxine, une protéine mitochondriale impliquée dans la biosynthèse des protéines à centre fer-soufre. A ce jour, aucun traitement n'est disponible pour l'AF. Nous avons généré dans le laboratoire des modèles murins de la pathologie qui reproduisent notamment les symptômes neurologiques associés à l'AF. Ces souris constituent un bon modèle pour tester des approches thérapeutiques de la pathologie mais le modèle reste néanmoins imparfait car les souris ont une atteinte cérébelleuse qui n'est pas retrouvée chez les patients et développent de plus une atteinte très tardive de la pathologie. L'objectif de ce projet est de développer un nouveau modèle de souris et de le caractériser afin d'évaluer s'il constitue un meilleur modèle pour l'atteinte sensitive de la pathologie.

Une fois ce modèle caractérisé, nous souhaitons mettre en place une approche thérapeutique basée sur l'utilisation de vecteurs adéno-associés (AAV).

Notre laboratoire a démontré la possibilité de corriger la cardiomyopathie développée par les souris modèles de la pathologie via l'injection intraveineuse d'un vecteur AAV exprimant la frataxine humaine. Notre objectif actuel est de fournir une nouvelle approche thérapeutique visant à corriger/prévenir l'atteinte neurologique dans le modèle souris précédemment établi. Pour cela nous proposons une approche de thérapie génique de manière à délivrer dans les cellules malades le gène codant la frataxine humaine.

Le but de l'expérience est de déterminer si l'expression de la frataxine humaine dans les tissus affectés à l'aide d'un vecteur viral permet de prévenir et/ ou de corriger le phénotype des souris dans le système nerveux central et principalement dans les DRG affectés en premier chez les patients. Notre projet se divisera en différentes phases, tout d'abord la caractérisation du modèle. Enfin, la deuxième phase du projet permettra d'évaluer la prévention de l'apparition des symptômes neurologiques associés à l'AF dans notre modèle. Si nos résultats sont encourageants, la troisième phase consistera à l'évaluation de la correction du phénotype dans notre modèle. Un nombre total de 70 souris sauvages et 155 souris mutantes sera utilisé. Cet effectif correspond au nombre d'animaux nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique suffisante. En parallèle environ 600 animaux seront utilisés pour la création et le maintien de la lignée sur l'ensemble de la durée du projet.

Le but ultime du projet est de trouver une thérapie efficace pour l'AF afin d'améliorer la vie des patients et si possible de stopper ou au moins ralentir la progression de la maladie.

Après avoir évalué la faisabilité d'expression de la fraxine humaine dans un modèle neuronal cellulaire, le passage chez la souris est l'étape indispensable dans le développement de l'approche. Les groupes établis prennent en compte le minimum requis d'animaux pour évaluer l'efficacité de l'approche. De plus, le suivi clinique et le bien être des animaux est primordial dans notre projet.

1534- Notre entreprise développe, fabrique et commercialise des tests de diagnostic pour la quantification de marqueurs biologiques dans le domaine de la biologie clinique humaine.

Le projet doit permettre la production d'anticorps monoclonaux générés à partir de nos propres lignées de cellules en utilisant des souris comme bio-réacteurs. Environ 80 anticorps monoclonaux sont produits en routine, ils constituent la matière première spécifique et essentielle à la fabrication de kits de diagnostic IVD.

La production en ascite de souris permet d'obtenir des quantités importantes d'anticorps avec un niveau de qualité très élevé (spécificité, reproductibilité, stabilité ...).

Les souris utilisées sont élevées par un fournisseur agréé sur prévisionnel de manière à répondre à nos strictes besoins.

Le projet devrait utiliser un maximum de 7000 souris/an, sur la période de 5 ans, soit un maximum de 35000 animaux sur 5 ans, la quantité stricte nécessaire étant ajustée chaque année. Ce nombre d'animaux permet de produire annuellement 700 à 800 grammes d'anticorps.

La règle des 3R est respectée de la manière suivante :

REDUIRE : le choix des hybridomes (bonne productivité), l'optimisation de nos protocoles de fabrication des kits et le choix du type de souris nous permettent de limiter l'utilisation d'animaux à nos stricts besoins en anticorps. un suivi statistique de nos productions nous permet d'optimiser en continu le nombre d'animaux utilisé.

RAFFINER : Les souris sont hébergées dans des conditions conformes à la réglementation en vigueur, une observation quotidienne est réalisée par du personnel compétent et les litières sont changées hebdomadairement. Un planning précis est édité, détaillant les jours de réalisation de chacune des opérations du protocole de production. La méthode d'euthanasie utilisée est en conformité avec la réglementation en vigueur.

REEMPLACER : Nous allons mettre en place une étude pour permettre une substitution progressive de cette méthode de production In-Vivo par des méthodes In-Vitro qui devrait diminuer la quantité de souris utilisée au fil des ans.

1535- L'objectif de ce projet est de mettre en évidence in vivo, le rôle de nouvelles molécules de la signalisation Wnt et l'effet potentiellement thérapeutique d'agents pharmacologiques, modulateurs de la signalisation Wnt, dans la formation et la maintenance de la jonction neuromusculaire (JNM) des mammifères. Pour répondre à cet objectif, des études phénotypiques de la JNM à 2 stades du développement embryonnaire (E14.5 et E18.5) et à 3 stades adultes (P20/P40/P90) ainsi que des tests comportementaux de mesure de l'activité motrice sont envisagés. Le protocole est basé soit sur l'utilisation de diverses souris transgéniques porteuses de mutations ou délétion de tout ou partie de molécules impliquées dans la signalisation Wnt ou dans la formation de la JNM. Les souris utilisées pour ce projet correspondent à 3 lignées transgéniques porteuses d'une délétion ou d'une mutation de tout ou partie du gène codant pour la protéine MuSK et Dok7 et de 3 lignées transgéniques porteuses de délétion de gènes impliqués dans la signalisation Wnt (Vangl2, Frizzled 3 et Celsr3). Un total de 6 souris transgéniques et 2 molécules pharmacologiques sont envisagées pour cette étude. Le protocole porte sur un total de 180 animaux puisque 3 lots de 10 souris par génotype sont utilisés pour tester l'effet de la délétion ou mutation du gène d'intérêt ainsi que l'efficacité et l'effet dose des différents agents pharmacologiques. Ce nombre se justifie pour que les résultats soient statistiquement significatifs à la fois au cours du développement embryonnaire et à 3 stades adultes (P20/P40/P90). Le protocole s'effectue dans le respect de la règle des 3R, en veillant au bien-être des animaux et en limitant leur douleur. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, après les tests comportementaux, les animaux sont euthanasiés et les muscles sont utilisés pour réaliser les études phénotypiques. Les souris mâles seront utilisées pour les tests comportementaux et les femelles pour les analyses phénotypiques.

1536- Ce projet concerne la chronicisation de la douleur. La transition entre douleur aiguë et chronique est un phénomène pathologique aux retombées majeures en clinique humaine, mais au mécanisme encore inconnu. Des données encore non publiées supportent le rôle d'une protéine associée au cytosquelette. En effet il a été observé qu'une injection intraplantaire unique de carragénine entraînant une douleur inflammatoire transitoire (quelques heures) chez des souris sauvages, entraîne une hypersensibilité mécanique à long terme (plusieurs semaines) chez des souris déficientes pour cette protéine du cytosquelette. Ces données ne se basent toutefois que sur une réponse réflexe, un retrait de la patte, qui n'est pas forcément la preuve de la présence d'une douleur. Ces données peuvent avoir une portée clinique s'il s'avère que cette protéine est un élément important de chronicisation de la douleur. Ce projet vise donc à comparer des souris contrôles et déficientes (KO) pour cette protéine du cytosquelette après injection intraplantaire de carragénine pour établir si les souris KO développent une douleur spontanée et les conséquences anxiodépressives d'une douleur soutenue. Cette étude permettra ainsi d'établir si un déficit en cette protéine est bien un élément de chronicisation de la douleur, ouvrant des perspectives thérapeutiques ciblant cette protéine. Le projet 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. Ce projet nécessitera un maximum de 60 souris. Les animaux (souris) sont hébergés de 3 à 5 par cage. Chaque cage est enrichie avec des papiers absorbants pour faire un nid, ainsi qu'avec un morceau de bois.

1537- L'insuffisance cardiaque (IC) est une des principales causes de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. Compte tenu du vieillissement de notre population et la prévalence des maladies telles que le diabète et l'hypertension qui prédisposent les patients à ce syndrome, l'IC va augmenter dans la prochaine décennie. Les traitements actuels ralentissent sa progression néanmoins il reste un réel besoin de développer de nouvelles thérapies et donc la mise en place de modèles expérimentaux appropriés.

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

La stratégie d'étude de nouveaux composés consiste, dans un premier temps à caractériser leurs effets cardiovasculaires en utilisant la télémétrie, l'échographie puis de tester leurs efficacités dans un modèle physiopathologique d'IC qui a été utilisé avec succès pour développer des médicaments actuellement utilisés pour traiter l'IC tels que les inhibiteurs du système rénine-angiotensine.

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

Étant donné la complexité du projet, seules les molécules très avancées pourront être testées ce qui limitera le nombre d'études et nous estimons que nous allons utiliser 1010 chiens sur la période de validation du projet (5 ans).

1538- Dans les systèmes d'élevage de poulets de chair, la mortalité des poussins est plus grande pendant les 10 premiers jours de vie. Pendant cette période, les poussins sont soumis à plusieurs sources de stress telles que des changements de température, de confinement, des vibrations pendant leur transport entre le couvoir et leur installation en bâtiment d'élevage et, la plupart du temps, ils sont privés d'eau de boisson et de nourriture. Si les poussins peuvent puiser leurs ressources dans le sac vitellin pendant les jours qui suivent l'éclosion, il est maintenant bien démontré que leur environnement précoce influence le comportement des poulets adultes, leurs performances de production et leur sensibilité aux maladies. Pour réduire l'usage des antibiotiques et respecter le bien être des poulets dans les systèmes d'élevage, la gestion de la santé des animaux doit évoluer vers le développement de nouveaux moyens prophylactiques et thérapeutiques. Comme un état de stress persistant représente un risque potentiel de problèmes de santé à venir, son dépistage peut contribuer à une meilleure gestion de la santé des animaux et permettre de proposer des pratiques d'élevage pour atténuer les expériences négatives vécues par les jeunes animaux. Une étude précédente menée par notre laboratoire a montré que la mise en élevage retardée (MER) de poussins de chair pendant 24h (absence d'eau de boisson, d'aliment, simulation de transport et variation thermique) diminuaient significativement leur croissance jusqu'à l'âge d'abattage (J35). Nous formulons l'hypothèse que les poussins pourraient mobiliser leur capacité à s'auto-médicamenter en situation de stress dans un environnement dans lequel des huiles essentielles (HE) seront mises à disposition. Dans nos conditions, une HE sera distribuée dans l'eau et mise à disposition par parquet d'élevage en plus de l'accès à l'eau de boisson.

Les principales étapes du projet sont i) d'utiliser le modèle expérimental développé au laboratoire pour reproduire les contraintes d'élevage auxquelles peuvent être exposés les poussins, ii) de tester la capacité des poussins à consommer l'HE mise à disposition pour gérer les contraintes auxquelles ils sont exposés, iii) d'évaluer les conséquences en termes de croissance, de comportement et de santé à court terme.

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

REMPLACEMENT : compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico.

REDUCTION : Pour des raisons de limite de dispositif expérimental, deux expériences sont planifiées pour tester 5 HE incluant au total 384 animaux. Le nombre d'animaux engagé dans ces expériences est défini pour tenir compte de la variabilité inter-individuelle des différents critères mesurés. Seulement 48 animaux seront euthanasiés en vue de prélèvements. Les 336 animaux restant retourneront en bâtiment d'élevage à l'issue des expériences.

RAFFINEMENT : Les poussins seront hébergés sur des parquets à une densité très inférieure au maximum autorisé. Un minimum de 4 poussins par groupe est nécessaire pour créer des interactions sociales entre les poussins. Les animaux resteront en groupe et auront la possibilité d'explorer une plateforme. Ils seront visités deux fois par jour et toute manifestation de symptômes persistants tels que définis dans le point limite engendrera l'euthanasie des animaux par le personnel qualifié.

1539- La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire des articulations. Elle est due à un dérèglement du système immunitaire entraînant un gonflement des articulations qui se déforment en l'absence de traitement. Dans 20% des cas, cela entraîne une incapacité fonctionnelle. L'inflammation se situe dans la membrane synoviale qui délimite l'articulation et fait la jonction entre les extrémités de deux os recouverts à leur extrémité de cartilage. Cette membrane sécrète un liquide synovial qui lubrifie l'articulation et la rend mobile. L'inflammation entraîne deux phénomènes : une sécrétion excessive de liquide et un épaississement de la membrane. Ceci va entraîner une lésion du cartilage, de l'os et éventuellement des tendons à proximité.

Le diagnostic précoce de cette pathologie n'est pas toujours facile car les signes peuvent évoquer d'autres maladies. Le projet s'inscrit donc dans le cadre du développement d'un outil permettant un diagnostic précoce et spécifique de cette maladie.

Notre plateforme de recherche possède un imageur dédié à la recherche sur le petit animal ayant plusieurs modalités. Un des volets de recherche du laboratoire est celui de mettre au point des nouveaux traceurs à la fois sensibles et spécifiques du cartilage.

Le DPA-714 est un ligand du récepteur TSPO, surexprimé par les macrophages activés. Associé à un isotope radioactif (¹⁸F), il permet l'imagerie de neuro-inflammation du système nerveux central. Nous avons également démontré son potentiel comme traceur d'inflammations périphériques dans un modèle d'arthrose.

L'objectif de ce projet est d'utiliser ce radiotracer comme nouvel outil diagnostique pour la PR.

Le modèle de polyarthrite rhumatoïde utilise déjà fait l'objet d'une demande d'autorisation en mars 2014 et a été validé par le comité d'éthique interne.

La PR est une pathologie qui touche l'organisme entier d'un individu. Son étude nécessite un modèle in vivo et ne peut se faire sur des cultures in vitro.

Le nombre d'animaux utilisés est le plus bas possible pour avoir des résultats interprétables, soit 5 rats. Comme l'étude devra être répétée 1 fois pour valider les résultats, cela fait un total de 10 rats.

Le modèle utilisé est déjà validé et connu par l'équipe de recherche, ce qui permet d'anticiper sur les points limites de l'étude. Une couverture analgésique sera assurée et une surveillance particulière sera faite aux animaux.

1540- 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 627 000 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 primate non humain (PNH), 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 PNH 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, splénectomies). 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.

1541- Les polykystoses rénales sont des pathologies caractérisées par un pronostic particulièrement sombre et à moyen terme, une évolution vers l'insuffisance rénale terminale. Cette maladie touche 1 personne sur 400. Chez 50% des malades, les formations kystiques sont responsables de l'évolution vers une insuffisance rénale terminale. En France, 10% des dialysés le sont à cause de cette pathologie orpheline.

A ce jour, seuls les bloqueurs du récepteur à la vasopressine de type 2, notamment la molécule tolvaptan, ont fait preuve d'efficacité thérapeutique chez l'Homme. Mais leur développement est freiné à cause de leur toxicité sur le foie. Nos récents travaux ont permis de découvrir 10 toxines de serpent, nommées mambaquarétines, capables de bloquer le récepteur V2 à la vasopressine. Pour une de ces toxines, nous avons confirmé une activité de blocage de la maladie sur un modèle rongeur. Ces résultats prometteurs ont été brevetés et doivent maintenant être consolidés afin de sélectionner parmi les 10 mambaquarétines le meilleur candidat thérapeutique, puis de travailler sa mise en forme pharmaceutique. En effet, la polykystose rénale étant une maladie chronique, les patients devront être traités sur plusieurs années. Il est donc important de développer une formulation permettant d'administrer le peptide qu'une fois par semaine, voire de développer une formulation orale du peptide thérapeutique.

Le projet prévoit plusieurs types d'études : la pharmacocinétique, la pharmacodynamique, l'immunogénicité, et la biodistribution. Les études précliniques requièrent de vérifier l'efficacité de l'agent thérapeutique in vivo chez plusieurs espèces animales.

Dans le cadre de cette étude les rongeurs sont nés et élevés dans des élevages agréés.

Leur nombre (788) a été déterminé par un test statistique appliqué pour les expériences menées. Tout au long de l'étude, l'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance. Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus, et dans ce cas l'avis du vétérinaire est demandé pour mettre en place les traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Entre les périodes d'expérimentations, les animaux seront hébergés en groupe, dans des cages équipées afin d'offrir un environnement enrichi, dans un environnement approprié. L'accès à l'eau et à la nourriture sera libre et sans restriction. Le temps de passage des animaux dans les cages métaboliques sera limité au minimum nécessaire.

1542- La tuberculose (TB) est l'une des trois pathologies infectieuses à agent étiologique unique les plus meurtrières. Elle est causée par l'infection par voie aérienne de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Parmi les axes principaux de recherche dans cette pathologie figurent la recherche de cibles thérapeutiques (sur l'hôte ou la mycobactérie elle-même) ainsi que la recherche d'un vaccin plus efficace que le vaccin actuel, le BCG. Notre équipe contribue à ces deux axes de recherche en tentant de comprendre les mécanismes de l'interaction hôte-pathogène dans cette pathologie, ce qui implique l'utilisation de modèles cellulaires et animaux d'infection par Mtb. La spécificité de notre travail est de mettre en interaction des hôtes cellulaires ou animaux avec des souches mycobactériennes chacun portant ou non des déficiences particulières. Cette approche nous a permis d'identifier des cibles d'actions potentielles sur les mycobactéries ou l'hôte ainsi que des candidats vaccins. Le présent projet s'inscrit dans ce cadre et vise à étudier l'interaction hôte-Mtb dans différents modèles murins présentant des sensibilités différentes à l'infection, naturellement (C57BL/6 ou C3HeB/FeJ) ou après des modifications génétiques conduisant à des déficits dans des réponses immunitaires dont nous souhaitons évaluer l'impact lors de l'infection par Mtb. Par ailleurs, des souches mutantes de Mtb dont nous avons démontré le caractère atténué dans des modèles cellulaires seront également testées ainsi que des souches bactériennes manipulées de façon à pouvoir induire leur suicide de façon contrôlée. Dans l'ensemble de ces études, les animaux infectés seront utilisés pour déterminer des paramètres de sensibilité à l'infection (survie, charges bactériennes, histologie) ainsi que des paramètres immunologiques (moléculaires et cellulaires). Le nombre maximal d'animaux utilisé sera de 8153 souris se répartissant 3461 souris C57BL/6, 2115 souris C3HeB/FeJ, 780 souris SCID et 1797 souris possédant une mutation ciblée sur un gène de la réponse immunitaire (et sur fond génétique C57BL/6). Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 4 étapes dans notre raisonnement.

Tout d'abord, les expériences réalisées font suite à des étapes de validation dans des modèles cellulaires : ainsi les expériences proposées sont réalisées au stade où les méthodes de remplacement de l'expérimentation animale ont été exploitées et s'avèrent suffisamment prometteuses pour utiliser le modèle intégré murin.

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

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

Finalement, l'expérience des années précédentes nous a fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir en première intention des résultats statistiquement significatifs.

La souffrance et/ou le stress animal sont présents à trois niveaux dans nos expériences : i) dans la constitution de certains modèles animaux reposant sur la technique des chimères hématopoïétiques (nécessitant une irradiation des animaux puis une phase de reconstitution immunologique pendant laquelle les animaux sont sensibles aux infections) ; ii) lors de l'inflammation pulmonaire chronique induite par l'infection et iii) lors de l'infection induite chez des animaux immunodéficients. Ces trois niveaux de douleurs font l'objet d'une prise en charge spécifique indiquée dans les procédures respectives et déjà appliquées dans nos projets antérieurs.

