



**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 (16)

1601- Des cellules souches ont été découvertes dans la rétine ouvrant de nouvelles pistes thérapeutiques pour de nombreuses causes de déficience visuelle. Notre projet consiste à analyser le comportement de ces cellules dans un organisme vivant lors de la formation de la rétine et en conditions pathologiques. Notre approche est d'étudier ces cellules chez une espèce dotée de capacités régénératives naturelles (l'amphibien xénope) afin de déterminer pourquoi cette faculté ne se retrouve pas chez l'Homme et éventuellement appréhender le moyen de la restaurer.

Notre première approche consiste à perturber la fonction de gènes candidats et à en suivre les conséquences sur les cellules souches. Par ailleurs, nous souhaitons établir des lignées transgéniques modèles de pathologies dégénératives rétinienne. Ces modèles sont essentiels à la compréhension des pathologies et au développement de traitements. Finalement, nous étudierons les conséquences de lésions physiques également responsables de déficiences visuelles. La comparaison des modalités de réparation utilisées dans ces différents systèmes permettra de dégager les aspects communs et singuliers de ces pathologies.

Avantages et dommages escomptés

Le xénope est un organisme modèle majeur en embryologie, soutenu par une imposante bibliographie. Il permet d'associer aux approches classiques, l'étude à grande échelle de la fonction des gènes et des analyses pharmacologiques avancées.

La rétine de xénope constitue un système expérimental privilégié pour l'étude des cellules souches car accessibles, localisées et actives en conditions normales et pathologiques.

L'essentiel de nos expériences concernent des larves non-autonomes. L'établissement de lignées transgéniques modèles de pathologies reposent sur des systèmes d'ablation cellulaire ciblés, inductibles et réversibles. L'apparition du phénotype se fait uniquement lorsque requis et sur une durée limitée. L'induction de lésions physiques rétinienne est réalisée soit par simple piqure d'aiguille sous anesthésie soit de manière non-invasive par forte illumination. Les phénotypes concernent une population précise de cellules dans un organe non-vital qui régénère entièrement chez l'espèce concernée. Finalement, la déficience visuelle consécutive à une dégénérescence cellulaire, comme dans la DMLA, est indolore. Le niveau de sévérité attendu est donc de classe légère.

Nombre et types d'animaux utilisés sur 5 ans

2220 animaux (420 sauvages, 300 transgéniques, 1500 individus de stades postérieurs à la larve autonome).

Conformité avec les exigences 3R

Le choix du modèle et des procédures reposent sur les propriétés suivantes :

- i) La fécondation *in vitro* permet d'obtenir plusieurs milliers d'embryons à partir d'un nombre restreint d'adultes autorisant plusieurs expérimentations simultanées, une réduction de la variabilité et une analyse statistique robuste des résultats.
- ii) Le développement embryonnaire externe permet des observations/manipulations non-invasives.
- iii) De nombreuses expériences se restreignent aux formes larvaires non-autonomes.
- iv) La période de reproduction du xénope est de 15 ans ce qui en fait un excellent modèle pérenne pour les études génétiques.
- v) Le xénope est le premier amphibien au génome décodé permettant des approches de bio-informatique en amont, voir en substitution, du vivant.
- vi) Les femelles peuvent être induites à pondre tous les 4 mois pendant 15 ans ce qui contribue à les habituer aux manipulations et réduit le stress.
- vii) L'utilisation d'anesthésiques/analgésiques n'est pas contraindiquée.

1602- La grippe est une infection virale aiguë qui se propage facilement d'une personne à une autre et qui peut toucher n'importe qui dans n'importe quel groupe d'âge. D'après l'OMS, la grippe est un problème de santé publique sérieux qui provoque des maladies graves et des décès dans les populations à plus haut risque. Au niveau mondial, elle est responsable de 250 000 à 500 000 décès par an.