1543- En France, on compte 37 000 nouveaux cas par an de cancer du poumon (73% des hommes) et ce cancer se retrouve à la quatrième position derrière le cancer de la prostate, du sein et du colon-rectum. Par contre, il est situé à la première place en terme de mortalité : 28 700 décès annuels. En effet, très souvent diagnostiqué tardivement du fait de l'absence de symptôme, des métastases sont souvent présentes du fait d'une forte propagation des cellules tumorales.

Une des meilleures armes pour lutter contre cette pathologie reste les campagnes de prévention (plan de lutte antitabac par exemple). Celles-ci commencent à montrer leur efficacité puisqu'une baisse régulière de la mortalité est observée chez les hommes. Néanmoins, les femmes (fumant de plus en plus) commencent à prendre actuellement le relais. Elles entretiennent la progression constante du nombre de nouveaux cas et de décès avec une incidence du cancer du poumon qui a été triplée ces 20 dernières années. De plus, le taux de fumeurs est à la hausse depuis quelques années chez les jeunes (15-19 ans) : 25% fument.

Les traitements actuels dépendent de l'état d'avancement du cancer et sont basés sur 3 axes : chirurgie et/ou radiothérapie et/ou chimiothérapie. Concernant les chimiothérapies, plusieurs traitements existent sur le marché mais des effets indésirables sont très souvent observés par le manque de sélectivité du traitement qui va détruire les cellules cancéreuses mais également d'autres types de cellules (cellules constituant les cheveux, les ongles, le tube digestif ou alors les globules blancs ayant un rôle majeur dans la défense du corps humain).

Le développement de nouveaux traitements de chimiothérapie, plus ciblées, restent une voie majeure dans la recherche contre le cancer. Depuis quelques années, les nanoparticules sont en plein développement. Elles permettent de s'accumuler au niveau de tumeur par un ciblage tumoral passif mais également protègent les cellules saines de la molécule anticancéreuse (encapsulée dans les nanoparticules).

Ainsi, nous avons développé 2 systèmes nanoparticulaires qui permettent d'encapsuler une molécule anticancéreuse : le docétaxel. Cette molécule est déjà donnée dans les traitements actuels mais présente de forts effets secondaires. Des expériences précédentes ont montré que les nanoparticules chargées en docétaxel ont les effets désirés : elles agissent sur les cellules cancéreuses, et n'affectent pas les cellules saines. Nous voulons maintenant montrer grâce à l'expérimentation animale que nos formes nanoparticulaires sont aussi efficaces voire plus que la forme commercialisée utilisée dans les traitements actuels. L'utilisation des animaux est ici indispensable comme il n'existe aucune méthode alternative pour l'objectif que l'on veut montrer. Le modèle tumoral sera induit sur des souris (120 animaux) et les divers traitements seront testés et comparés au médicament commercial. Ce nombre de souris a été réduit au maximum pour que les résultats obtenus soit exploitables et non critiquables. Finalement, durant toute l'étude, les animaux seront observés quotidiennement pour leur éviter de souffrir. Des points limites liés au comportement de l'animal (état général et masse de l'animal) et à la taille de la tumeur (toujours inférieure à 10% de la masse totale de l'animal) ont été fixés et les animaux les atteignant seront sortis de l'étude. Ce projet s'inscrit dans une démarche purement éthique appliquée à l'expérimentation animale en respectant la « règle des 3R ».

1544- L'immunothérapie anti-cancéreuse dont le but est d'activer le système immunitaire de l'hôte pour contrôler et supprimer la tumeur, a révolutionné les traitements anti-cancéreux ces dernières années. Alors que plusieurs stratégies immunothérapeutiques ont obtenu des résultats cliniques prometteurs, le potentiel thérapeutique des vaccins anti-cancéreux n'a pas encore atteint ces niveaux de réussite. Cela peut être dû à l'inhibition du système immunitaire par les cellules cancéreuses ou immunosuppression, ou à un manque de connaissance liée aux antigènes tumoraux qui sont indispensables au développement de vaccins efficaces.

De précédents travaux ont identifié que l'autophagie, un processus cellulaire qui permet à la cellule de digérer et de recycler son contenu en particulier en condition de stress, est également capable d'augmenter les réponses immunes contre le cancer lorsque ce processus est induit dans les cellules cancéreuses par certaines chimiothérapies. L'autophagie est connue pour modifier le répertoire de certaines protéines exprimées à la surface de cellules cancéreuses appelées antigènes tumoraux. La présentation de ces nouveaux antigènes à la surface des cellules tumorales pourrait permettre un meilleur ciblage des réponses lymphocytaires T via un vaccin.

Dans ce contexte, une méthode de criblage a été développée afin d'identifier chez la souris des antigènes tumoraux spécifiquement exprimés à la surface de cellules tumorales subissant l'autophagie après chimiothérapie et pouvant être reconnus par le système immunitaire. Le but de ce projet est de valider ou non l'hypothèse selon laquelle l'autophagie induite par des chimiothérapies immunogéniques pourrait définir un nouveau répertoire d'antigènes tumoraux permettant un ciblage plus efficace par les lymphocytes T. Pour cela, nous souhaitons étudier chez la souris le potentiel immunogène de ces antigènes peptidiques comme vaccins anti-tumoraux dans le but de valider ou non la preuve du concept et transposer ces résultats chez l'homme.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. En effet, les antigènes tumoraux qui font l'objet de cette étude ont été développés à partir d'un modèle de tumeur murin et ce modèle de tumeur nous est indispensable pour étudier l'immunité anti-tumorale et le potentiel prophylactique et curatif de ces vaccins anti-tumoraux.

Durant ce projet, 864 souris seront utilisées pendant la période décrite de 3 ans. Ce nombre se justifie par la quantité importante de peptides à étudier et aux différents types de traitement, prophylactique et curatif.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement, d'une part, car elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur), et d'autre part, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en terme de statistiques. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Ainsi, les prélèvements sanguins hebdomadaires réalisés à la veine sous-mandibulaire n'excéderont pas 50 µl 2 fois par semaine ou 100 µl 1 fois par semaine. Les prélèvements sanguins intracardiaques terminaux seront réalisés sur les souris après anesthésie sous isoflurane, suivis de l'euthanasie des animaux par dislocation cervicale.

1545- D'après l'organisation mondiale de la santé, l'arthrose est une des dix maladies les plus invalidantes dans les pays développés. A l'échelle mondiale, 9.6% des hommes et 18% des femmes âgés de 60 ans en souffrent. Dans les prochaines décennies, le vieillissement de la population couplé à des facteurs de risques tels que l'obésité laisse suggérer que le nombre de personnes atteintes d'arthrose va continuer d'augmenter.

Grâce à de nombreuses études, les connaissances sur l'arthrose se sont améliorées. Désormais, cette pathologie n'est plus considérée comme une maladie associée seulement à des lésions du cartilage mais comme une maladie provoquant des anomalies pathologiques au niveau de nombreuses structures telles que les muscles péri-articulaires, les ligaments, la synovie, le système neurosensoriel et l'os. Ces nouvelles données permettent la création de nouvelles molécules cibles permettant de prévenir le développement de l'arthrose.

Ce projet a donc pour objectif d'évaluer l'efficacité de différentes molécules et/ou combinaison de molécules sur le développement de l'arthrose.

Le modèle animal choisi est le cobaye Dunkin Hartley car cet animal développe spontanément de l'arthrose au niveau des hanches et des genoux entre 3 et 15 mois. C'est donc le modèle le plus approprié pour étudier le développement de l'arthrose car il permet de mimer le développement de l'arthrose et la progression de la maladie chez l'humain.

Au cours de ce projet, les animaux seront suivis entre 3 et 7 mois. Environ 250 Guinea Pigs Dunkin Hartley seront utilisés au cours de ce projet afin de répondre à l'objectif. Un minimum de 10 animaux par groupe sera prévu afin de pouvoir réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus.

Le recours à l'expérimentation animale est nécessaire lors de ce projet afin de pouvoir évaluer l'efficacité de différents produits sur le développement et la progression de l'arthrose. Actuellement, il n'existe pas de méthode alternative permettant de modéliser l'apparition et le développement de l'arthrose et d'évaluer l'efficacité de molécules thérapeutiques dans un organisme vivant entier.

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

Ce projet permettra d'évaluer l'efficacité de nouveaux traitements pouvant agir sur le développement et la progression de l'arthrose et ainsi proposer sur le marché de nouvelles molécules.

1546- Les bactéries intestinales, ou microbiote intestinal, participent à de nombreux processus physiologiques. Cependant, un déséquilibre de cette flore ou dysbiose entraîne des répercussions sur l'immunité et peut être responsable de pathologies telles que l'obésité, les maladies auto-immunes et le cancer. Or, chez les patients atteints de cancer, de nombreux facteurs concourent à l'installation de cette dysbiose, comme la toxicité des chimiothérapies sur l'épithélium intestinal, la prescription d'antibiotiques à large spectre pendant la neutropénie ou les corticoïdes entraînant l'anergie lymphocytaire. Nous avons montré que certaines bactéries intestinales sont nécessaires à l'efficacité du cyclophosphamide et qu'une dysbiose induite par des traitements antibiotiques a des conséquences néfastes sur l'efficacité anti-tumorale de cette chimiothérapie, en particulier au niveau de l'immunité anti-tumorale. Nous avons également constaté que le cyclophosphamide agit sur le microbiote intestinal en créant une dysbiose et sur l'épithélium intestinal en augmentant sa perméabilité.

A présent, nous souhaitons approfondir les mécanismes d'action du cyclophosphamide en relation avec le microbiote intestinal et l'épithélium intestinal. En particulier, nous souhaitons évaluer l'implication de différentes voies cellulaires

activées en condition de stress cellulaire à l'aide de composés inhibiteurs ou activateurs et de souris transgéniques déficientes pour l'une de ces voies.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. En effet, les modèles de tumeur disponibles ont été développés chez la souris et les modèles de souris transgéniques sont indispensables à l'étude de l'immunité anti-tumorale après traitement par chimiothérapie.

Durant ce projet, 6420 souris seront utilisées pendant la période décrite de 5 ans. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes voies de signalisation étudiées. Ce projet nécessitera plusieurs expérimentateurs.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement, d'une part, car elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur), et d'autre part, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en terme de statistiques. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Ainsi, les prélèvements sanguins hebdomadaires réalisés à la veine sous-mandibulaire n'excéderont pas 50 µl 2 fois par semaine ou 100 µl 1 fois par semaine. Les prélèvements sanguins intracardiaques terminaux seront réalisés sur les souris après anesthésie sous isoflurane, suivis de l'euthanasie des animaux par dislocation cervicale.

1547- Les perturbateurs endocriniens (PE) sont des agents exogènes susceptibles d'interférer avec les systèmes biologiques régulés par les hormones, notamment la reproduction. Leurs influences peuvent se manifester différemment, et à distance de l'exposition, en fonction : de la période d'exposition (pré-conceptionnelle, fœtale, post-natale, pubertaire ...), de la dose d'exposition (effets non dose-réponse), de la multiplicité de l'exposition (effet cocktail), le tout remettant en cause les dogmes de la toxicologie classique.

L'embryon préimplantatoire est sensible à son environnement, principalement via des modifications épigénétiques (par exemple des modifications de la méthylation de l'ADN, qui contrôle l'expression des gènes). Ces modifications peuvent avoir des répercussions à long terme sur la santé. Les PE sont une source possible de perturbations embryonnaires notamment via les techniques de manipulations in vitro des gamètes et des embryons utilisées en Assistance Médicale à la Procréation. Évaluer les effets des PE sur un modèle d'embryon animal pertinent est capital pour savoir si ces techniques sont susceptibles d'être délétères chez l'homme et si elles doivent être améliorées. L'objectif du projet est de soumettre in vitro des embryons préimplantatoires de lapin à 3 PE différents (bisphénol A, PCB153, p,p'-DDE), isolément et de façon combinée, afin d'en évaluer les effets sur les profils de méthylation de l'ADN et sur le transcriptome embryonnaire. Pour cela, 50 lapines adultes de 20 semaines recevront une stimulation ovarienne par injections bi-quotidiennes sous-cutanées (3 jours) et 1 injection intraveineuse, permettant d'augmenter le nombre d'embryon obtenus par lapine. Durant ce temps d'élevage, les lapines sont surveillées quotidiennement par des animaliers formés et expérimentés. Le temps de repos entre deux injections suffisant pour que les animaux retrouvent leur état normal de stress, et la manipulation bienveillante des animaux, nous poussent à croire que les animaux ne subiront aucun dommage durant cette expérimentation. Ceci étant, il est entendu que tout animal présentant des signes anormaux (perte d'appétit, crottes molles, etc.) sera sorti de la procédure et soigné, selon le diagnostic vétérinaire établi. Une insémination artificielle de sperme frais sera réalisée. Les zygotes (ovocytes fécondés) seront recueillis dans les trompes après sacrifice des animaux puis cultivés in vitro dans un milieu enrichi ou non en PE. Après 3 jours de culture, les embryons seront analysés pour en évaluer le transcriptome (identification d'un niveau d'expression de l'ensemble des gènes) et la méthylation de l'ADN embryonnaire. Des comparaisons statistiques de ces données permettront d'identifier les effets spécifiques à chacun des 3 PE étudiés, et d'évaluer des actions synergiques éventuelles de leurs associations. L'embryon pré-implantatoire de mammifère n'a pas de modèle cellulaire réellement pertinent, pas même les cellules souches embryonnaires dont il a été montré qu'elles différaient en termes de transcriptome. C'est une des raisons pour lesquelles la recherche sur l'embryon humain est maintenant autorisée par la législation française. Le lapin est une espèce plus représentative, en terme de développement embryonnaire préimplantatoire, de l'homme que ne le sont les rongeurs. Le sacrifice des animaux est rendu nécessaire par la difficulté d'accès au site de recueil des zygotes (les trompes) et la célérité nécessaire à ce recueil afin de ne pas altérer les capacités de développement in vitro des embryons. Le nombre d'animaux nécessaires tient compte du nombre moyen d'embryons obtenus après stimulation, du taux moyen de développement in vitro, de la nécessité de travailler sur des pools d'embryons pour les analyses moléculaires et de répéter ces analyses pour leur conférer une validité statistique. Le projet associe les compétences apportées par 3 équipes en embryologie moléculaire, en toxicologie et en élevage cunicole.

1548- L'asthme est une maladie du système respiratoire touchant les voies aériennes inférieures définie comme étant une gêne respiratoire à l'expiration.

L'asthme est un problème mondial, et sa prévalence est en constante augmentation. En effet, cette maladie affecte 5 à 10% de la population au niveau des pays industrialisés. Ceci représente environ 300 millions de personnes à travers le monde. Avec un coût annuel de 300 à 1.300 \$/patient, l'asthme est un problème majeur de santé publique.

La prise en charge de l'asthme reste insuffisante notamment dans ses formes sévères et ce malgré les thérapies existantes. L'absence de traitements efficaces souligne la nécessité et l'urgence d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. L'utilisation de modèles animaux représente un outil indispensable pour une meilleure caractérisation des mécanismes physiopathologiques de l'asthme et l'évaluation de molécules d'intérêt en recherche préclinique. Les modèles murins sont particulièrement attractifs en raison de leur rapidité, leur faible coût et l'existence de souches génétiquement modifiées.

Nous utiliserons un modèle d'asthme allergique aggravé employant à la fois de l'ovalbumine et les lipopolysaccharides pour la sensibilisation des souris. L'objectif de notre projet sera d'étudier l'expression de la protéine d'intérêt et d'explorer son rôle dans l'asthme aggravé.

Dans un premier temps, nous souhaitons étudier l'expression de la protéine d'intérêt et identifier les cellules exprimant cette protéine dans les voies aériennes des souris asthmatiques. Dans un deuxième temps nous nous intéresserons à l'impact de l'inactivation de la protéine d'intérêt sur les symptômes associés à l'asthme aggravé. Enfin, nous évaluerons l'effet d'anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt sur les symptômes de l'asthme.

Remplacement :

Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle in vitro ou de culture cellulaire ne nous permet d'étudier les symptômes de l'asthme aggravé. De plus, la souris est déjà utilisée et bien étudiée dans l'asthme, du fait des similitudes avec la pathologie humaine. Le modèle de souris développé présentera des symptômes similaires aux patients humains atteints d'asthme aggravé.

Raffinement :

Le modèle utilisé ici n'engendre pas de douleur particulière. En cas d'observation de douleur, les souris recevront un traitement analgésique, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient mis à mort pour éviter toute souffrance. Enfin, le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés sera optimisé pour obtenir des résultats exploitables. En effet, 192 animaux au total seront utilisés afin d'obtenir une puissance statistique suffisante à l'étude (12 animaux par groupe et par génotype). De plus, les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter toute redondance dans l'étude des phénotypes engendrés par la mutation

1549- Les patients atteints de cancer colorectal dont la tumeur n'a pas disséminé bénéficient de la chirurgie comme première ligne de traitement ainsi que de traitements systémiques par chimiothérapie associée ou non à des thérapies ciblées spécifiques, telles que le Cetuximab ou le Bevacizumab. En plus de l'effet cytotoxique direct des chimiothérapies, il est à présent établi que le système immunitaire joue un rôle important dans les mécanismes anti-tumoraux et la réponse clinique des patients.

Il a été mis en évidence que différents composants de la flore intestinale ou microbiote intestinal pouvaient avoir un rôle dans la protection mais également dans le développement du cancer colorectal, comme dans le cas d'une dysbiose (déséquilibre de la flore intestinale). De plus, de récents travaux publiés chez la souris ont démontré l'importance du microbiote intestinal dans l'efficacité anti-tumorale de l'immunothérapie CpG + anti-IL-10R et des chimiothérapies telles que le cyclophosphamide et l'oxaliplatine, cette dernière étant un des principaux agents chimiothérapeutiques contre le cancer colorectal.

Actuellement, dans le cadre d'un projet de recherche étudiant les facteurs immunologiques associés à la réponse à la chimiothérapie chez les patients atteints de cancer colorectal, nous collectons le contenu de côlon de patients atteints de cancer colorectal après colectomie dans le but de réaliser des expériences de transplantation fécale chez la souris. Ces manipulations vont nous permettre de caractériser les dysbioses des patients liées à la progression cancéreuse et la réponse à la chimiothérapie chez la souris, en étudiant la conséquence sur 1) l'implantation et la cinétique tumorales (lignée tumorale de carcinome de côlon murin), 2) l'efficacité anti-tumorale de la chimiothérapie (oxaliplatine) ainsi que les paramètres immunologiques et métaboliques sous-jacents. Ces résultats devraient aider à développer un modèle permettant de sélectionner les patients pouvant bénéficier positivement d'une thérapie de type transplantation fécale (avec des bactéries bénéfiques) comme traitement adjuvant (additionnel) de la chimiothérapie.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire ex-vivo du fait de sa complexité. Par ailleurs, le modèle de tumeur utilisé dans ce projet a été développé chez la souris et est indispensable à l'étude de l'immunité anti-tumorale après traitement par chimiothérapie.

Ce projet se déroulera sur plusieurs années et nécessitera plusieurs expérimentateurs. Le projet nécessitera 7992 souris pour 5 ans. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes combinaisons thérapeutiques, l'étendue de la diversité de la flore intestinale ainsi que les différentes voies de signalisation étudiées.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement, d'une part, car elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur), et d'autre part, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Enfin, les manipulations seront réalisées sous anesthésie, avec les méthodes à l'état de l'art et dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux.