Le moyen le plus efficace de se prémunir de la maladie ou d'une issue grave est la vaccination. Des vaccins sûrs et efficaces existent et sont utilisés depuis plus de 60 ans. Cependant, les virus grippaux peuvent développer une résistance à ces médicaments. La recherche de vaccins ou molécules ayant une efficacité supérieure à celle des vaccins actuellement sur le marché reste donc indispensable. De plus, la variabilité génétique de ce virus nécessite également le développement constant de nouvelles solutions thérapeutiques.

Ce projet a pour objectif de développer et de caractériser un modèle murin infectieux après instillation intranasale du virus de la Grippe (virus Influenza) dans le but d'évaluer l'efficacité de produits antiviraux.

Ce projet pourra permettre de proposer sur le marché de nouvelles molécules antivirales.

Lors de ce projet, l'imagerie médicale sera utilisée afin de suivre l'infection car le virus de la Grippe a été rendu bioluminescent. Cette technique présente l'avantage d'être non invasive (requiert seulement l'anesthésie des animaux) et ne nécessite pas la mise à mort des animaux au cours du temps (suivi des mêmes animaux au cours du temps, diminution de l'impact de la variabilité individuelle). Cette technique permet ainsi de diminuer le nombre d'animaux nécessaire.

Lors de ce projet une étude permettant d'évaluer la virulence du virus utilisée sera dans un premier temps réalisée. Pour cette étude, 3 groupes de 5 souris seront utilisés. Ce faible nombre est suffisant car cette étude permettra de compléter des données déjà existantes.

Dans un deuxième temps, plusieurs études d'efficacité de plusieurs antiviraux seront réalisées. Pour ces études, en moyenne 6 groupes de 12 souris seront utilisés afin de pouvoir réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus.

Pour ce projet, environ 375 animaux seront utilisés.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable l'efficacité de produits antiviraux dans un organisme entier vivant.

L'espèce souris (BALB/c) a été choisie car c'est un modèle standard polyvalent, régulièrement utilisé dans les études d'infectiologie.

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires (mises en place de traitement ou mise à mort des animaux) le plus rapidement possible.

1603- Lors du développement de médicaments vétérinaires, il est nécessaire de vérifier l'innocuité de chaque formulation dans l'espèce à laquelle elle est destinée, avant la réalisation d'étude clinique chez l'animal naturellement malade.

Par ailleurs, lors du développement de médicaments destinés à l'Homme, le Chien peut être un modèle adapté pour l'évaluation de tolérance.

Le présent projet consiste à évaluer la bonne tolérance de formulations thérapeutique destinées au Chien ou à l'Homme, dans un temps précédent immédiatement le passage aux essais cliniques.

Les formulations auront déjà été précisément évaluées via des méthodes de remplacement (culture cellulaire par exemple) et éventuellement des essais sur d'autres espèces (rongeurs et/ou lagomorphes).

Chaque évaluation de tolérance se fera sur 3 à 5 chiens, qui recevront le produit par voie orale: gélule, comprimé ou solution buvable.

Nous estimons que le projet nécessitera au maximum l'utilisation de 25 chiens, pour l'évaluation de 5 médicaments sur 5 ans.

Ce nombre d'animaux pourra être réduit si moins de produits sont testés ou si moins d'animaux sont utilisés pour un médicament.

Ces évaluations de tolérance interviennent en fin de développement des médicaments, et l'utilisation d'animaux de laboratoire est indispensable pour une dernière validation des données d'innocuité obtenues par les méthodes de remplacement, avant des essais cliniques (chez le Chien ou l'Homme malades).

Le principal bénéfice attendu est une administration sûre aux patients en clinique vétérinaire ou à l'hôpital.

Durant toutes les phases expérimentales, les chiens subiront un minimum de contraintes et de stress. Ils seront hébergés dans des conditions en adéquation avec les besoins de leur espèce: en groupe, avec des jouets, et la possibilité d'aller à l'extérieur.

Les personnes réalisant les procédures et s'occupant des animaux seront qualifiées pour ces tâches.