1550- L'objectif de ce projet est d'étudier les fonctions cardiaques de façon non invasives et au cours du temps dans un modèle de souris des Dystrophies myotoniques (DM). Avec 1 individu touché sur 8000, ces maladies sont des maladies musculaires très invalidantes les plus communes chez l'adulte. Ces patients présentent des troubles sévères du fonctionnement du cœur qui se traduisent par des arrêts cardiaques fatals.

Ces maladies sont dues à des anomalies génétiques de SCN5A qui entraîne des altérations des muscles. Nous espérons que la compréhension de l'analyse de ce gène muté nous permettra de mieux comprendre voire de traiter dans le futur ce type de maladie chez l'Homme.

Remplacement :

Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle in vitro ou de culture cellulaire ne nous permet d'étudier les symptômes cardiaques de ces maladies. De plus, la souris est un modèle d'atteinte cardiaque déjà utilisé et bien étudié, du fait des similitudes avec la pathologie humaine. Le modèle de souris développé présentera la même mutation que les patients humains. Nous espérons que ces animaux développeront les symptômes de la maladie, nous permettant ainsi (1) de comprendre les mécanismes provoquant cette maladie, et (2) tester des médicaments afin de trouver, enfin, une thérapie pour ces maladies.

Raffinement :

Afin de limiter la douleur induite par les symptômes, nous n'étudierons que les premières étapes de l'apparition des symptômes par des méthodes non invasives (électrocardiogramme et échographie cardiaque) et les animaux seront sacrifiés avant que la phase terminale de la maladie (crise cardiaque) n'apparaisse. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient mis à mort pour éviter toute souffrance. Enfin, le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés sera optimisé pour obtenir des résultats exploitables. En effet, 78 animaux au total seront utilisés afin d'obtenir une puissance statistique suffisante à l'étude (8-9 animaux par groupe et par génotype). De plus, les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter toute redondance dans l'étude des phénotypes engendrés par la mutation.

1551- Le but du projet est de déterminer l'impact de réarrangements (délétion et duplication) d'une région du chromosome 17 sur la fonction cardiaque et notamment des anomalies anatomiques et fonctionnelles.

Le laboratoire demandeur s'intéresse à deux syndromes de déficience intellectuelle associés à des réarrangements (délétion et duplication) d'une région du chromosome 17. En plus d'une déficience intellectuelle, 40% des patients présentent des malformations cardiaques. Par des méthodes de génétique, le laboratoire demandeur a généré les souris modèles pour les deux syndromes. Les animaux sont porteurs des mutations similaires à celles observées chez les patients. Des tests de comportement indiquent que les souris présentent un déficit de mémoire. Une exploration cardiaque par échographie permettra de déterminer si les souris présentent également des anomalies au niveau cardiaque.

Ce projet va donc être réalisé en utilisant des souris génétiquement modifiées, seuls animaux pour lesquels les techniques de mutation génétique sont actuellement bien maîtrisées. De plus l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode in vitro ou in silico ne peut actuellement se substituer à l'étude de ces réarrangements chromosomiques dans son environnement et ses interactions au sein de l'organisme.

Pour procéder à cette étude, des souris mutantes avec une délétion ou une duplication d'une région précise du chromosome 17 sont générées et étudiées.

48 animaux mâles au total seront utilisés afin d'obtenir une puissance statistique suffisante à l'étude (entre 5 et 7 animaux par groupe et par mutation, en deux cohortes).

Ce projet permet, de par sa grande précision, de réduire le nombre d'animaux utilisés satisfaisant les exigences de réduction. Sa validité de construction répond aux exigences de raffinement des critères éthiques.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux.

Les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter toute redondance dans l'étude des phénotypes engendrés par la mutation.

L'échographie cardiaque est un examen qui permet d'obtenir et de mesurer, chez la souris comme chez l'homme, des images du cœur afin d'étudier son anatomie et sa fonction.

1552- L'électrocardiographie (ECG) est une représentation de l'activité électrique du cœur. Cette activité électrique est recueillie par des électrodes à la surface de la peau. Chez l'homme, l'ECG à 12 dérivations a été standardisé par une convention internationale. Les études de l'ECG permettent d'avoir une idée en 3 dimensions de l'activité électrique du cœur. Chez la souris, nous sommes actuellement capables d'étudier une seule dérivation mais il est possible d'en étudier 10 chez la souris. L'objectif de ce projet est de valider l'exploration de l'ECG en utilisant plusieurs dérivations chez la souris en utilisant une technique déjà publiée.

Remplacement :

Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle in vitro ou de culture cellulaire ne nous permet de remplacer l'utilisation de souris pour étudier l'activité électrique du cœur.

Raffinement :

Avec ce protocole nous nous sommes attachés à éviter au maximum toutes formes de souffrance des souris impliquées. Afin de limiter la douleur qui pourrait être induite par l'étude de l'électrocardiogramme, méthode très peu invasive, les souris pourront recevoir un traitement analgésique et anti-inflammatoire si des symptômes de douleurs devaient apparaître. Enfin,

le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux.

Réduction :

Au cours de cette validation, nous nous attacherons à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés en réutilisant les mêmes animaux tout en respectant un temps de repos après chaque mesure afin d'atteindre une reproductibilité fiable

Le nombre d'animaux utilisés sera optimisé pour obtenir un bon entraînement au placement des électrodes ainsi que des résultats exploitables. En effet, 30 animaux au total seront utilisés afin d'obtenir une bonne reproductibilité des signaux électriques pour chaque dérivation.

1553- La présente demande est rédigée dans le but d'utiliser le modèle de xénogreffe chez la souris afin de déterminer si le canal TRPV2 représente une cible thérapeutique pertinente pour lutter contre le développement des métastases des cellules cancéreuses humaines.

Les canaux ioniques représentent une vaste famille de protéines qui assurent le passage des ions au travers des membranes cellulaires. Ils participent virtuellement à tous les processus biologiques en initiant ou modulant de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. En provoquant le passage de ces ions au travers de la membrane plasmique en réponse à divers stimuli, ces protéines permettent en effet à la cellule de communiquer avec son environnement et d'engager des réponses cellulaires appropriées (e.g. prolifération, migration,...). En raison de leur importance biologique, de leur accessibilité à une modulation pharmacologique et de leur exposition à la surface cellulaire, ils constituent une cible majeure des médicaments actuels. Néanmoins, bien que souvent exprimés de façon aberrante dans les tumeurs où leurs fonctions premières semblent détournées pour promouvoir notamment la prolifération cellulaire ou la formation de métastases, ces protéines membranaires restent aujourd'hui une classe encore sous-explorée de cibles thérapeutiques dans le cancer. Cet état de faits peut être expliqué d'une part par le peu de données actuellement disponibles sur l'identité des canaux impliqués et les rôles exactes qu'ils jouent dans la tumorigenèse d'un type de cancer particulier et d'autre part, par le manque cruel d'inhibiteurs spécifiques des canaux exprimés dans les cellules tumorales.

1554- La protéine TRPV2 est un membre de la grande famille des canaux perméables aux ions calcium exprimés dans les cellules non excitables. Des études récentes ont mis en évidence une surexpression de TRPV2 dans plusieurs cancers solides, en particulier dans les formes métastatiques. Nous avons démontré que ce canal stimule les processus de migration et d'invasion cellulaire *in vitro*. TRPV2 semble donc favoriser la dissémination des cellules tumorales et constituer par conséquent une cible thérapeutique prometteuse pour bloquer la formation des métastases cancéreuses.

L'objectif de ce projet est d'apporter la preuve de concept *in vivo* que TRPV2 est un acteur clef dans la détermination du pouvoir invasif des cellules cancéreuses (Mélanome en particulier) et que son inhibition (par des inhibiteurs synthétiques ou des anticorps bloquants) représente une nouvelle stratégie thérapeutique valide pour bloquer la formation des métastases.

L'ensemble du projet nécessite 906 souris au maximum.

Afin de répondre à la règle des 3 R, les souris sont suivies quotidiennement selon une grille de score permettant d'évaluer le degré de douleur et d'y remédier avec un traitement analgésique approprié. L'apport de l'imagerie permet de réduire le nombre d'animaux utilisés et de mieux évaluer l'état d'envahissement tumoral. Par ailleurs les souris sont groupées à 5 par cages avec des petits morceaux de papiers leur permettant de faire un nid.

1555- Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer le potentiel d'un candidat médicament à induire une hypotension orthostatique, c'est à dire une diminution de la pression artérielle déclenchée par un changement soudain de posture. Cette évaluation est réalisée sur des animaux préalablement instrumentés avec un émetteur de télémetrie, permettant de mesurer différents paramètres physiologiques chez l'animal vigile libre de ses mouvements.

Au cours de chaque étude, les animaux une fois instrumentés sont traités avec le candidat-médicament testé à 3 doses différentes ou avec un véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée. Les changements de posture imposés (test d'inclinaison ou « tilt test ») sont réalisés à 2 ou 3 reprises sur une période de 24h (1 avant administration de la molécule à tester et 1 ou 2 après traitement à des temps définis). Chaque animal reçoit tous les traitements et un total de 6 animaux est prévu par étude. Les paramètres cardiovasculaires (pression artérielle, fréquence cardiaque et électrocardiogramme) sont mesurés lors des changements de posture des animaux. Pour ce projet, il est prévu un nombre maximum de 60 animaux sur 5 ans.

Ce projet est réalisé sur le Primate non humain car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences *in vitro*) pour évaluer les risques d'un candidat médicament à générer des hypotensions orthostatiques. A ce jour, le PNH est l'une des espèces qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude. Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique (Règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement). Le raffinement est effectué par un suivi quotidien de l'état de santé des animaux.

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

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

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

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

1556- Les anticorps monoclonaux sont utilisés en clinique depuis de nombreuses années pour traiter des maladies telles que les maladies auto-immune, les maladies inflammatoires, mais également dans le cadre de transplantation ou dans le traitement des cancers. Cependant, une réponse immunitaire contre ces anticorps, qui réduit les bénéfices cliniques de ces traitements, a été observée, surtout lorsque ceux-ci proviennent d'espèces animales. L'utilisation d'anticorps monoclonaux humains limite la réponse immunitaire contre ces anticorps.

Les animaux transgéniques humanisés pour les gènes des immunoglobulines, permettent de produire des anticorps humains de fortes affinités contre tous types de protéines notamment des protéines humaines, contrairement à d'autres techniques (phage display, génération d'anticorps à partir de B isolés du sang de patients).

L'objectif de ce projet est d'obtenir des anticorps monoclonaux humains à partir de rats humanisés pour les chaînes des immunoglobulines.

Ce projet sera réalisé en adéquation avec la règle des 3R et en limitant la douleur chez l'animal conformément à la législation en cours. Des études préliminaires réalisées par des partenaires nous ont permis de déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaires par expérience, et donc de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Lors du suivi quotidien des animaux, nous déterminerons l'état général de l'animal ; en cas de souffrance, nous administrerons un antalgique et dans des cas de souffrance extrême l'animal sera sacrifié.

Sur 5 ans, nous considérons qu'un maximum de 840 animaux pourrait être utilisé pour générer des anticorps monoclonaux humains.

1557- Les biothérapies présentent un intérêt croissant et se distinguent des traitements pharmacologiques conventionnels par leur mode d'action : elles ciblent spécifiquement un agent pathogène ou une molécule, impliqués dans la pathologie. Ceci leur confère une haute spécificité limitant potentiellement les effets toxiques. Parmi les différentes classes de biothérapies, nous pouvons citer les anticorps monoclonaux (mAbs) et leurs dérivés, les bactériophages et les ARN interférents (siRNA). Un des enjeux majeurs pour ces biothérapies à visée respiratoire est d'obtenir une concentration suffisante dans le poumon pour assurer une réponse thérapeutique. L'inhalation apparaît donc comme une alternative prometteuse pour augmenter la concentration locale des biothérapies dans le tissu cible et minimiser leurs effets secondaires en limitant leur diffusion au reste de l'organisme.

Les projets auxquels collabore notre équipe visent au développement de formulation inhalée à visée pulmonaire pour délivrer localement dans le tractus pulmonaire des biothérapies chez l'homme. Après avoir testé diverses formulations in-vitro et déterminé celle qui conservait au mieux les propriétés des biothérapies lors de l'aérosolisation sans en altérer ses propriétés pharmacologiques et physico-chimique, il s'agit maintenant de valider le dispositif nébuliseur + formulation aérosolisée de la biothérapie, dans un modèle animal pertinent, le primate non humain. Le macaque cynomolgus, est l'espèce la plus pertinente pour cette étude. En effet, les primates non humains représentent un bon modèle pour évaluer le dépôt pulmonaire de médicaments par des générateurs d'aérosol car ils sont proches de l'Homme d'un point de vue de l'anatomie pulmonaire et sont capables de respirer par la bouche (contrairement aux rongeurs) ce qui est indispensable pour les études avec des générateurs à visée thérapeutique chez l'homme. Parmi les primates non humains, nous avons choisi le macaque car : 1/ c'est une espèce de référence pour les études réglementaires des biothérapies, notamment des anticorps thérapeutiques, 2/ en dehors de l'homme, c'est l'espèce de l'ordre des primates la mieux documentée d'un point de vue génomique et immunologique, en comparaison aux modèles murins et porcins.

Chaque étude sera réalisée chez 6 macaques, ce qui permettra d'évaluer le dépôt pulmonaire de la biothérapie dans le tractus pulmonaire (zone alvéolaire) par le générateur d'aérosol en utilisant des méthodes d'imagerie radio-isotopiques. Il ne s'agit en aucun cas de faire des analyses statistiques puisqu'il ne s'agira de retenir que des données qualitatives sur un petit nombre d'animaux. 6 animaux est le minimum nécessaire pour prendre en compte la variabilité inter-individuelle (paramètres respiratoires). Les animaux seront ré-utilisés pour un maximum de 10 biothérapies (sans interaction) ou pour une durée totale maximale de 5 années. Entre chaque biothérapie, un lavage correspondant au minimum à la durée d'élimination du médicament du compartiment sanguin sera opéré.

Tous les gestes techniques seront réalisés par du personnel entraîné et ayant suivi une formation de primatologie. Leur état de santé est suivi deux fois par jour par leurs animaliers. De plus l'enrichissement des macaques comprendra des jouets, échelle, plateforme surélevées et régulièrement télévision/radio.

Le passage systémique de la molécule sera évalué par des prélèvements sanguins. Selon les cas, des lavages broncho-alvéolaires seront réalisés pour mesurer la quantité de biothérapie dans le poumon et analyser des stigmates d'inflammation pulmonaire.

1558- Le modèle de réponse d'hypersensibilité retardée (DTH) chez le primate-non-humain (PNH) est un « standard » pour évaluer de manière peu invasive les réponses immunes cellulaires et humorales chez l'homme et l'animal, ainsi que le potentiel thérapeutique et l'efficacité de nouvelles stratégies d'immunothérapie. Par ailleurs, puisque ce modèle fait appel à une réponse cellulaire inflammatoire cutanée, il est également considéré comme un modèle préclinique « relevant » de divers pathologies auto-immunes et/ou inflammatoires chroniques, telles que le psoriasis.

Brièvement, ce modèle consiste à immuniser des animaux contre un antigène donné : la tuberculine, par injection de vaccins utilisés chez l'homme : le BCG, puis à étudier la réponse mémoire induite par la vaccination par injection intradermique de ce même antigène (intra-dermoréaction : IDR). Ce modèle permet d'étudier l'effet de l'injection de drogues immunosuppressives ou immunomodulatrices sur la réponse primaire (lors de la vaccination) ou sur la réponse secondaire (lors du rappel).

L'interaction interleukine 7 (IL7)- IL7 récepteur (IL7-R) est cruciale pour l'homéostasie des lymphocytes T (LT). Comme ces cellules jouent un rôle essentiel dans les réponses immunes cellulaires et humorales, cette interaction IL7/IL7-R représente une cible thérapeutique potentielle pour la transplantation d'organe et le traitement de diverses pathologies autoimmunes et/ou inflammatoires chroniques, comme ceci a été démontré préalablement chez la souris. Disposant d'une expertise dans le domaine du développement des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique, notre équipe a produit plusieurs anticorps monoclonaux de rat et en a sélectionné trois dirigé contre l'IL7-R ou CD127 humain, ayant une double activité inhibitrice et déplétante sur les LT. L'équipe a par ailleurs démontré que ces anticorps possèdent une cross-réactivité avec les primates non-humains (PNH), mais pas avec des espèces plus éloignées de l'homme tel que les rongeurs ou le porc.

Ainsi dans ce protocole expérimental, nous proposons d'évaluer l'efficacité d'un de ces anticorps dans l'induction de tolérance immune dans un modèle pré-clinique de réponse d'hypersensibilité retardée (DTH) chez le PNH.

Le nombre maximum d'animaux utilisés au cours de cette étude sera de 12. Dans un souci de respect de la règle des 3R, l'étude de pharmacocinétique/ pharmacodynamique de la molécule sera conduite de façon simultanée à la DTH sur les mêmes animaux. Chaque animal sera son propre contrôle dans l'évaluation de sa réponse à la DTH puisque les animaux recevront une première IDR avant traitement. Par ailleurs, un groupe d'animaux dits « contrôles » (sans traitement) ayant reçu plusieurs IDR consécutives a déjà été réalisé dans une étude précédente et servira de référence. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures de ce projet seront réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement antalgique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure. Les animaux sont hébergés avant protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental les individus traités sont hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères.

1559- L'étude de la génotoxicité des xénobiotiques, c'est-à-dire la capacité des molécules toxiques à altérer le génome du vivant, comprend une batterie de tests in vitro et in vivo. En règle générale, si des résultats positifs sont observés in vitro, des études chez l'animal sont nécessaires pour valider ces résultats et de plus certaines réglementations obligent à la réalisation de tests de génotoxicité sur animaux de façon systématique. Aussi depuis une dizaine d'années, de nombreux travaux ont été menés afin d'optimiser l'utilisation des animaux et réaliser un maximum de tests de génotoxicité lors d'une seule étude pour réduire le nombre d'animaux utilisés. Cependant, cette optimisation nécessite de mettre au point des schémas de traitement pour le groupe d'animaux "positifs" qui validera le protocole. En effet, la réalisation simultanée de plusieurs tests de génotoxicité sur plusieurs organes en même temps nécessite un choix judicieux et pertinent des mutagènes (substances capables de provoquer des mutations dans le génome) de référence et du schéma de traitement. Ainsi cette étude a pour but de valider un schéma de traitement avec des mutagènes de référence pour la combinaison de tests de génotoxicité chez la souris et le rat. Au total, 24 souris et 24 rats seront utilisés. Les animaux seront exposés à des génotoxiques de référence à des doses non toxiques et seront ensuite euthanasiés et les tissus et organes seront récupérés pour analyser in vitro les dommages à l'ADN. Les doses de produits utilisés ne sont pas toxiques et ne devraient pas entraîner de douleurs chez les animaux. De plus, le nombre d'animaux est ici réduit au maximum pour permettre une analyse statistiques satisfaisante via une analyse de la variance.