1604- Dans un objectif de plus grande autonomie protéique des élevages, le tourteau de colza, produit localement, constitue une alternative intéressante au tourteau de soja, importé. Cependant, le fort ratio phosphore/protéine de cet aliment constitue aussi une limite environnementale à son utilisation. Une meilleure connaissance de la disponibilité du phosphore de ce tourteau chez les vaches constitue une première étape pour la recherche de solutions destinées à réduire les rejets de phosphore sur ce type de ration.

Ce projet a pour objectif premier de comprendre la cause des baisses de la teneur en calcium du lait observées sur les vaches nourries avec des rations à base de tourteau de colza plutôt que de tourteau de soja, et de proposer une solution de supplémentation minérale spécifique au tourteau de colza destinée à pallier à cette limite. Ce projet va également permettre une bonne caractérisation de la disponibilité du phosphore chez les vaches laitières nourries avec des rations supplémentées avec du tourteau de colza. Cinq vaches seront mobilisées pour cet essai. Elles recevront alternativement 5 rations au cours de 4 périodes de 21 jours chacune. Les rations seront basées sur de l'ensilage de maïs supplémenté avec du tourteau de soja ou de colza et des quantités variables de calcium. Les mesures sur ces animaux consisteront à peser tous les jours les quantités consommées et refusées d'aliment, ainsi que la production laitière. Les teneurs en calcium du lait et sa fromageabilité seront également mesurées. Une estimation précise des quantités de calcium et de phosphore absorbées au niveau intestinal sera

également réalisée. Enfin, une prise de sang au cours de chaque période permettra de connaître l'effet des traitements sur les teneurs en vitamines D circulantes ainsi qu'en biomarqueurs indicateurs de l'accrétion et de la résorption osseuse des vaches. Le schéma statistique sera un carré latin où chaque individu sera alternativement soumis à 4 des 5 rations testées au cours de 4 périodes. Ce type de schéma statistique, dit de Youden, a l'avantage de limiter fortement le nombre d'individus impliqués si on le compare à un schéma où tous les individus auraient reçu une fois une des 5 rations. Les effets attendus des rations indiquent que 5 individus est un effectif suffisant pour observer des différences statistiquement significatives.

Ce protocole respecte la règle des 3R :

- Réduire : nous n'utilisons que 5 animaux compte tenu du schéma statistique choisi
- Raffiner : je raffine la méthodologie en ne faisant pratiquement que des prélèvements de lait à la traite
- Remplacer : Comme précisé au-dessus, nous devons analyser du lait. Il est donc difficile d'éviter ce type d'expérimentation.

1605- Maximiser la part d'herbe pâturée dans l'alimentation des ovins est un enjeu essentiel pour la durabilité des élevages tant du point de vue de la rentabilité économique de la production que de l'efficacité environnementale des systèmes.

Dans un contexte d'instabilité des cours des matières premières et de recherche d'une meilleure autonomie alimentaire, de récentes études ont démontré l'intérêt économique de réaliser la conduite des agneaux à l'herbe jusqu'au sevrage pour limiter l'utilisation d'aliments concentrés. Cette pratique est réalisée par les éleveurs ayant une surface et une disponibilité en herbe suffisante.

Cependant les éleveurs pratiquant la lactation à l'herbe posent la question de la bonne méthode de transition alimentaire des agneaux au sevrage pour la finition en bergerie, ce mode de finition représentant la majeure partie des agneaux commercialisés en France. En effet, un passage trop brusque au concentré, ne permet pas une adaptation de la flore ruminale et entraîne de forts risques d'acidose chez les agneaux. Pour limiter ces risques sanitaires, les préconisations techniques et vétérinaires consistent, pour des agneaux n'ayant pas consommé de concentré pendant la lactation au pâturage, à la mise en place d'une période de transition ou de garder une part importante de fourrage dans la ration durant la période en bergerie. La transition avec des aliments concentrés se caractérise par une augmentation progressive des quantités d'aliments distribués ainsi qu'un fractionnement des apports au cours de la journée et s'étalant sur près de 3 semaines minimum en cas d'utilisation d'aliment du commerce et de 5 semaines en cas d'utilisation d'aliment fermier considérés plus acidogène (moins bonne maîtrise de la valeur des matières premières et possibilité de tri). Cette période de transition a de nombreuses conséquences pour l'éleveur (baisse de performances des agneaux, travail supplémentaires...). Ces contraintes vont à l'opposé des attentes de la filière qui est à la recherche de systèmes d'élevage plus économes en moyens humains et financiers.