1560- Contexte : Le choc septique constitue le stade le plus grave de l'infection. Malgré les nombreux progrès réalisés en médecine, il reste grevé d'une mortalité de 30 à 45 %. Parmi les mécanismes responsables des dysfonctions d'organes du choc septique, outre l'atteinte de la microcirculation (vaisseaux dont le diamètre est inférieur à 100µm) et l'importance du stress oxydant (production excessive de radicaux libres de l'oxygène), les lésions des mitochondries occupent une place centrale. En particulier, une lésion (initialement réversible) des enzymes de la chaîne respiratoire des mitochondries pourrait être une manifestation précoce des défauts de perfusion et entretiendrait ensuite la dysfonction d'organes si la dysfonction mitochondriale se pérennise. Néanmoins, la temporalité de cette succession d'évènements, cruciale pour conditionner l'opportunité des différents traitements potentiels, n'est actuellement pas établie. Chez le rat en choc septique aigu (18-24h) non réanimé, nous avons ainsi pu établir par quatre techniques complémentaires que le fonctionnement mitochondrial n'était pas altéré, et ce malgré des perturbations profondes de la perfusion et de l'oxygénation des tissus. Chez le rat septique réanimé, une équipe londonienne a décrit une atteinte mitochondriale sévère dans les muscles prélevés après 48h alors que la perfusion systémique était rétablie depuis plus de 24h. Chez les animaux survivants, l'activation d'un phénomène de récupération (l'hormèse mitochondriale) permettait le retour à la normale de la fonction des organes.

Objectifs : Déterminer, dans un modèle de choc septique réanimé chez le rat, à quels moments apparaissent la dysfonction mitochondriale puis l'activation de l'hormèse mitochondriale après constitution de l'hypoperfusion des tissus.

Méthodologie : Les rats seront rendus septiques par péritonite (ligature et perforation caecale [LPC]), puis ils seront réanimés, évalués sur le plan hémodynamique (pression artérielle, échographie cardiaque) et finalement mis à mort à différents temps expérimentaux pour évaluer le fonctionnement mitochondrial. Nombre de rats nécessaires : 75

Eléments des 3R mis en œuvre :

Réduction : nous nous limiterons aux seules expérimentations jugées indispensables, le calcul du nombre d'animaux nécessaire est fondé sur des résultats préliminaires de notre critère d'évaluation principal, les expériences seront réalisées sur des groupes homogènes d'animaux afin de réduire la variabilité des résultats et enfin, nous procéderons à une exploitation maximale des données obtenues lors de l'expérimentation.

Raffinement : nous nous attacherons d'une part à réduire et à soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux et d'autre part à obtenir le maximum d'informations pertinentes à moindre coût en terme de d'inconfort animal. Cette préoccupation sera constante avant, pendant et après réalisation des expérimentations. Nous respecterons des points limite en adéquation avec les objectifs de l'expérimentation. Les soins pré, per et postopératoires seront conformes aux standards et l'administration d'antalgiques adaptée à l'intensité de la douleur provoquée. La méthode de mise à mort sera également conforme aux recommandations.

Remplacement : le remplacement n'est pas réalisable dans cette étude du phénomène complexe qu'est le choc septique. Sa réplcation in vitro ou in silico n'est pour l'instant pas envisageable.

Résultats espérés : Si elle peut être établie, la temporalité précise des évènements successifs (hypoperfusion tissulaire, dysfonction mitochondriale fonctionnelle puis récupération [mitohormèse]) permettra d'introduire aux meilleurs moments, les éléments de l'arsenal thérapeutique disponibles.

1561- L'ataxie de Friedreich (AF) est la forme la plus répandue des ataxies héréditaires (1/40000), elle se manifeste par une diminution progressive de la coordination motrice et des troubles de l'équilibre associés à une cardiomyopathie hypertrophique. Les tissus les plus affectés sont le système nerveux ainsi que le muscle cardiaque. La pathologie débute au niveau des ganglions dorso rachidiens (DRG) où se situent les gros neurones sensitifs qui dégèrent chez les patients évoluant en une dégénérescence des faisceaux spino-cérébelleux, qui partent du DRG et remontent vers le cerveau. Les patients développent de plus une atrophie d'un noyau cérébelleux profond. Le gène responsable de la pathologie code pour la frataxine, une protéine mitochondriale impliquée dans la biosynthèse des protéines à centre fer-soufre. A ce jour, aucun traitement n'est disponible pour l'AF. Nous avons généré dans le laboratoire des modèles murins de la pathologie qui reproduisent notamment les symptômes neurologiques associés à l'AF. Ces souris constituent un bon modèle pour tester des approches thérapeutiques de la pathologie mais le modèle reste néanmoins imparfait car les souris ont une atteinte cérébelleuse qui n'est pas retrouvée chez les patients et développent de plus une atteinte très tardive de la pathologie. L'objectif de ce projet est de développer un nouveau modèle de souris et de le caractériser afin d'évaluer s'il constitue un meilleur modèle pour l'atteinte sensitive de la pathologie.

Une fois ce modèle caractérisé, nous souhaitons mettre en place une approche thérapeutique basée sur l'utilisation de vecteurs adéno-associés (AAV).

Notre laboratoire a démontré la possibilité de corriger la cardiomyopathie développée par les souris modèles de la pathologie via l'injection intraveineuse d'un vecteur AAV exprimant la frataxine humaine. Notre objectif actuel est de fournir une nouvelle approche thérapeutique visant à corriger/prévenir l'atteinte neurologique dans le modèle souris précédemment établi. Pour cela nous proposons une approche de thérapie génique de manière à délivrer dans les cellules malades le gène codant la frataxine humaine.

Le but de l'expérience est de déterminer si l'expression de la frataxine humaine dans les tissus affectés à l'aide d'un vecteur viral permet de prévenir et/ ou de corriger le phénotype des souris dans le système nerveux central et principalement dans les DRG affectés en premier chez les patients. Notre projet se divisera en différentes phases, tout d'abord la caractérisation du modèle. Enfin, la deuxième phase du projet permettra d'évaluer la prévention de l'apparition des symptômes neurologiques associés à l'AF dans notre modèle. Si nos résultats sont encourageants, la troisième phase consistera à l'évaluation de la correction du phénotype dans notre modèle. Un nombre total de 70 souris sauvages et 155 souris mutantes sera utilisé. Cet effectif correspond au nombre d'animaux nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique suffisante. En parallèle environ 600 animaux seront utilisés pour la création et le maintien de la lignée sur l'ensemble de la durée du projet.

Le but ultime du projet est de trouver une thérapie efficace pour l'AF afin d'améliorer la vie des patients et si possible de stopper ou au moins ralentir la progression de la maladie.

Après avoir évalué la faisabilité d'expression de la fraxine humaine dans un modèle neuronal cellulaire, le passage chez la souris est l'étape indispensable dans le développement de l'approche. Les groupes établis prennent en compte le minimum requis d'animaux pour évaluer l'efficacité de l'approche. De plus, le suivi clinique et le bien être des animaux est primordial dans notre projet.

1562- Les traitements contre le cancer du sein sont de plus en plus ajustés aux anomalies détectées dans les tumeurs. Certaines de ces anomalies sont plus fréquentes et touchent des protéines ayant des liens entre elles, on parle de « voie de signalisation ». Des médicaments ont été développés pour cibler ces voies (thérapie ciblée) et ont permis une progression notable de la survie des patients. Cependant, certains patients présentent une résistance soit d'emblée soit après quelques temps de traitement, signifiant que le traitement ne fonctionne pas. Nous focalisons nos recherches sur les mécanismes responsables de la mauvaise réponse de la tumeur aux médicaments et avons récemment identifié un gène dont les modifications du niveau d'expression pourrait expliquer en partie la résistance au traitement. En effet, nous avons observé

qu'in vitro, le traitement réduit fortement l'expression du gène et de la protéine correspondante dans les cellules tumorales testées (plusieurs lignées de cancer du sein ou du poumon). Si l'on modifie les cellules de façon à surexprimer cette protéine, elles ne sont plus sensibles au médicament et continuent de proliférer. Cela suggère que cette protéine pourrait être une cible thérapeutique potentielle permettant d'améliorer l'efficacité des traitements pour les patients mauvais répondeurs.

Nous avons donc démontré le rôle de cette protéine dans la réponse à la rapamycine de cellules tumorales mammaires et pulmonaires in vitro. Il est indispensable maintenant de tester cette hypothèse dans le contexte d'un organisme entier, avec le microenvironnement tumoral et la réponse immunitaire normale.

Nous envisageons dans un premier temps de valider l'hypothèse que cette protéine est réellement impliquée dans la réponse au traitement dans un modèle préclinique de tumeurs mammaires (2 lignées) et pulmonaire (1 lignée), chez la souris. L'injection des cellules tumorales se fera par voie sous cutanée, ce qui est moins invasif (et donc plus raffiné) et plus reproductible que des injections dans les glandes mammaires ou en intra thoracique. Le bien être des souris sera assuré quotidiennement. La mise en place du traitement se fera sous anesthésie. En cas de douleur, les animaux recevront des antalgiques, leur alimentation sera adaptée et leur confort une priorité. Nous comparerons la réponse à l'administration du médicament entre des tumeurs dérivant de cellules modifiées ou non pour notre gène d'intérêt. Nous limiterons le nombre d'animaux à 10 par groupe, avec donc un total de 120 souris pour le projet complet. Les expériences n'excéderont pas 8 semaines de traitement même si aucune dégradation importante de l'état général des animaux n'est observable. Aucun prélèvement ne sera réalisé durant l'expérimentation mais les tumeurs seront collectées pour analyse à la fin du projet.

1563- La période néonatale se caractérise par une immaturité de l'épithélium intestinal et du système immunitaire qui lui est associé. Des perturbations, au cours de cette période, sont capables d'induire des altérations à long terme de l'homéostasie intestinale, associées à une susceptibilité à développer à l'âge adulte des pathologies intestinales organiques ou fonctionnelles. Dans une étude précédente, nous nous sommes intéressés aux conséquences d'un stress de séparation maternelle (SSM) sur des jeunes souris mâles adultes de souche C3H/HeN sur la fonction de barrière intestinale et sur la réponse immunitaire contre le microbiote intestinal. Nous avons montré que le SSM (i) augmente la sensibilité viscérale, la perméabilité intestinale para- et trans-cellulaire et l'inflammation intestinale et (ii) diminue l'activité antimicrobienne fécale. Ce défaut de barrière intestinale observé chez le jeune adulte est associé à une rupture de tolérance contre des antigènes bactériens attestée par une réponse systémique IgG dirigée contre une bactérie de la flore intestinale commensale. De plus, le SSM augmente l'inflammation systémique au niveau de la rate. Ces modifications physiologiques ne sont pas associées à des modifications de la flore commensale intestinale.

L'ensemble de ces résultats souligne les effets néfastes du stress en période périnatale sur l'homéostasie intestinale du jeune adulte qui conduisent à une rupture de tolérance vis à vis du microbiote intestinal. Nous souhaitons maintenant étudier les conséquences d'un SSM sur une infection par un parasite intestinal *Toxoplasma gondii* chez l'adulte. Nous émettons l'hypothèse selon laquelle un SSM pourrait fragiliser la barrière intestinale et conduire à une plus grande susceptibilité aux infections intestinales. Nous avons décidé de tester cette hypothèse en infectant les animaux par un parasite intestinal qu'est *Toxoplasma gondii*.

Cette demande concerne un projet nécessitant 80 souris adultes construit pour appliquer au mieux la règle des 3R. Réduire et Raffiner : L'expérience est construite avec le minimum d'animaux permettant d'analyser les résultats correctement du point de vue statistique. L'avantage de ce modèle murin est que les souris C3H/HeN sont des bonnes "mères" et malgré le stress induit, il n'y a que très peu de cannibalisme. Remplacer : l'étude de l'immunologie mucosale dans un contexte infectieux ne peut être réalisée sans expérimentation animale. En effet, les études in vitro ne tiennent pas compte de la complexité des coopérations cellulaires.

1564- L'objectif du projet est de permettre aux internes nouvellement nommés d'être sensibilisés à leur future fonction. Le stage d'une semaine, par groupe de 24 étudiants, brassera l'ensemble des disciplines chirurgicales.

La formation sera essentiellement pratique. Ainsi les étudiants seront amenés à réaliser des actes chirurgicaux basiques et fréquents via différents supports :

a) supports inertes : tubes en silicone, prothèses diverses

b) mannequins : mannequins en plastique

c) simulateur électronique : simulateur d'endoscopie,

d) des pièces anatomiques de porcs : tissus d'animaux provenant d'abattoirs ou prélevés sur des porcs euthanasiés utilisés précédemment dans d'autres procédures (pieds de porc, cuisses de dinde, intestins grêle, mésentère et appareils urinaires de porc)

b) des sujets anatomiques humains

c) porcs vivants anesthésiés : les étudiants finiront leur stage par 3 ateliers sur porcs vivants anesthésiés : atelier de coelochirurgie, atelier de chirurgie urologique et atelier de chirurgie cardio-thoracique.

Ce programme pédagogique progressif, depuis le support inerte jusqu'à l'animal anesthésié, sera répété pendant 4 semaines afin que l'enseignement soit suivi par une centaine d'étudiants environ.

L'objectif de la formation sur animaux vivants est de confronter les jeunes internes à la complexité de la gestuelle chirurgicale. La chirurgie sur animal vivant sous anesthésie générale permettra à l'étudiant d'appréhender la gestuelle chirurgicale de base, simulant une situation au plus proche de celle rencontrée au bloc opératoire humain et de savoir réagir face à un événement imprévu et d'urgence vitale.

L'utilisation du modèle porcin se justifie par les similitudes anatomiques à l'homme.

Ainsi, pendant ce stage les jeunes internes en chirurgie auront 3 ateliers de 3 heures sur le porc vivant anesthésié : Atelier de chirurgie mini-invasive, atelier de chirurgie urologique et atelier de chirurgie cardio-thoracique.

Il y aura un encadrant (réfèrent de la discipline enseignée) par groupe de 4 étudiants.

Un enseignement théorique de sensibilisation à l'expérimentation animale (Evolution de la réglementation, le bien-être animal) leur sera donné avant les ateliers.

Pour chaque opération les animaux seront sous anesthésie générale et analgésie adaptées à l'acte chirurgical. En fin de procédure, les animaux étant sous anesthésie générale profonde, ils recevront une dose létale d'euthanasiant.

Pour bien sensibiliser les apprenants aux gestes de base et d'urgence tout en limitant le nombre d'animaux, nous avons prévu par poste de travail : 1 porc pour 4 étudiants et 1 encadrant. Il y aura 6 postes de travail par atelier. Soit $6 \times 3 = 18$ porcs/semaine. Soit 18×4 semaines = 72 porcs par année universitaire

Au total, sur 5 ans, le nombre estimé de porcs est de 360. Ce nombre sera fonction du nombre d'étudiants/an (numerus clausus). Il pourra également être moins important si de nouveaux simulateurs plus performants sont créés.

1565- L'habénula latérale est décrite comme une structure clé à l'interface de la gestion du stress et des fonctions exécutives. Ainsi, de nombreuses études ont montré chez le rongeur une forte activation de l'habénula latérale lors d'une situation de stress. De plus, une lésion des voies efférentes de l'habénula entraînait un état anxieux accompagné d'une élévation du taux sanguin de corticostérone, l'hormone impliquée dans la réaction face au stress. Enfin un stress entraîne chez des souris portant une lésion de l'habénula, des déficits de filtrage sensoriel, impliquant donc cette structure dans de hautes fonctions cognitives en relation particulière avec une gestion d'une situation stressante. Cette hypothèse d'une habénula latérale à l'interface entre gestion du stress et hautes fonctions cognitives est très importante. En effet, dans de nombreuses pathologies psychiatriques telles que la dépression et la schizophrénie, est présente une forte incapacité à gérer les situations de stress intense, ce qui chez certaines personnes aggrave la condition pathologique, alors que cela peut en être le déclencheur chez des sujets sains. Cela est d'autant plus important dans le cadre de ce projet, qu'un dysfonctionnement de l'habénula a été mis en évidence dans le cadre de la dépression ainsi que dans la schizophrénie.

Ce projet a pour but d'étudier plus précisément le rôle de l'habénula latéral dans la gestion d'une situation stressante, et l'influence de cette gestion sur les processus cognitifs appartenant aux fonctions exécutives. Ce projet va permettre de mieux comprendre comment un stress est géré durant une situation de forte demande cognitive, et ainsi démontrer le rôle clé de l'habénula latérale à l'interface de la gestion du stress et des fonctions exécutives; il va également permettre de faire des avancées importantes dans notre compréhension des pathologies psychiatriques telles que la dépression et la schizophrénie.

Lors de ce projet, qui utilisera 315 rats, nous procéderons à une inactivation réversible de l'habénula latérale et étudierons plus particulièrement le comportement des rats lors d'un test d'anxiété, afin d'en explorer l'impact sur cette dernière, et également lors du test de la piscine de Morris, qui est un test de mémoire mettant en jeu une situation particulièrement stressante pour les rongeurs, c'est-à-dire la recherche d'une échappatoire dans un environnement assez aversif (une enceinte remplie d'eau froide). En parallèle, nous procéderons à des prélèvements sanguins, au niveau de la queue de nos animaux, afin de corrélérer niveau de stress, et performances mnésiques, avec le taux circulant de l'hormone du stress qu'est la corticostérone. Enfin, nous procéderons à la tentative d'inversion des effets néfastes de la dysfonction habénulaire sur la gestion du stress, et les déficits cognitifs qui en découlent, en agissant directement sur la production de corticostérone en lien avec la réponse au stress par un traitement à la métyrapone, qui est un inhibiteur de la synthèse de novo de corticostérone par inhibition de l'enzyme de synthèse 11beta-hydroxylase dans la glande surrénale. Règle des 3R: Réduction: le nombre d'animaux par groupe est calculé au plus juste des prérequis statistiques; Raffinement : le choix des tests a été guidé par leur validité dans le domaine et le choix de l'espèce - Rat - par son adaptation naturelle à réaliser les tests avec un minimum de stress; de plus, nous n'utilisons pas de méthode d'enrichissement de cage pour cette étude car une telle procédure modifie la réponse au stress, comme montré dans la littérature, ce qui pourrait biaiser nos résultats; enfin, afin de réduire au minimum le niveau de souffrance et d'anxiété des animaux, ces derniers seront habitués à la manipulation de manière répétée et progressive; Remplacement: dans la mesure où il s'agit ici d'étudier l'impact d'activation de récepteurs spécifiques il n'est pas possible de recourir à d'autres modèles.

1566- Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primaires les plus communes. Le pronostic des patients atteints de glioblastome, le type le plus agressif de cancer du cerveau, est resté pratiquement inchangé au cours des trois dernières décennies. Des études récentes donnent une durée médiane de survie de 14,6 mois pour les patients traités par radiothérapie plus témozolomide, qui est la chimiothérapie de référence, et à 12,1 mois avec la radiothérapie seule. De toute évidence, des thérapies nouvelles et efficaces sont très attendues. Afin d'améliorer la survie de ces malades, il est nécessaire de développer de nouvelles molécules anticancéreuses. Ce projet a pour but de déterminer l'effet antitumoral d'un ferrociphénol (analogue structural du tamoxifène) dans le cas de rats porteurs de glioblastome. Ce composé, qui doit être étudié, n'a pas montré de toxicité dans les tests que nous avons réalisés in vitro. Il sera présenté sous 2 formes (complexé à la méthyl- β -cyclodextrine et greffé à un peptide).

L'essai in vivo que nous proposons fait suite à une évaluation in vitro : des essais sur cultures cellulaires ont été réalisés et ont montré que ce ferrociphénol est efficace sur les cellules U 87 humaines de glioblastome ($IC_{50} = 0.022 \mu M$ à 72h) et montre au contraire une faible toxicité sur les astrocytes ($IC_{50} = 362 \mu M$ à 72 h). Une étude in vivo est maintenant nécessaire pour continuer l'évaluation de cette molécule et pour déterminer plus précisément son réel intérêt en thérapeutique.

A ce stade, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique, notamment pour prendre en compte l'aspect pharmacocinétique en lien avec la voie d'administration.

L'efficacité du complexe sera déterminée chez des rats Fischer mâle de 7 semaines chez lesquels ont été implantés de façon sous-cutanée des cellules tumorales de glioblastomes F98 (glioblastome de rat) très similaires aux cellules U87 humaines et adaptées au modèle in vivo que nous avons choisi. L'effet du produit sera déterminé en suivant la croissance tumorale. Les données obtenues seront comparées avec les données obtenues chez des rats Fischer implantés mais non traités. Le projet requerra l'utilisation de 104 rats.

Ce nombre d'animaux a été déterminé afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant un nombre suffisant pour ne pas compromettre la validité statistique des expériences qui seront menées.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué régulièrement. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

1567- L'attaque de panique est une des manifestations possibles des troubles anxieux. C'est une crise d'angoisse aiguë qui apparaît de façon brutale et qui dure de quelques minutes à quelques heures. La personne va ressentir une peur intense, une sensation de danger immédiat et des sensations physiques désagréables.

Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer chez le rat l'effet anti panique/anxiolytique d'une nouvelle molécule candidat-médicament suite à l'exposition de l'animal à une hypercapnie (augmentation du taux de CO₂ dans l'air). Cet effet sera évalué d'un point de vue comportemental (anxiété de l'animal) mais aussi d'un point de vue physiologique (paramètres cardiovasculaires).

Au cours de chaque étude, les animaux (1 groupe de 8 animaux) sont traités avec le candidat-médicament à 3 doses différentes, avec un véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée et éventuellement une molécule de référence, chaque animal recevant successivement les différents traitements. A la fin de chaque étude, des prélèvements de sang ou de tissus pourront être effectués. Un total de 280 rats seront utilisés dans ce projet.

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

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

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

- une réduction du nombre de congénères nécessaires pour le test d'interactions sociales (1 congénère sera utilisé dans 4 tests)
- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à des procédures peu invasives
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

1568- La barrière hémato-encéphalique est une structure spécialisée dans le système nerveux central essentielle pour le maintien de l'homéostasie du cerveau en contrôlant le passage de molécules entre le sang et le parenchyme cérébral. La barrière hémato-encéphalique empêche le transport de la plupart des agents thérapeutiques en abaissant ainsi l'efficacité du traitement.

L'exposition à des ultrasons focalisés en présence de microbulles a montré une ouverture transitoire de la barrière hémato-encéphalique pour permettre la pénétration dans le cerveau de molécules thérapeutiques circulantes. Grâce à ses atouts uniques pour changer l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique de manière non-invasive, transitoire et localisée, les ultrasons focalisés ont été reconnus comme une approche prometteuse pour l'administration de médicaments au cerveau.

Dans ce projet, nous proposons de caractériser cette ouverture de la barrière hémato-encéphalique en fonction des puissances ultrasonores appliquées dans le cerveau et d'évaluer la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique par l'utilisation de molécules normalement non perméables. Pour cela, des molécules marquées ou détectables seront injectées chez les animaux, leur répartition sera ensuite analysée sur les coupes de tissus cérébraux. Les animaux seront anesthésiés lors des examens d'imagerie ainsi que lors de l'injection d'agents de contraste ou de molécules marquées. Cette étude nous permettra de déterminer les conditions idéales d'ouverture pour permettre l'augmentation de la délivrance locale de médicaments dans le cadre de pathologies cérébrales comme le traumatisme crânien.

Ce projet portant sur l'étude de la réponse d'organe entier et de tissus complexes (cérébraux et vasculaires) aux ultrasons focalisés, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

Le projet requerra l'utilisation de 42 rats maximum. Ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à ce que les résultats puissent être statistiquement représentatifs : pour chaque expérience et permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Le nombre minimum d'animaux permettant de réaliser l'expérience sans compromettre les objectifs du projet sera ainsi utilisé.

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

Les animaux utilisés pour ce projet sont nés et élevés en Europe.

1569- Les recherches récentes montrent que le système lymphatique est la voie de passage prépondérante pour les grosses molécules après une administration autre qu'intraveineuse. L'évaluation du passage par la lymphe de ces molécules et de leur devenir, mécanisme très mal connu aujourd'hui, est devenue un axe de recherche important dans le développement de futurs médicaments.

La technique décrite ici consiste en la pose d'un cathéter dans le canal lymphatique thoracique ou mésentérique associé à un second cathéter dans l'artère carotide (sang systémique) sous anesthésie. Ces cathéters permettent le prélèvement tout au long de l'expérience de petits volumes de lymphe et de sang dans lesquels pourront être dosées les molécules d'intérêt. Ainsi, il sera possible d'évaluer le passage des composés et leurs éventuelles transformations dans le système lymphatique.

Seuls les composés d'intérêt sélectionnés après des tests acellulaires et cellulaires *in vitro* et répondants à des critères prédéfinis seront testés chez le rongeur.

Contrairement aux études réalisées sur des modèles *in vitro* (culture cellulaire par exemple), cette approche permet de prendre en compte toute la complexité de l'organisme entier et l'ensemble des facteurs qui régissent la biodisponibilité d'un composé.

Cette technique récente a plusieurs avantages. La cathétérisation est réalisée chez le rat car cette espèce possède un volume sanguin et lymphatique total autorisant les prélèvements multiples suffisants pour permettre les dosages sans nuire aux animaux.

Elle permet d'avoir des profils pharmacocinétiques individuels complets pour limiter la variabilité interindividuelle et donc limiter le nombre d'animaux utilisés.

Les prélèvements grâce à un cathéter sur l'animal vigile limitent l'interaction et les variations des paramètres physiologiques avec l'anesthésie et le stress causé par les manipulations répétées des animaux.

Dans une étude, 4 à 6 animaux sont utilisés par dose et par composé, afin de prendre en compte la variabilité interindividuelle et pouvoir interpréter les résultats.

Des mesures sont prises pour prévenir la douleur lors du réveil (administration pré et postopératoire d'analgésique) et pour limiter les contraintes lors de l'opération (anesthésie gazeuse pendant toute la durée de l'opération, planche chirurgicale chauffante pour limiter l'hypothermie lors de la chirurgie, gel ophtalmique placé sur chaque œil pour éviter le dessèchement de ceux-ci pendant l'opération).

Le nombre total d'animaux prévu sera de 600 sur 5 ans, soit 10 composés testés par an, 2 à 3 doses par composé et 4 animaux par dose sur une période de 5 ans.

1570- Le cancer figure parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde, avec une incidence qui n'a cessé de croître depuis 1980. En 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a recensé 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés à la maladie. En cancérologie, les traitements sont actuellement dominés par la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Depuis quelques années, des recherches sont entreprises afin de développer des approches thérapeutiques plus ciblées, présentant l'avantage d'être plus efficaces et moins toxiques.

Parmi les différentes pistes thérapeutiques envisagées, une société de biotechnologie travaille sur une approche émergente de thérapies contre le cancer utilisant des anticorps monoclonaux afin de rétablir la capacité des cellules immunitaires à reconnaître et éliminer les cellules tumorales. Cette approche originale a donné lieu à des alliances avec des sociétés leaders de la biopharmacie et permis le lancement de deux programmes en clinique dans le domaine de l'immuno-oncologie.

Dans le cadre de cette approche, cette société a demandé à notre processus de production d'assurer la génération d'anticorps monoclonaux contre une nouvelle molécule. Cette protéine a émergé depuis quelques années comme étant également impliquée dans différents cancers dont ceux du sein, de la peau et de la thyroïde. La finalité de ce projet consiste à déterminer si le ciblage de cette protéine avec un anticorps monoclonal bloquant, peut s'avérer être une approche thérapeutique efficace.

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

Les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnées à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire *in vitro* des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'anticorps monoclonal synthétisé par son lymphocyte parental. Les hybridomes générant des anticorps spécifiques d'un déterminant antigénique (épitope). L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre une structure protéique particulière, une quantité de 8 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Le temps d'immunisation est de 4 mois.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité modéré. La procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

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

1571- Notre unité de recherche a pour thématique centrale de recherche l'étude de l'impact d'une alimentation délétère sur l'axe intestin cerveau. Les méthodes d'imagerie mises en oeuvre (imagerie de la consommation cérébrale de glucose par

exemple) ne permettent pour l'instant que d'illustrer des variations d'activations cérébrales basales ou bien les réponses cérébrales à un stimulus unique. L'IRM fonctionnelle permet de mettre en évidence des variations de réponses cérébrales lors de différentes stimulations répétées pendant la session d'imagerie. En outre, l'IRM offre une qualité d'imagerie anatomique sans égale avec les autres modalités d'imagerie, permettant l'évaluation de changements structurels d'importance de zones cérébrales d'intérêt. Par ailleurs, l'IRM, en faisant appel aux propriétés magnétiques du proton, n'est pas invasive. Avec le développement actuel de cette méthodologie, l'IRM est une modalité de choix pour l'étude du cerveau en clinique et pré-clinique.

Ce projet vise à mettre au point de l'IRM anatomique, fonctionnelle et de perfusion sur le modèle miniporc (n=15). En effet, le miniporc est un modèle de choix vis à vis de la structure et du fonctionnement cérébral humain. Le développement de l'imagerie cérébrale par IRM chez le porc est donc très pertinent dans les thématiques de recherche pré-cliniques avec pour objectif un transfert de connaissance en clinique. Ce projet intitulé "mise au point de l'imagerie cérébrale par IRM chez le porc" est donc un prérequis aux futurs projets de recherche pré-cliniques sur l'impact d'une alimentation délétère sur le système nerveux central.

Ce projet s'insère dans la stratégie des 3R: (i) les méthodes d'imagerie in vivo telle que l'IRM permet d'obtenir des informations physiologiques de manière peu invasive (réduction, remplacement), (ii) les mêmes animaux peuvent être en plus suivis dans le temps (réduction), (iii) la mise au point de méthodes d'imagerie différentes permet d'obtenir plusieurs informations sur le même animal (réduction), (iv) ce projet de mise au point nous assurera la qualité de nos méthodologies d'imagerie pour les expérimentations futures (raffinement).

1572- L'accès à des prélèvements biologiques de primates non humains (PNH) est un élément clé dans le développement préclinique. Ils permettent de valider in vitro différentes hypothèses scientifiques et de tester l'efficacité ou la toxicité de certains candidats médicaments. Autrement dit, utiliser des échantillons de PNH 1) permet de Réduire l'utilisation d'animaux de laboratoire en les remplaçant par l'utilisation in vitro de cellules (plusieurs produits testés avec les cellules d'un seul animal) ; 2) rend le développement d'un médicament plus fiable, grâce à une sélection objective de l'espèce animale la plus proche de l'homme.

La mise en place d'une biothèque permet la rationalisation et la mutualisation des échantillons, leur conditionnement et leur conservation pour les besoins des différents demandeurs.

Le but de ce projet est d'intégrer à la biothèque des prélèvements des sperme et le lavage broncho-alvéolaire.

Raffinement:

Ces prélèvements biologiques sont réalisés selon les bonnes pratiques de laboratoire, sans effet délétère pour l'animal.

Les animaux sont anesthésiés durant ces procédures et reçoivent également une couverture analgésique. Ces animaux sont hébergés en groupe sociaux et un programme d'enrichissement du milieu est mis en place pour tous les animaux du site.

Les animaux éligibles à ces prélèvements sont au nombre de 122 pour le prélèvement de sperme et 183 pour le lavage broncho-alvéolaire

1573- Notre processus de production assure l'approvisionnement des matières premières critiques pour le compte de notre société soeur, leader mondial du diagnostic in vitro.

Suite à l'activation du système de la coagulation sanguine, le fibrinogène, molécule soluble substrat de la thrombine, est polymérisé en un caillot de fibrine. Le processus de fibrinolyse est activé concomitamment afin de réaliser la dégradation du réseau de fibrine par la plasmine. Ce processus cloture la coagulation sanguine afin de re-perméabiliser les vaisseaux sanguins réparés et sert à empêcher la formation de thromboses. L'hémostase est donc un équilibre physiologique finement régulé entre un état de construction du caillot (coagulation) et de dissolution du caillot (fibrinolyse). Pour asseoir un diagnostic précis, lors d'évènements ischémiques ou hémorragiques, les cliniciens pratiquent des examens de biologie médicale en dosant différents paramètres de la coagulation comme le taux de prothrombine (TP, INR), le temps de céphaline activée (TCA), les produits de dégradation de la fibrine (PDF), la numération plaquettaire.

Un hybridome a été développé, il y a une vingtaine d'années, sécrétant un anticorps monoclonal (Mab) ultra spécifique d'un produit terminal de la dégradation de la fibrine. Ce Mab entre dans la composition d'outils de diagnostic biomédical utilisé par la majorité des hôpitaux et des laboratoires français, européens et américains pour le diagnostic de la CIVD (Coagulation Intra Vasculaire Disséminée), des thromboses veineuses des membres inférieurs (phlébites) et de l'exclusion de diagnostic de l'embolie pulmonaire. Ces dispositifs IVD exploitant ce Mab sont pleinement validés, au sens du marquage CE des dispositifs IVD, de la U.S. FDA et des divers organismes réglementaires internationaux.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (démontrer que tous les efforts ont été tentés pour remplacer la méthode de production in vivo par une autre technique), Réduire (optimisation du nombre de souris à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

Ce Mab n'a pu être caractérisé, techniquement et cliniquement validé que sur des lots issus de production en condition in vivo. Des efforts considérables et des essais très poussés ont été menés depuis 2009 pour tenter le transfert de cette production en condition in vitro (bio-réacteur, flasque, fibre creuse, roller-spinner ...) L'ensemble des rapports techniques concernant la capacité dudit clone à produire le même Mab selon le même cahier des charges (notamment son affinité et sa spécificité) requis pour les dispositifs IVD concernés, démontre la nécessité incontournable de poursuivre la production de ce Mab en condition in vivo.

Les besoins de santé publique et la nécessité absolue de ces dispositifs IVD exploitant ce Mab et en l'absence de solution alternative, impose le maintien de la production de ce réactif.

Le nombre moyen de souris utilisées a été optimisé et varie entre 700 et 1100 par cycle de production. Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissements (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux. Une seule paracentèse est réalisée sur l'animal. Le contrôle de la réponse immunitaire des animaux n'est plus nécessaire, ce clone étant exploité depuis 1995, ce qui permet de réduire le nombre d'actions invasives sur l'animal. L'euthanasie de l'animal en fin de protocole sera réalisée par une technique éthiquement acceptable (asphyxie par saturation progressive en CO₂).

1574- La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Elle se caractérise par une mort sélective des neurones moteurs situés dans le système nerveux central, par de l'atrophie musculaire et de la paralysie. Le décès des patients intervient trois à cinq ans après diagnostic. L'axe principal de la pathologie correspond à l'axe moteur, et les principaux tissus impliqués dans la pathologie sont la moelle épinière, les nerfs moteurs et les muscles squelettiques. L'étude de l'interaction de ces 3 acteurs est la clé de la recherche sur cette pathologie.

La SLA est une maladie multifactorielle dans laquelle le métabolisme des lipides influence la sévérité de la maladie chez les patients. Notre corps de données préliminaires a montré que le métabolisme de sphingolipides, une classe de lipides complexes, est fortement perturbée chez les patients SLA ainsi que dans des modèles murins de dénervation musculaire. Notre hypothèse de travail est que la synthèse d'un sphingolipide en particulier, le glucosylceramide (GlcCer), est requise pour la maintenance et surtout la régénérescence des unités motrices.

Nous proposons ici d'augmenter le taux de glucosylceramide par une approche pharmacologique et une approche virale ciblant l'enzyme de synthèse. Après une lésion du nerf sciatique, la récupération fonctionnelle des animaux sera étudiée par des tests moteurs et visuels reconnus, et aussi par des tests biochimiques et biomoléculaires.

Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation des protocoles afin de limiter le nombre d'animaux et d'améliorer leur bien-être. La complexité des unités motrices et l'implication de plusieurs types cellulaires excluent l'utilisation de modèles cellulaires et rendent incontournable l'utilisation de modèles animaux. Notre projet est divisé en 3 protocoles expérimentaux qui répondront à des problématiques complémentaires. Au total, 72 souris seront incluses dans le projet afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. L'enrichissement de l'environnement des animaux, le maintien des interactions sociales, une surveillance quotidienne, ainsi que le recours à une analgésie post-opératoire permettront de limiter la souffrance des animaux et de s'assurer de leurs bien-être.

L'objectif de ce projet de tester une nouvelle approche thérapeutique pour la SLA et l'ensemble des maladies de l'axe moteur.

1575- Le projet intitulé « GARE SURG – Réalité augmentée en gynécologie pour la chirurgie endoscopique » a été soumis pour évaluation au comité d'éthique ICOMETH. Ce projet a pour objectif de mettre au point un modèle original de réalité augmentée en chirurgie pelvienne. La réalité augmentée permet à l'opérateur de voir par superposition son image réelle et une image reconstruite par informatique et ainsi de visualiser grâce à cette réalité augmentée des structures habituellement masquées ou non visibles dans le champ opératoire. Il n'existe actuellement aucun système permettant cette réalité augmentée en per opératoire avec un recalage fiable des données per opératoires et reconstruites.

Ce projet implique de combiner la visualisation par un système endoscopique à un système de modélisation 3D informatique des structures anatomiques reconstruit au préalable combiné en per opératoire par un système d'imagerie robotisé. Le projet vise à envisager les différentes modalités de calibrage de l'image laparoscopique sur l'image préopératoire se basant sur les structures rigides (structures osseuses). Plusieurs applications sont envisagées, avec la reconstruction des organes présentant un risque opératoire particulier : uretère en chirurgie gynécologique, nerfs pelviens en chirurgie du rectum.

Ce projet remplit les critères mentionnés à l'article 6 de la Charte Nationale d'Éthique. Ce projet a été validé par le conseil scientifique de l'IHU. Il pourrait avoir de retombées rapides pour la santé humaine dans la prévention des accidents opératoires pouvant toucher différents organes pelviens et en particulier les uretères ou les nerfs pelviens lors d'actes de chirurgie pelvienne. Ceci permettra au chirurgien d'accroître la sécurité du geste chirurgical en prévenant certaines complications opératoires.

Ce projet respecte les 3R. Les impératifs de remplacement ont été pris en compte. Pour ce projet qui évalue la superposition d'images reconstruites après avoir été acquises en préopératoire et des images per opératoires, le recours à un animal est indispensable. Il faut en effet tester la superposition d'organes vivants sur des images acquises antérieurement et en définir la précision et les limites. L'utilisation d'un modèle expérimental non vivant supprimerait cette capacité d'analyse.

Le choix de l'espèce animale, le porc, se justifie par la similitude de l'espace opératoire chirurgical et la similitude des organes pelviens, en particulier le système digestif, les uretères et les nerfs pelviens du porc par rapport à celui de l'homme, ainsi que par la possibilité d'utiliser les techniques et outils chirurgicaux validés en chirurgie humaine. Les expériences se proposent de valider la méthodologie sur les technologies habituellement utilisées chez l'homme. Ce nombre (12) se justifie par la nécessité de s'affranchir des écarts inter-individus de façon significative. L'ensemble de ces procédures sera réalisé sous anesthésie, ce qui permettra de limiter la souffrance des animaux. Ce projet prévoit la succession de procédures d'évaluation avec des points d'interruptions du protocole.

L'ensemble de ce protocole pourra être effectué sans survie pour éviter toute souffrance animale.

1576- Dans l'objectif d'avoir un élevage durable de chèvres laitières, il est important de limiter ou anticiper les déséquilibres nutritionnels et métaboliques, notamment en fin de gestation début de lactation, période critique chez les ruminants laitiers,

où les besoins en énergie de la chèvre sont très fortement augmentés et la capacité à les assurer très limitée, conduisant à des troubles de la santé et des diminutions de performance.

A l'heure actuelle, le propylène glycol d'origine chimique, est le seul composé habituellement utilisé par les éleveurs dans la prévention de ce type de trouble. D'où l'intérêt de trouver un autre composé, d'origine naturelle, aux effets similaires. Certaines plantes, du fait de leurs compositions complexes, peuvent être utilisées en tant qu'additifs alimentaires aux effets biologiques multiples. C'est le cas des additifs à base de saponines (actuellement majoritairement produits à partir de *Yucca* sp.), dont l'impact dans la réduction des émissions de méthane a été précédemment démontré chez les ruminants mais dont l'effet bénéfique sur le métabolisme énergétique, lors de stades de déséquilibre métabolique mérite d'être établi.

Enfin, les méthodes en « omique », qui consistent à mesurer les différents métabolites d'un organisme au cours du temps, sont particulièrement bien adaptées à ce type d'étude prospective.

Notre objectif serait, dans un premier temps, de pouvoir finement détecter les déséquilibres métaboliques (avant leur visualisation évidente par des mesures classiques) et les réponses de l'animal, après ingestion de cet additif. Dans un second temps, l'intérêt serait d'intégrer différents types de données obtenues (métaboliques, biochimiques et zootechniques) au sein d'un indice global permettant la prédiction des perturbations métaboliques et des réponses chez le modèle chèvre laitière.

Ainsi, une première procédure étudiera les effets d'un additif à base de saponines sur le métabolisme de la chèvre laitière lors d'une période d'équilibre nutritionnel (milieu/fin de lactation) puis une seconde procédure testera ce même additif en fin gestation/début lactation pour étudier son intérêt lors d'une période de besoin accru en énergie.

Chacune de ces procédures s'appuiera sur 30 chèvres, réparties en 3 lots ((1) avec additif ; (2) contrôle négatif : sans additif ; (3) contrôle positif : propylène glycol) sur 7 semaines avec 2 prélèvements hebdomadaires de sang, jus de rumen (par sonde œsophagienne) et lait réalisés sur 2 jours consécutifs. Dans la procédure N°2, les 60 chevreaux nouveau-nés seront également suivis par prélèvement sanguin uniquement sur 2 semaines. Le projet utilise un nombre d'animaux par lot réduit au maximum, tenant en compte de la variabilité individuelle des réponses et permettant des analyses statistiques interprétables. Dans la procédure N°1 ; les chèvres sont logées dans des cases individuelles mitoyennes, deux par deux, ce qui autorise le contact tactile avec les congénères voisines. Les chèvres sont sorties 2/j lors de la traite (Procédure N°1) et manipulées et observées quotidiennement dans leur comportement, niveau d'ingestion permettant de déceler toute anomalie très rapidement.

1577- Le contrôle des performances des animaux d'élevage et de la qualité (nutritionnelle et sensorielle, sanitaire) de leurs produits est un enjeu économique fort pour les pays développés et émergents. La production bovine française est caractérisée par une diversité de types de production ayant pour origine l'utilisation de différentes races ou génotypes de bovins d'une part, et le type d'animal (jeune bovin, boeuf, génisse, vache de réforme) et son système d'élevage d'autre part. L'essentiel de son troupeau allaitant est élevé dans le Massif Central (43% des vaches allaitantes françaises et 15 % des vaches européennes), en système majoritairement extensif. Un enjeu est de prédire, détecter et maîtriser les caractères phénotypiques complexes liés à la production de viande. Les recherches visent à proposer des outils de mesure pour détecter les animaux favorables, et à faire des recommandations pour piloter l'expression de ces caractères par une exploitation génétique objective des animaux ou par l'optimisation des facteurs d'élevage.

Les principaux objectifs des recherches sur la viande bovine sont d'affiner notre compréhension des caractères phénotypiques (muscularité, qualités sensorielles et nutritionnelle de la viande et des carcasses) et de leur variabilité. A ce jour, l'un des soucis majeurs des professionnels des filières bovines est la variabilité élevée de la qualité de ses produits, notamment des qualités sensorielles de la viande.

Les recherches visent à proposer des conduites d'élevage favorisant l'élaboration des produits de qualité et à fournir des marqueurs facilement mesurables et des méthodes de détection d'animaux donnant une qualité de viande favorable aux industries de transformation ou régulière en adéquation avec les attentes des consommateurs.

L'objectif du projet est d'identifier, évaluer et valider de nouveaux biomarqueurs dont l'utilisation permettra aux éleveurs et opérateurs de repérer les animaux les plus favorables et de les intégrer dans des trajectoires de production leur assurant des produits de qualité régulière voire élevée. Des biomarqueurs ont déjà été identifiés dans les tissus animaux impliqués dans la production de viande. Toutefois, leur accès est peu aisé du vivant des animaux et motive l'utilisation de nouveaux marqueurs moins invasifs présents dans les fluides des animaux (plasma). Pour réaliser ce projet (3 ans), un prélèvement de sang sera réalisé sur 95 génisses par un personnel formé selon les bonnes pratiques vétérinaires induisant peu d'incident post intervention (prélèvement caudal et un mode de contention adapté en ferme).

1578- L'imagerie joue un rôle fondamental dans l'évaluation de la réponse tumorale à la thérapie. L'intérêt majeur de cette évaluation est de déterminer rapidement l'efficacité ou l'échec d'un traitement puisque une réponse précoce est corrélée à un meilleur pronostic. Ainsi la détermination, le plus tôt possible, des bonnes et mauvaises réponses conduit à poursuivre ou à modifier le plan thérapeutique, à adapter les doses ou à changer le traitement. C'est dire l'importance de la fiabilité des méthodes d'évaluation précoce de l'efficacité des traitements.

La diminution du volume de la tumeur est généralement reconnue comme l'indicateur essentiel de la réponse tumorale. Sachant que la régression tumorale peut être lente (de plusieurs semaines à plusieurs mois), l'évaluation de la réponse utilisant ces critères est généralement effectuée 6 à 8 semaines après le début du traitement. Par ailleurs, l'imagerie anatomique ne décrit qu'un aspect de la tumeur, elle ne permet pas de rendre compte de leur vascularisation et de leur hétérogénéité (i.e. fraction de cellules proliférantes et/ou nécrosées). Il importe donc de trouver de nouvelles méthodes d'évaluation précoces permettant de fournir des paramètres dont les modifications traduisent la réponse au traitement avant

la diminution du volume. Des efforts ont porté sur l'imagerie fonctionnelle telles que la tomographie par émission de positons (TEP) ou la tomographie d'émission monophotonique (SPECT). Ces techniques sont basées sur l'imagerie de biomarqueurs reflétant plus ou moins directement les effets des traitements. Malgré leur efficacité, l'utilisation de ces modalités est limitée par leur coût et la nécessité d'injecter des substances radioactives à chaque examen.

L'enjeu médical du présent projet est de faciliter le suivi de la réponse tumorale à une thérapie anticancéreuse systémique grâce à des techniques ultrasonores non invasives et peu coûteuses. Le signal ultrasonore habituellement représenté sous forme d'image n'exploite qu'une partie de l'information qui arrive à la sonde. Le traitement numérique des signaux radiofréquences que nous proposons permettra de remonter à des paramètres de structures cellulaires (taille et concentration des noyaux de cellules) et de non linéarité tissulaire. Les nouvelles techniques ultrasonores d'estimation de structures cellulaires et de non-linéarité que nous proposons devraient permettre de détecter et quantifier la mort cellulaire pendant un traitement anti-cancéreux systémique, et d'évaluer de façon plus précoce (moins de 72h après l'administration du traitement) la réponse tumorale. On évaluera aussi l'efficacité des techniques d'imagerie de contraste ultrasonore (avec injection d'agents de contraste) pour faire le suivi de l'évolution du réseau micro-vasculaire pendant la thérapie anti-angiogénique.

L'étude proposée testera le potentiel des techniques ultrasonores quantitatives pour caractériser in vivo la réponse tumorale aux traitements anticancéreux systémiques. Une première étude sera menée in vivo pour l'évaluation ultrasonore des effets de différentes modalités de thérapie (chimiothérapie, thérapie anti-angiogénique et couplées) sur des modèles murins de cancer de la prostate. Une seconde étude sera menée sur un modèle d'angiogénèse « pur » (matrigel plug sous cutané) traitée avec un agent anti-angiogénique pour étudier la signature ultrasonore des microvaisseaux sanguins et leur influence sur la technique ultrasonore d'analyse fréquentielle pour l'estimation des structures cellulaires.

L'étude de faisabilité sera réalisée sur 60 souris pour évaluer le potentiel des biomarqueurs ultrasonores à court terme (variant de 24h à 3 semaines selon les groupes d'étude) et l'étude finale sera menée sur 64 souris avec un suivi par imagerie sur le long terme sur 10 semaines, soit au total 124 souris.

L'anxiété ou stress sur les animaux est minimisée par le personnel formé et qualifié à l'expérimentation animale niveau 1 et 2.

La procédure 1 xénotransgreffe de lignée prostatique tumorale est classée modérée. La tumeur reste localisée sur le flanc droit de la souris n'occasionnant pas de troubles fonctionnels chez l'animal. La tumeur atteint une taille trop importante (>1700 mm³), ces animaux seront sacrifiés. Une grille de score douleur sera utilisée afin d'apprécier l'intensité de la souffrance douloureuse des animaux. La surveillance de l'absence d'atteinte de point limite sera aussi réalisée.

La procédure 2 modèle murin d'angiogénèse est classée légère. Le matrigel (300µL) implanté en sous cutané est naturellement vascularisé et reste localisé dans le dos de la souris, n'occasionnant pas de troubles fonctionnels chez l'animal. Concernant les procédures 1 et 2, il ne devrait pas y avoir de comportement de souffrance suite aux interventions mais si un tel comportement est observé, un antalgique (paracétamol 200mg/kg VO) sera administré.

La procédure 3 concernant les imageries ultrasonore, SPECT et TEP est classée légère. Les techniques d'imagerie in vivo permettent intrinsèquement de réduire le nombre d'animaux et leurs douleurs éventuelles. Les seules sources de stress sont donc occasionnées lors de l'induction anesthésique et lors du réveil.

Les souris ne seront pas hébergées plus de 6/cages et en cas de comportement agressif les animaux seront isolés et les blessures soignées.

Le nombre restreint d'animaux examinés (6 à 8 animaux par groupe) permettra de mettre en évidence la faisabilité de nos approches en montrant qu'une corrélation existe entre les paramètres ultrasonores et la nature des tissus (mort cellulaire, vascularisation). Selon les résultats obtenus, une étude de plus grande ampleur pourra ultérieurement être mise en place.

1579- Domaine : La vaccination est un moyen très efficace de prévention des maladies infectieuses. La vaccination plasmidique (ou ADN) est un mode alternatif de vaccination qui présente de nombreux atouts. Il s'agit d'inoculer au mammifère un plasmide non répliquatif, codant pour un antigène vaccinal, qui induit une réponse immunitaire et protectrice contre un agent pathogène.

Objectifs : le but de cette DAP est d'optimiser la vaccination plasmidique dans le modèle murin par i) la délivrance de plasmides dans la peau, site optimal par sa commodité d'accès et par sa richesse en cellules présentatrices d'antigènes, ii) le ciblage des cellules présentatrices d'antigènes de la peau par fusion de l'antigène avec une séquence de ciblage, iii) l'optimisation de l'expression des plasmides par électro-transfert, iii) l'intérêt de l'addition de la voie intramusculaire à la voie cutanée. La combinaison de ces paramètres d'optimisation, réalisés sur un antigène rapporteur, la luciférase, permettra de révéler l'expression du plasmide et de déterminer quel est le protocole le plus efficace sur un plan générique. Les résultats constitueront une avancée dans le domaine de la vaccination plasmidique, pour laquelle nous ne disposons que de résultats parcellaires dans la littérature. Ce protocole optimisé sera utilisé dans un second temps, en dehors de cette DAP et par un laboratoire partenaire collaborateur, pour la mise au point d'un vaccin plasmidique contre le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift.

Règle des trois R : Remplacement : le projet portant sur la vaccination, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Les animaux utilisés sont des rongeurs (souris de laboratoire) qui proviennent d'élevages reconnus. Réduction : le projet prévoit le recours à un maximum de 500 animaux provenant d'élevages autorisés. Le nombre a été réduit au minimum pour permettre une analyse statistique fiable. Une même souris sera utilisée pour tester 2 méthodes d'introduction du plasmide dans l'organisme. Des expériences successives seront conduites pour affiner les paramètres de transfert sur la base de premiers résultats, et pour réduire le nombre de lots d'animaux de

manière rationnelle. Raffinement: l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur éventuel sachant que l'électro-transfert de plasmide utilisé dans de bonnes conditions n'induit pas de douleur. Lors de l'administration des vaccins, les souris seront toutes anesthésiées pour éviter tout inconfort selon un protocole validé par un vétérinaire. La grille nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Si une inflammation aigue avec début de nécrose était observée après l'administration de manière inattendue, les souris concernées seraient euthanasiées.

1580- La Rétinopathie Pigmentaire (RP) est une maladie oculaire génétique grave qui touche environ une personne sur 3000 au niveau mondial. Cette maladie se caractérise par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet puis à cône, entraînant une perte progressive profonde de la vision ou une cécité. Aucun traitement n'est disponible à l'heure actuelle. Antérieurement, nous avons montré l'importance du facteur RdCVF dans la survie des cônes. Alors que la plupart des facteurs neurotrophiques agissent sur les cellules cibles par le déclenchement d'une cascade de phosphorylation conduisant à l'inhibition de la mort cellulaire, l'effet trophique de RdCVF sur les photorécepteurs à cônes résulte de sa liaison à un récepteur de surface, le BSG1 qui est lui-même complexé au transporteur de glucose GLUT1. RdCVF stimule l'entrée du glucose dans les cônes, une action qui est directement corrélée à son activité neuroprotectrice.

Afin de valider et de mieux comprendre l'importance de cette voie dans le rôle du RdCVF dans la survie des cônes, nous nous proposons ici d'étudier le phénotype de la rétine de souris déficiente en Bsg1 et d'évaluer l'effet protecteur du RdCVF chez des souris rd0 déficientes ou pas pour le gène Bsg1. Si une différence de protection du RdCVF est démontrée entre ses deux groupes d'animaux, nous pourrions conclure que la voie passant par le Bsg1 est indispensable pour l'activité trophique du RdCVF et nous ouvre la voie à une future cible thérapeutique.

Au total 100 animaux seront utilisés pour ce projet. Dans la première partie du projet (60 animaux), nous réaliserons une étude phénotypique comparative (histologie /fonctionnalité) à 3, 6, 12 mois entre des souris déficientes en Bsg1 et des souris contrôles. Dans la seconde partie de ce projet (40 animaux), nous mènerons une étude sur l'effet trophique du RdCVF chez des souris rd10 (modèle murin de rétinopathie pigmentaire) déficientes ou non pour le gène Bsg1.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des carrés de cellulose et des bâtons à ronger. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

1581- Le projet concerne le développement d'une stratégie vaccinale sûre, efficace, et peu coûteuse, pour améliorer la santé de l'homme et des animaux domestiques en augmentant leur défense contre les agents pathogènes. Il s'agit de la vaccination ADN qui consiste à administrer un simple ADN nu (plasmide) permettant l'expression transitoire d'un ou plusieurs antigènes d'agents pathogènes pour l'induction d'une réponse vaccinale protectrice. Cette vaccination est reconnue comme une méthode économique et sûre pour l'environnement car elle s'affranchit de la production coûteuse de l'agent pathogène et ne présente pas de risque de diffusion de l'ADN dans l'environnement. Elle doit encore être optimisée notamment chez l'animal domestique et l'homme. Notre objectif est de développer des vaccins ADN de nouvelle génération pour les ruminants par l'amélioration des conditions de délivrance de l'ADN dans les cellules de la peau. Dans cette DAP qui fait suite à la DAP ADNvac, nous optimiserons l'entrée dans les cellules de l'ADN par électroporation et définirons les paramètres d'électroporation en fonction de l'âge du mouton. L'antigène modèle sera représenté par la luciférase, car son expression est très facilement détectable dans les tissus. Sur la base de ces résultats, le meilleur protocole de délivrance sera sélectionné pour une DAP suivante, qui concernera une vaccination immunisante avec un ADN codant pour un antigène issu d'un pathogène (programme de vaccination de l'Agence Nationale de la Recherche). La présente DAP qui impliquera un maximum de 10 moutons permet de travailler dans la règle des 3R :

Raffiner : déterminer le meilleur protocole d'expression d'antigène AVANT de procéder à la vaccination. Un précédent projet a montré que les modes d'administration peuvent induire une rougeur locale, l'animal ne présentant aucun signe de douleur. Toutefois l'administration aura lieu en matinée, les animaux seront observés dans l'après midi pour observer d'éventuels signes de brûlure locale. Réduire : le meilleur protocole d'expression d'antigène permettra de limiter le nombre de d'animaux vaccinés. Remplacer : nous avons testé les paramètres d'électroporation sur fragments de peau invitro (obtenus à l'abattoir) pour éviter le recours à l'expérimentation animale, mais l'électricité intrinsèque de la peau vivante, et du flux sanguin interfèrent sur les réglages de l'électroporation. Il est donc nécessaire d'établir les paramètres d'électroporation in vivo.

1582- Notre groupe travaille sur la reproduction de la chienne et notamment sur tous les événements périovulatoires (avant et après l'ovulation). Nous étudions l'expression des gènes codant pour différentes protéines dans l'ovaire et l'oviducte (la trompe) au cours du cycle reproductif.

Ces études comportent un aspect clinique appliqué et également un aspect de recherche fondamentale portant sur les mécanismes de la folliculogénèse, de l'endocrinologie et de la maturation ovocytaire. En effet, le cycle ovarien de la chienne présente un certain nombre de caractéristiques uniques parmi les mammifères comme la présence de follicules contenant plusieurs oocytes, une augmentation précoce de la progestéronémie et une maturation de l'ovocyte dans l'oviducte avant la fécondation (contrairement à l'ovocyte de la femme ou d'autres mammifères, qui mûrissent dans l'ovaire).

Nos objectifs sont de :

- caractériser les mécanismes physiologiques intervenant dans la reprise de méiose de l'ovocyte, pendant la période péri-ovulatoire.

- développer nos recherches sur les interactions gamètes-tractus génital via l'analyse des caractéristiques endocrinologiques et oviductales (réceptivité et rôle de la progestérone, analyse du fluide oviductal).

De plus, une collaboration active avec nos collègues cliniciens offrant des services d'aide à la procréation dans l'espèce canine permet une application directe de certains de nos résultats expérimentaux dans cette espèce.

Pour nos travaux au laboratoire, nous suivons le cycle ovarien par frottis vaginaux et dosages de la progestéronémie puis nous réalisons des ovariectomies à plusieurs stades du cycle ovarien, chez des chiennes adultes.

Pour ce projet, nous envisageons de stériliser environ 30 chiennes par an (5 lots de 6 animaux, cette taille de lot étant le minimum nécessaire pour que des résultats scientifiquement exploitables puissent être produits) soit, sur 5 ans, un total d'environ 150 chiennes. Le nombre d'animaux peut être encore réduit quand il nous est possible de collecter des prélèvements à des stades précis sur des animaux d'autres projets autorisés. Le traitement anesthésique et analgésique dont bénéficient nos animaux correspond aux dernières avancées en matière de médecine vétérinaire.

Les animaux demeurent dans notre établissement le temps nécessaire à ce qu'ils atteignent le stade physiologique d'intérêt (entre 1 et 8 mois). Nous mettons à profit ce séjour des animaux dans nos locaux pour les socialiser en vue de leur placement ultérieur (promenades en laisse plusieurs fois par semaine, distribution de récompenses au moment des prises de sang, accès à des parcours extérieurs, baignades, massages...).

1583- Le cerveau adulte a longtemps été considéré comme incapable de produire de nouvelles cellules. Cependant des études réalisées chez le rongeur, chez le primate non humain ainsi que chez l'homme ont montré que le cerveau est capable de produire de nouvelles cellules nerveuses ou neurones tout au long de la vie. Ces nouveaux neurones sont produits à partir de cellules particulières, non différenciées appelées cellules souches que l'on trouve dans des plusieurs zones du cerveau dont l'hypothalamus. L'hypothalamus est une région à la base du cerveau localisée de part et d'autre du troisième ventricule et impliquée dans le contrôle de nombreuses fonctions biologiques comme la reproduction, la prise alimentaire ou la régulation de la température corporelle. Les cellules souches de l'hypothalamus sont des tanycytes, des cellules qui bordent le troisième ventricule. Chez le mouton, nous avons contribué à la caractérisation de ces cellules souches et de la zone de l'hypothalamus dans laquelle elles sont localisées. De plus, nous avons obtenu des résultats préliminaires qui démontrent l'existence d'autres types de cellules souches différentes des tanycytes et localisées dans le tissu hypothalamique. Nous postulons donc que les cellules localisées à l'intérieur du tissu hypothalamique pourraient constituer une sous-population de cellules souches, et que, à ce titre elles pourraient également produire des nouveaux neurones hypothalamiques.

L'objectif scientifique de ce projet est double : démontrer la nature « souche » de ces cellules et déterminer leur rôle en les supprimant sélectivement.

Premièrement, nous voulons démontrer que ces cellules localisées dans le tissu hypothalamique sont aussi des cellules souches. Pour répondre à cet objectif (Figure 1 A) nous étudierons des souris transgéniques (GFAP-Glial-Fibrillary-Acidic Protein/ GFP - Green Fluorescent Protein ; Expérience 1). Grâce à ces souris l'étude de la distribution cellules souches dans le cerveau et dans l'hypothalamus en particulier est facilitée puisqu'elles sont visibles directement sous un microscope à fluorescence par émission d'une fluorescence verte. La localisation de ces cellules sera étudiée chez des souris adultes mâles et femelles.

Des molécules spécifiquement exprimés dans les cellules souches seront utilisés pour confirmer leur statut de cellules non différenciées. Ces expériences seront réalisées sur 5 souris adultes mâles et 5 souris adultes femelles, soit un total de 10 souris, un même animal pouvant fournir environ 35 coupes fines de 25 µm dans l'hypothalamus, les expériences seront réalisées sur dix animaux. Dans cette expérience 1, la règle des 3 R sera respectée puisque le nombre minimal d'animaux par groupe pour réaliser l'analyse statistique qui convient est de 5, plusieurs échantillons (coupes) de chaque animal sera exploité. Il n'existe pas d'alternative à l'étude de la distribution de ces cellules souches autrement que par la cartographie post-mortem.

Deuxièmement, il s'agit d'explorer le rôle de cette sous-population de cellules souches dans les fonctions physiologiques dépendantes de l'hypothalamus, comme par exemple la reproduction. Pour cela il est nécessaire de travailler in vivo sur un modèle dans lequel ces cellules sont sélectivement supprimées suite à l'administration d'un agent pharmaceutique (le ganciclovir). Ces souris transgéniques ont déjà été utilisées dans des études concernant le rôle des cellules gliales entériques chez la souris. Dans ces études, chez des souris non transgéniques (contrôles), il n'a été rapporté aucun effet toxique de l'administration de l'agent pharmaceutique. Pour notre expérience, les animaux seront répartis en 4 lots (Figure 1 B), des souris contrôles et des souris transgéniques chez lesquelles le ganciclovir est administré par voie intracérébroventriculaire pour cibler les cellules de l'hypothalamus et des souris contrôles et des souris transgéniques chez lesquelles le diluant, sans le ganciclovir, est administré par la même voie. Chaque lot sera constitué de 15 souris adultes mâles et de 15 souris adultes femelles. Pour cette expérience, 120 souris seront utilisées au total. Cinq souris par groupe et par sexe seront dédiées aux expériences en immunohistochimie pour la réalisation de coupes d'hypothalamus. Dix souris par groupe et par sexe seront dédiées aux tests comportementaux. Aucune étude antérieure n'a examiné les paramètres que nous souhaitons observer, nous ne disposons donc pas d'éléments en termes de différences attendues ou encore de variabilité, pour calculer raisonnablement la puissance de notre étude.

Dans cette expérience 2, la règle des 3 R sera respectée puisque le nombre d'animaux par groupe permettra de réaliser une analyse de variance à plusieurs facteurs (traitement x sexe) sur les tests de comportements et de valider l'efficacité des traitements par des expériences en immunohistochimie. Il n'existe pas d'alternative à ces expériences in vivo pour déterminer le rôle fonctionnel de ces cellules souches sur les fonctions dépendantes de l'hypothalamus.

L'ensemble de ce protocole concerne 130 souris : 10 souris (expérience 1) et 120 souris (expérience 2). Pendant la durée de l'expérience, tous les animaux seront placés dans un environnement enrichi, ils seront surveillés quotidiennement et euthanasiés s'ils présentent des signes de souffrance.

1584- La maladie d'Alzheimer (MA) est la première cause de démence chez la personne âgée. Cette pathologie est associée à de nombreux troubles cognitifs, affectant particulièrement les fonctions mnésiques. Cependant, les mécanismes cérébraux qui sous-tendent ces troubles de la mémoire demeurent largement incompris.

L'épilepsie serait l'un des processus intervenant dans les troubles mnésiques de la MA. En effet, les patients atteints de la MA et les souris modèles de la forme génétique de la MA présentent des crises d'épilepsie. De plus, l'administration d'un antiépileptique particulier, le lévétiracétam, améliore les performances mnésiques chez l'homme et les souris hAPPJ20, un des modèles murins de la MA. Afin de préciser le lien entre épilepsie et troubles mnésiques, le premier objectif de ce projet est de déterminer si un phénotype épileptique existe chez les souris Tg2576, un autre modèle murin de la MA et de situer l'âge d'apparition de ce phénotype par rapport à celui des troubles mnésiques chez ces souris.

Certains facteurs environnementaux (notamment, un niveau d'éducation élevé ou la pratique d'activités récréatives) chez l'homme et certaines conditions de vie intellectuellement et socialement stimulantes (l'enrichissement environnemental, EE) chez l'animal améliorent les performances mnésiques des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et des souris modèles de la MA. Des données du laboratoire montrent un effet pro-mnésiant de l'EE précoce (réalisé entre les âges de 3 et 5 mois et demi) chez les souris Tg2576. Dès lors, nous recherchons les mécanismes qui sous-tendent cet effet dans cette lignée de souris. L'épilepsie pouvant contribuer aux déficits mnésiques, le deuxième objectif de ce projet est de déterminer si l'enrichissement environnemental module le phénotype épileptique des souris Tg2576 et donc si cette modulation pourrait être responsable de l'effet pro-mnésiant de l'EE.

Pour cela, nous allons, par des méthodes pharmacologiques, électroencéphalographiques, immunohistochimiques :

- 1) Rechercher un phénotype épileptique chez les souris Tg2576 et le caractériser en fonction de l'âge.
- 2) Etudier l'effet d'un enrichissement environnemental précoce et transitoire (de 3 à 5 mois et demi) sur le phénotype épileptique des souris Tg2576.

Sur l'ensemble de ce projet, nous utiliserons 240 animaux soit 120 souris transgéniques (Tg) et 120 souris non transgéniques (NTg). Ces souris se divisent en :

- 12 groupes de souris mâles : deux fois (deux procédures) six groupes (pour chacun des trois âges choisis, deux groupes de génotype différent)
- 4 groupes de souris femelles : pour chacune des deux conditions d'hébergement choisies (milieu standard ou enrichi), il y aura deux groupes de génotype différent

Chacun des 16 groupes comportera 15 animaux.

Les mâles seront soumis à la procédure pharmacologique ou électroencéphalographique. Les femelles seront soumises aux deux, cela permettra d'utiliser des analyses statistiques de corrélation afin de diminuer les effectifs par lot.

Les conditions d'hébergement dans un établissement utilisateur doté d'une structure du bien-être animal et les méthodes utilisées seront appropriées pour réduire le plus possible toute angoisse ou dommage durables que pourraient subir les animaux. Le suivi journalier (au moins) des animaux sera clairement défini avec interruption de l'expérimentation si l'un des critères d'arrêt est atteint. De cette manière, la règle des trois R sera respectée.

1585- Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'étudier le devenir d'une molécule, candidat-médicament administrée chez le rongeur (souris ou rat) par voie oropharyngée, lorsque ces espèces sont utilisées au cours du développement préclinique de cette molécule (pharmacocinétique).

Pour cela, au cours de chaque étude, des prélèvements sanguins répétés sont réalisés chez l'animal vigile après l'administration du candidat-médicament et éventuellement du véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée (en général 4 groupes avec 3 animaux par groupe ; soit un nombre prévisionnel maximum de 1800 animaux sur 5 ans).

Ces prélèvements de sang sont utilisés pour mesurer dans le temps la concentration du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites et éventuellement la concentration de différents marqueurs biologiques pertinents. A la fin de l'étude, différents tissus (trachée, poumons ...) peuvent aussi être analysés.

L'utilisation de la voie d'administration oropharyngée permet à une molécule d'atteindre la trachée et les poumons et présente différents avantages (voie non-chirurgicale, facile à maîtriser et peu stressante pour l'animal, distribution uniforme et bilatérale du produit dans les poumons).

Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur (rat ou souris) car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour étudier la pharmacocinétique d'une molécule. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. L'étude pharmacocinétique est donc une étape importante, car une molécule peu absorbée ou rapidement éliminée a peu de chances d'être développée.

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

Raffinement : Au cours de ces études, le raffinement est effectué par :

- La mise au point de procédures rigoureuses
- La formation du personnel

- Un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- Le recours à une procédure peu invasive
- des soins adéquats
- des gestes peu stressants et peu douloureux
- la recherche des points limites

1586- Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre,

c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les anticorps polyclonaux (AcP) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérum sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant.

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

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps polyclonaux est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

La poule est notamment utile pour la production d'AcP contre des protéines de mammifères, car elle est éloignée phylogénétiquement de la classe des Mammalia. L'emploi de poule peut être considéré comme un raffinement de la production d'AcP, car ces derniers peuvent être extraits du jaune d'œuf sans avoir à prélever du sang sur l'animal. De plus, l'utilisation de poules contribue également à la réduction du nombre d'animaux utilisés, ces dernières produisant de plus grandes quantités d'anticorps que les rongeurs de laboratoire. De manière générale, les poules sont d'excellentes productrices d'anticorps et leur réponse immunologique est comparable à celle des mammifères. Il faut cependant souligner que les poules ne conviennent pas à toutes les applications.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 15 protocoles, représentant 30 poules.

Le temps minimum d'immunisation est de 35 et de 77 jours.

Dans la production d'anticorps polyclonaux, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 14 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modéré en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les poules sont hébergées dans des installations appropriées et elles disposent d'enrichissement (grattoir).

1587- Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde et sont à l'origine de 30% de la mortalité mondiale totale. L'hypertension représente un des facteurs de risque majeur à l'origine de ces maladies (athérosclérose, accidents vasculaires cérébraux, infarctus du myocarde, artériopathie des membres inférieurs, insuffisance rénale chronique, insuffisance cardiaque). L'hypertension affecte environ 20% de la population adulte et ce facteur de risque reste souvent mal contrôlé avec les traitements actuellement sur le marché (seule la moitié des patients présente une hypertension contrôlée).

Afin de mettre au point de nouveaux médicaments permettant d'améliorer le traitement de l'hypertension, il est nécessaire d'avoir recours aux études sur l'animal. En effet, l'évaluation de l'activité pharmacologique d'un candidat médicament doit se faire à l'échelle d'un organisme entier mettant en jeu les interactions entre les différents organes. Dans le cas de l'hypertension, les mesures de pression artérielle et de fréquence cardiaque sont réalisables exclusivement sur des modèles in vivo. D'autre part, l'efficacité doit être démontrée dans des modèles physiopathologiques reproduisant le plus fidèlement possible la pathologie humaine.

Une série d'études in vitro est d'abord réalisée, qui permet de démontrer la puissance et la sélectivité de candidats médicaments sur la cible d'intérêt et d'aboutir à la sélection d'une molécule. Des études in vivo sont ensuite réalisées pour permettre de déterminer l'activité de la molécule sélectionnée sur les symptômes cliniques. Cette approche animale, en seconde intention, permet de limiter le nombre d'animaux utilisés en accord avec la règle des 3R.

Le but de ce projet de recherche est d'évaluer l'efficacité de candidats médicaments sur un modèle d'hypertension en utilisant des rats sensibles au sel, les rats DAHL, cette souche permettant l'induction d'une hypertension artérielle en réponse à un régime riche en sel par augmentation du volume sanguin. Les mesures d'hémodynamique (pression artérielle et fréquence cardiaque) seront effectuées à distance grâce à des capteurs de télémétrie implantés en première phase de l'étude sous anesthésie générale. Un suivi des paramètres, en temps réel, sera alors réalisé sur une période pouvant aller jusqu'à 6 mois au sein de l'animalerie, sans contraintes pour l'animal et dans son environnement habituel. Ces animaux adultes seront soumis à une alimentation supplémentée en sel (Na Cl 8%) pendant plusieurs semaines afin d'étudier l'évolution de la pathologie et ses incidences sur les organes cibles (reins, cœur, aorte) à la fin du régime. Les candidats médicaments seront administrés au début du régime ou au cours de celui-ci selon que l'on veut démontrer un effet préventif ou curatif.

Les animaux feront l'objet d'un suivi et d'une surveillance particulière par les expérimentateurs et le personnel de zootechnie. La connaissance du modèle et en particulier la limitation du régime dans le temps va permettre de réduire l'apparition de signes de souffrance liés à l'évolution de la pathologie. Selon nos connaissances, dans cette période de régime déterminée, l'hypertension se maintient en effet sans atteinte grave des organes cibles. Cette durée de régime a donc été déterminée afin d'anticiper la survenue de signes de détérioration de l'état général. Si toutefois un des points limites prédéfinis devait être atteint, les animaux seront soustraits des études. Les rats DAHL sont hébergés dans un milieu enrichi en cubes de bois à ronger.

En accord avec les données de la littérature scientifiques, les expériences préalablement réalisées dans le laboratoire et en attendant la consultation statistique, nous estimons la quantité d'animaux nécessaires à ce projet à 675 animaux sur 5 ans.

1588- Ces dernières années, un nombre croissant de travaux a mis en évidence la participation de la flore intestinale ou microbiote intestinal à l'axe de communication intestin-cerveau. Notre objectif est de caractériser les effets de probiotiques (micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels) sur la réponse au stress et sur des pathologies souvent associées à une dérégulation de cette réponse, à savoir l'anxiété et la dépression. Le projet sera conduit sur des modèles de rat ayant naturellement une réactivité exacerbée au stress, ou chez lesquels des comportements de type anxieux ou dépressif sont induits par l'application d'un stress chronique. Il s'agit de déterminer s'il est possible de modifier la réactivité au stress et les comportements de type anxieux et dépressif en agissant sur le microbiote intestinal via des probiotiques. A la fin des tests comportementaux, les rats seront euthanasiés et le cerveau, le sang, les fèces et un morceau d'intestin seront prélevés pour des analyses biochimiques. Ce projet pourrait déboucher sur une nouvelle stratégie thérapeutique dans la prise en compte de l'anxiété et/ou la dépression. Il n'existe pas de méthodes alternatives pour réaliser ce travail car il s'agit d'étudier des interactions complexes au sein de l'hôte et le nombre de rat (148) se justifie par les analyses comportementales et biochimiques effectuées qui nécessitent un minimum d'animaux pour être statistiquement exploitables. Les rats proviennent d'élevages reconnus et sont nés en captivité. Leur hébergement sera enrichi par des feuilles de sopalin et des bâtons à mordre. La souffrance et l'angoisse des rats seront réduites au maximum et un suivi quotidien permettra de réagir de façon adéquate en cas de besoin.

1589- Le microbiote intestinal, ensemble des bactéries qui peuplent notre tube digestif, est constitué de plusieurs centaines d'espèces et est spécifique de chaque individu. Récemment, il a été révélé l'implication potentielle de ce microbiote dans l'obésité. Ainsi, les souris axéniques (dépourvues de microbiote intestinal) sont résistantes à une obésité induite par un régime riche en lipides. La bactérie B29, issue du microbiote d'un patient atteint d'obésité morbide, est capable à elle seule d'induire une obésité chez des souris. Des résultats préliminaires suggèrent que les lipopolysaccharides (lps), composants essentiels de la membrane de certaines bactéries, jouent un rôle dans cet effet obésogène.

Cette étude vise à démontrer que la reconnaissance de ces lps par l'hôte est nécessaire pour induire une obésité ce qui constituerait une avancée importante dans la compréhension des mécanismes liant microbiote intestinal et obésité.

Pour cela, la bactérie B29 sera inoculée à des souris axéniques possédant (C3H/HeN) ou ne possédant pas (C3H/HeN TLR4null MyD88KO) la voie de signalisation impliquée dans la reconnaissance des lps. Deux groupes contrôles seront constitués par ces deux souches de souris axéniques (sans la bactérie B29). L'ensemble des souris recevra un régime riche en lipides. Nous comparerons le développement de l'obésité chez ces quatre groupes de souris.

Le projet, portant sur la relation entre l'alimentation, l'hôte et ses bactéries, met en jeu des interactions complexes, il est donc impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

Lors de la conception du protocole expérimental nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Le projet prévoit ainsi le recours à un minimum nécessaire de 56 animaux.

Les souris n'auront comme seul traitement une alimentation spéciale constituée à 60% de lipides. Elles seront pesées de façon hebdomadaire. Durant l'expérimentation nous collecterons des fèces et de l'urine par simple contention de la souris. Le dernier jour avant l'euthanasie nous ferons un test de tolérance au glucose sur l'ensemble des animaux de ce protocole (mesure de la glycémie sanguine).

Compte tenu de la faible invasivité du protocole, aucune souffrance animale n'est attendue dans cette étude. Toutes les souris auront dans chaque cage un enrichissement de milieu par l'ajout de Sopalin (pour faire le nid) et d'un bâton de bois à ronger. Les souris seront 2 par cage pour éviter l'isolement. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

1590- L'enrichissement du milieu est un facteur de bien-être pour les animaux en expérimentation qui sont amenés à rester un temps plus ou moins prolongé dans leur cage d'habitation.

L'annexe II de l'Arrêté du 1er février 2013 (J.O. R.F., Texte 30/130, 07/02/13) à propos des exigences relatives aux établissements et des exigences relatives aux soins et à l'hébergement des animaux stipule à propos de l'enrichissement que tous les animaux doivent disposer d'un espace suffisant présentant une complexité adéquate pour leur permettre d'exprimer un large répertoire de comportements normaux. Ils doivent disposer d'un certain degré de contrôle sur leur environnement et d'une certaine liberté de choix afin d'éviter les comportements induits par le stress. Les établissements veillent à mettre en place des techniques d'enrichissement appropriées qui élargissent la gamme d'activités possibles des animaux et développent leurs capacités d'adaptation, en encourageant notamment l'exercice physique, l'exploration, la manipulation et les activités cognitives, en fonction des espèces. L'enrichissement environnemental dans les compartiments doit être adapté aux besoins spécifiques et individuels des animaux concernés. Les stratégies d'enrichissement dans les établissements doivent être régulièrement revues et mises à jour.

Il est donc nécessaire de mettre en place de l'enrichissement mais il ne faut pas que celui-ci modifie les résultats des études car un certain nombre de paramètres peuvent être modifiés par l'enrichissement comme : le poids (légère baisse due à une augmentation d'activité), les comportements alimentaire et hydrique, l'activité générale des animaux (plus importante, moins de repos), la température corporelle, les paramètres biologiques (corticotérostéone, interleukines...), le temps de cicatrisation, la production de lait, la reproduction et les FONCTIONS COGNITIVES et le Métabolisme cérébral : beaucoup d'études ont en effet montré que l'enrichissement améliorerait les performances cognitives et provoquait des effets cellulaires et moléculaires sur les modèles animaux des désordres du système nerveux central (Alzheimer, Parkinson, Stroke...)

L'objectif de notre projet est de comparer à l'aide du test du labyrinthe en croix surélevé (LCS) le comportement de type anxieux de rats mis en présence de différents enrichissements et recevant différents traitements anxiolytiques, pour déterminer les conditions optimales d'utilisation du test prenant en compte l'enrichissement du milieu requis par la nouvelle Directive Européenne.

Dans ce projet, 108 rats issus d'une précédente étude et ayant subi une procédure de classe modérée au maximum seront utilisés, en 12 groupes de 9 animaux. Chaque groupe sera testé dans le LCS recevant 3 traitements différents :

- Groupe 1 : Véhicule - pas d'enrichissement
- Groupe 2 : Véhicule- Enrichissement 1
- Groupe 3 : Véhicule- Enrichissement 2
- Groupe 4 : Véhicule- Enrichissement 3
- Groupe 5 : Diazépam (3 mg/kg, per os) - pas d'enrichissement
- Groupe 6 : Diazépam (3 mg/kg, per os) - Enrichissement 1
- Groupe 7 : Diazépam (3 mg/kg, per os) - Enrichissement 2
- Groupe 8 : Diazépam (3 mg/kg, per os) - Enrichissement 3
- Groupe 9 : Produit X (15 mg/kg, per os) - pas d'enrichissement
- Groupe 10 : Produit X (15 mg/kg, per os) - Enrichissement 1
- Groupe 11 : Produit X (15 mg/kg, per os) - Enrichissement 2
- Groupe 12 : Produit X (15 mg/kg, per os) - Enrichissement 3

Le poids, la prise alimentaire et hydrique seront relevés pendant toute la durée de l'expérimentation afin de recueillir un maximum d'information.

Après 15 jours en présence de différents enrichissements, les animaux sont placés dans le LCS pendant 5 minutes et leur comportement est enregistré. Ils sont observés en continu au cours des tests comportementaux pour vérifier qu'ils ne tombent pas du dispositif expérimental. Aucune douleur n'est induite par ce test. Les animaux seront mis à mort à l'issue de ce test.

Le Diazépam a été choisi comme anxiolytique de référence, cette molécule étant la benzodiazépine de référence en psychopharmacologie. Le produit X, hydrolysate peptidique d'origine naturelle, est une référence interne fournie par un client de la société. Son évaluation toxicologique a été effectuée et n'a montré aucun effet toxique après administration aiguë par voie orale à la dose de 2000 mg/kg et après administration subchronique pendant 28 jours à la dose de 1000 mg/kg/jour.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets anxiolytiques de nouveaux produits car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) (remplacement). Les essais permettront de déterminer l'effet de différents enrichissements dans le modèle, ce qui permettra à l'avenir de choisir un enrichissement et de l'inclure dans toute nouvelle étude d'anxiété. Ainsi des résultats optimum seront obtenus en tenant compte du bien-être des animaux : Cela permettra également d'utiliser le nombre adéquat d'animaux dans les meilleures conditions et d'éviter d'utiliser trop (réduction) ou trop peu (raffinement) d'animaux pour permettre l'exploitation des résultats.

1591- On diagnostique en France 11 000 nouveaux cas de lymphomes chaque année. Les lymphomes représentent par ordre de fréquence des cancers le 6ème rang survenant chez les hommes et les femmes ainsi que le 7ème en terme de cause de décès par cancer en France. Près d'un patient sur deux atteint d'un lymphome décède de sa maladie.

Le développement de nouveaux traitements est donc nécessaire. Parmi ceux-ci, les peptides pénétrants (CPP) sont des molécules qui peuvent entrer dans les cellules sans causer de dommages de la membrane, ce qui conduit à leur utilisation proposée comme vecteurs de délivrance des produits thérapeutiques. L'utilisation de ces CPP est devenue l'une des techniques les plus efficaces pour parvenir à l'accès intracellulaire et compte tenu de leur faible taille, il présente une faible toxicité et un faible effet immunogène. Plusieurs peptides pénétrants qui atteignent le cytoplasme et le noyau ont déjà été identifiés. Parmi ceux-ci, un CPP a démontré une activité in vitro sur cellules tumorales de lymphomes B humain.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer in vivo l'activité de ce CPP thérapeutique bi-fonctionnels qui ciblent spécifiquement les cellules tumorales dans deux modèles de lymphome B humain xénotransplantés chez la souris.

Le nombre d'animaux utilisés sera de 24 souris, 12 souris SCID et 12 souris BALB/c nude, réparties en 4 groupes de 6 souris afin d'avoir tous les contrôles nécessaires pour valider l'activité thérapeutique de ce CPP. L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, de réduction et de raffinement. En effet, l'activité de ce peptide a été évaluée in vitro dans un premier temps (principe de remplacement), le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction) et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux (principe de raffinement).

1592- Depuis ces dernières décennies, on assiste à une augmentation importante des maladies inflammatoires du poumon. Une inflammation trop importante ou durable nécessite une réparation prolongée des tissus. Les tissus cicatriciels résultants n'étant pas pleinement efficaces, la fonction de l'organe en est altérée. L'utilisation d'anti-inflammatoire devrait permettre de contrôler l'inflammation et ainsi limiter les lésions des tissus.

Les anti-inflammatoires disponibles actuellement ont des activités limitées et présentent de nombreux effets indésirables. Il apparaît donc nécessaire de mettre au point des traitements anti-inflammatoires efficaces et présentant moins d'effets secondaires.

Notre objectif est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire de produits pharmacologiques en cours de développement, candidats-médicaments, dans un modèle d'inflammation pulmonaire créé par administration intranasale de lipopolysaccharides bactériens chez la souris.

Le développement de candidats-médicaments à partir de modèles moléculaires et cellulaires disponibles requiert une transposition dans des modèles intégrés et complexes après que leur activité ai été mise en évidence. C'est pour cette raison qu'une approche in vivo chez la souris est nécessaire pour s'assurer de l'activité anti-inflammatoire des nouveaux candidats-médicaments.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser un modèle animal chez la souris, car cette espèce est étudiée depuis de nombreuses années et présente un système immunitaire similaire à l'homme. A ce jour, aucun modèle moléculaire et/ou cellulaire n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre de reproduire l'ensemble des phénomènes biologiques impliqués dans le recrutement des cellules inflammatoires, et l'ensemble des mécanismes de dégradation, de transport et d'élimination des composés pouvant affecter l'activité des candidats médicaments. C'est pour cette raison qu'une approche in vivo est nécessaire pour déterminer l'activité anti-inflammatoire de nouveaux médicaments et obtenir la preuve de concept avant de poursuivre leur développement.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance de l'animal. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupes de 8, dans des cages de grande taille et enrichies de tubes en carton. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux.

La douleur liée aux injections est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'administration des candidats-médicaments pour visualiser tout signe de toxicité qui nécessiterait la mise à mort de l'animal.

Réduire

La réalisation des procédures par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Nous avons montré que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet une mesure efficace de l'activité anti-inflammatoire d'un candidat-médicament à l'aide de 24 souris réparties en 4 groupes de 6 souris : un groupe témoin, un groupe contrôle recevant le candidat-médicament, un groupe témoin de l'inflammation pulmonaire, et un groupe thérapeutique avec administration du candidat-médicament dans l'inflammation pulmonaire.

Il est prévu d'évaluer l'activité de 12 candidats-médicaments par an (288 souris) sur une période de 5 ans, soit un total de 1440 souris.

1593- La réglementation en vigueur concernant la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et Arrêté du 1er février 2013 relatif

à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques) requiert que le personnel soit compétent. Le personnel de notre institut suit les formations théoriques obligatoires. Afin de compléter cette formation, nous offrons à nos nouveaux arrivants ainsi qu'au personnel souhaitant maintenir ses compétences techniques, la possibilité de réaliser les techniques d'administration ou de prélèvements sanguins faits en routine dans nos animaleries.

Cette formation continue permet ainsi à nos techniciens d'être compétents et de réaliser l'ensemble des projets de l'institut dans les meilleures conditions pour les animaux. L'ensemble de nos projets se déroulant sur animaux vivants, il ne nous est pas possible de réaliser des formations autrement chez la souris.

Par ailleurs, afin de réduire au minimum le nombre de souris utilisées, dès que possible, les animaux servant aux formations proviendront d'autres projets terminés et de sévérité légère à modérée. Sachant que les animaux pourrons faire un maximum de 3 procédures, un maximum de 850 animaux sera nécessaire par an pour assurer la formation continue et le maintien de compétences de l'ensemble du personnel.

Aucun dommage particulier n'est attendu au cours de ces formations, les procédures étant classées légères. De plus, les animaux seront observés quotidiennement afin de s'assurer de leur bon état général et toute procédure potentiellement stressante sera réalisée sous anesthésie générale afin de préserver le bien-être animal.

1594- L'hémostase constitue l'ensemble des mécanismes qui assurent la prévention des saignements spontanés et l'arrêt des hémorragies par réparation de la brèche vasculaire.

Les pathologies de l'hémostase sont nombreuses et peuvent toucher l'hémostase primaire (anomalies plaquettaires : thrombopénies acquises centrales ou périphériques, thrombopénies constitutionnelles, thrombopathies, anomalies plasmatiques constitutionnelles ou acquises) ou la coagulation (hémophilies, déficit en facteur de la coagulation, etc.).

L'étude de l'hémostase est donc extrêmement importante en clinique. Elle peut relever de l'urgence ou faire appel à des investigations sophistiquées en cas de diagnostic complexe.

Les tests d'hémostase sont utilisés pour le diagnostic étiologique d'un syndrome hémorragique, afin d'essayer d'évaluer un risque hémorragique avant une intervention chirurgicale, ainsi que dans le cadre de thromboses à répétition, pour déterminer la cause de ces maladies invalidantes et graves, puisque certaines peuvent entraîner la mort par embolie pulmonaire.

D'un point de vue pratique nous utiliserons 26 souris réparties en 3 groupes au total que nous possédons habituellement au laboratoire.

Au cours de cette formation et ce protocole, nous nous attacherons à réduire au maximum le nombre d'animaux en calculant statistiquement le nombre exact d'animaux nécessaires par groupe pour avoir une différence significative en utilisant des logiciels statistiques spécifiques comme le logiciel R ou G power.

Avec ce protocole nous nous sommes attachés à éviter au maximum toutes formes de souffrance des souris impliquées en anesthésiant les souris et la maintenir à 37°C tout au long de l'expérience et en injectant à la fin de l'expérience du sérum physiologique en sous-cutanée afin de rétablir rapidement l'hémodynamique chez la souris.

A ce jour, il n'est pas possible de remplacer l'utilisation de souris par des techniques alternatives pour étudier les fonctions d'hémostase et l'activité plaquettaires

1595- Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre,

c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les anticorps polyclonaux (AcP, antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production

d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire); lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antiserum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles uniquement lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

La chèvre est particulièrement adaptée aux projets pour lesquels une quantité importante d'anticorps est requise. Elle permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 3 protocoles, représentant 6 chèvres.

Le temps minimum d'immunisation est de 77 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les chèvres sont hébergées en groupe dans des enclos structurés afin de pallier à toute forme de détresse.

1596- Le diabète, est une maladie touchant près 365 millions de personnes dans le monde, dont plus de 3 millions en France. Son mauvais équilibre engendre des complications pouvant conduire à des infarctus du myocarde, des atteintes rénales, nerveuses, et pouvant conduire à une cécité et au décès.

Le traitement des patients diabétiques de type 1 et 2 insulino-requérants, consiste en des injections pluriquotidiennes d'insuline, douloureuses et inconfortables, par voie sous-cutanée. Ces pluri-injections sont le résultat d'une durée d'action limitée des insulines commerciales. Ainsi, il paraît important de développer de nouvelles insulines à durée d'action plus longue (quelques jours) ou de combiner ces insulines à des dispositifs de délivrance progressive de celle-ci. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet. En effet, l'idée est de créer un système de délivrance d'insuline progressive dans le temps, par encapsulation de l'insuline dans des microsphères poreuses elles même dispersées dans un hydrogel commercial utilisé en clinique. La non toxicité et la biocompatibilité des microparticules a été démontré lors d'étude in vitro et in vivo. De plus, in vitro il a été démontré une stabilité des microparticules d'insuline jusqu'à 6 semaine avec délivrance d'insuline pendant 21 jours. Ainsi, l'objectif du projet est d'évaluer in vivo l'efficacité normoglycémisante de ce système sur des rats diabétiques de type 1.

Le projet nécessitera 80 rats Wistar. La règle des 3R, soit réduire, raffiner, remplacer est respecté. Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaires pour obtenir des résultats statistiques et ne pas avoir à recommencer l'étude. Les animaux seront hébergés à 4 par cage avec eau et nourriture ad libitum. Pour réduire le stress, les cages seront enrichies à l'aide de cylindres rouges en PVC. Les rats seront placés en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie réglementaire. Si des signes de douleur sont observés, des injections d'anti-biotiques, d'anti-inflammatoires et d'anti-douleurs seront réalisées. Si les points limites sont atteints, les rats seront immédiatement euthanasiés. Par ailleurs, les litières seront changées très fréquemment et deux biberons par cage seront mis en place afin de faciliter l'accès à l'eau aux rats diabétiques.

1597- Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre,

c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les anticorps polyclonaux (AcP, antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western, les

procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

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

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps polyclonaux est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

La production d'AcP chez le rat est particulièrement adaptée aux projets pour lesquels une qualité d'anticorps est requise, tout en limitant le nombre d'animaux à engager dans les programmes de production ainsi que la durée des protocoles. En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 30 protocoles, représentant 300 rats.

Le temps minimum d'immunisation est de 35 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modéré en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les rats sont hébergés en groupe dans des cages adaptées afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (rouleau en carton,...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

1598- Notre processus de production assure la production d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par un immunogène. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique ; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun leur spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un anticorps monoclonal est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses à mener à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

L'approche envisagée pour l'obtention d'AcM, se base sur la technique d'hybridation cellulaire. Son principe repose sur deux étapes principales, à savoir :

- injection d'une protéine d'intérêt (antigène) à des rats, afin de permettre la production, par des lymphocytes B, d'anticorps dirigés contre cette molécule qui est reconnue par ce modèle animal comme du « non-soi ».

- les lymphocytes B, isolés à partir de la rate des rats immunisés, seront fusionnées à une cellule immortelle de myélome rat, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'anticorps monoclonal synthétisé par son lymphocyte parental.

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

Même si les souris restent les animaux les plus couramment utilisés pour l'obtention d'anticorps monoclonaux, les rats sont notamment intéressants pour l'obtention d'IgG spécifiques pour les protéines de souris. Le rat est facile à manipuler et à élever en laboratoire. L'utilisation de rats permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 10 protocoles, représentant 30 rats.

Le temps d'immunisation des rats sera de 63 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité modéré. La procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation. Au cours du processus d'immunisation, des échantillons de sang de l'animal seront prélevés pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire).

Les rats sont hébergés en groupe dans des cages adaptées afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (rouleau en carton,...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

1599- Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre,

c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les anticorps polyclonaux (AcP, antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

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

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps polyclonaux est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

La petite taille des souris constitue un obstacle à la collecte d'une quantité importante d'AcP. Cependant le modèle murin est particulièrement avantageux pour des projets nécessitant une faible quantité limitée d'anticorps ou pour lesquels la quantité d'antigène disponible est limitée à quelques microgrammes. De plus, les souris ont une bonne capacité à s'adapter en laboratoire et sont des animaux faciles à manipuler et à élever.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 protocoles, représentant 250 souris.

Le temps minimum d'immunisation est de 35 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modéré en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la

santé des animaux. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

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

1600- La diarrhée est une quantité de selles émises dans un volume plus important que la normale (plus de 300 grammes par jour) et avec une plus grande fréquence (plus de trois selles par jour). Les selles sont généralement liquides, mais parfois simplement molles, accompagnées de glaires ou de sang et d'un cortège de symptômes variables dépendant de la cause de la diarrhée. Il est même possible dans certains cas que ce ne soit que de l'eau ou un liquide transparent. Les diarrhées sont généralement accompagnées de douleurs et de crampes aux intestins qui peuvent rendre le sujet mal à l'aise, ainsi que de frissons et de sueurs froides dans certains cas. Les diarrhées sont la seconde cause de mortalité infantile dans les pays du tiers monde (après les pneumonies), et sont responsables de 18 % des morts d'enfants de moins de 5 ans.

Les causes de la diarrhée peuvent être d'origines différentes : infection digestive virale (gastroentérite), intolérance alimentaire (lactose, sorbitol, gluten...), anxiété ou émotion intense (terreur ou stress), effet secondaire de certains médicaments (antibiotiques), résultante d'une maladie (colopathie, maladie de Crohn, rectocolite hémorragique, syndrome du côlon irritable...), certains traitements (radiothérapie, chimiothérapie)...

Parmi les médicaments permettant de traiter la diarrhée figure le loperamide, plus connu sous le nom d'imodium. Il agit en modifiant le fonctionnement des nerfs de l'intestin en vue de diminuer la quantité de matières fécales produite, ralentir la fréquence des selles, rendre les excréments plus solides et atténuer les crampes. Mais ce médicament ne peut pas être prescrit pour toutes les causes à l'origine de la diarrhée, pour les personnes souffrant d'allergie à ce médicament ou à l'un de ses ingrédients, et il peut présenter des effets secondaires plus ou moins importants.

L'intérêt est donc le développement de produits naturels sous forme d'extrait de plantes ou de compléments alimentaires ayant des effets anti-diarrhéiques avec une bonne tolérance et sans effets secondaires.

L'objet de ce projet est donc d'étudier l'effet anti-diarrhéique du produit naturel LR administré à 3 doses, pour évaluer l'effet dose-dépendant et définir la dose efficace, chez des rats mâles Wistar adultes soumis à l'induction d'une diarrhée par administration orale d'huile de ricin, en comparaison avec le loperamide. Cette étude nécessite l'utilisation d'animaux car aucun modèle *in vitro* n'existe pour étudier l'effet anti-diarrhéique de substances (remplacement).

Un total de 40 rats est nécessaire pour ce projet, répartis en 5 groupes de 8 rats chacun, correspondant au nombre d'animaux minimum (réduction) permettant une analyse statistique des résultats obtenus (raffinement). Les animaux sont placés à 2 par cage. Ils sont mis à jeun la veille au soir de la réalisation du test. Le jour du test, les animaux sont traités avec une administration orale des substances à tester et une heure plus tard ils reçoivent, toujours par administration orale, de l'huile de ricin. Les animaux sont ensuite placés individuellement dans des cages à métabolisme pour une durée de 4 heures permettant le recueil des selles et la quantification de différents paramètres (temps de latence d'émission des premières selles, nombre et consistance des selles émises), ainsi que l'observation de leur comportement (activité, posture, aspect de la fourrure et ouverture des yeux).