La présente étude propose donc d'évaluer des conduites alimentaires alternatives des agneaux pouvant permettre de mieux gérer la période de transition sans trop impacter la période d'engraissement. L'objectif de l'essai est de tester le maintien d'un régime riche en cellulose lors de la phase de finition, tirer avantage de la capacité des agneaux à consommer du fourrage dès le plus jeune âge et d'en évaluer les conséquences en termes de performances animales, indice de consommation, durée d'engraissement et qualité des carcasses lors des phases de transition et de finition.

33 agneaux seront utilisés pour cette étude, ils seront répartis en 3 lots conduits individuellement du sevrage à l'abattage. Le lot témoin reçoit une ration à base de foin de bonne qualité associé à un aliment concentré distribué à volonté à la suite d'une période de transition de 3 semaines comme le préconise la littérature. Les lots expérimentaux se caractérisent par des fourrages conservés très digestibles et permettant de couvrir les besoins d'entretien et de croissance des agneaux. Ces deux régimes seront composés de légumineuses et diverses (chicorée, luzerne, trèfle violet) conservées en foin et/ou en enrubbages selon les possibilités de récolte. La conduite des agneaux individuellement permet d'appréhender la variabilité individuelle pour l'ingestion et limite au maximum les effectifs animaux nécessaires.

De plus, les moutons seront suivis quotidiennement pour leur état et comportement général, leur ingestion et hebdomadairement pour leur poids et leur note d'état corporel. Ce suivi étroit permettra d'assurer la réussite du protocole et devrait permettre de détecter si un animal montre des signes de mal être. Si un animal se blesse ou est malade une décision sera rapidement prise en accord avec le vétérinaire, et dans tous ces cas de figure retiré du protocole. Le suivi quotidien devrait permettre de limiter les risques de stress et d'angoisses. Toute intervention sera consignée sur un cahier d'expérimentation.

Le risque principal de ce projet que les fourrages distribués ne permettent pas une croissance suffisante. Si tel était le cas, une supplémentation appropriée en concentré de finition pourra être envisagée en cas de croissance trop faible (< 200g/ jour). La supplémentation n'interviendra qu'après une période d'adaptation de 15-21 jours après les premières distributions des fourrages expérimentaux de façon à laisser suffisamment de temps aux agneaux pour s'habituer aux fourrages. Ils seront conduits ainsi jusqu'à l'abattage avec pour poids cible du lot 40kg.

1606- Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'étudier le devenir d'une molécule, candidat-médicament, chez le primate lorsque cette espèce est utilisée au cours du développement préclinique de cette molécule (pharmacocinétique). Le devenir de cette molécule peut être étudié dans différents tissus ou liquides biologiques (exemple sang, lymphes, etc). Dans le cadre de ce projet, le suivi de la molécule dans les urines sera réalisé. Les molécules administrées par voie orale, intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée se retrouvent dans le sang et sont éliminées de l'organisme au moins partiellement dans les urines.

Pour suivre l'élimination de la molécule étudiée dans les urines au cours du temps, un recueil d'urine est réalisé chez le primate vigile pendant une ou plusieurs périodes après l'administration du candidat-médicament (6 animaux par étude ; soit un nombre prévisionnel maximum de 60 animaux sur 5 ans).

Ces recueils sont ensuite traités et analysés pour mesurer dans le temps l'élimination du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites dans les urines.

Plusieurs administrations pourront être effectuées sur un même animal en respectant une durée minimale de 72 heures de récupération entre 2 administrations, ce qui permet de raffiner l'expérience.

Remplacement : Dans le cadre du développement de certains 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 la pharmacocinétique d'une nouvelle molécule dans les urines. 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 une des espèces de non-rongeurs adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique. D'autre part, les animaux peuvent être utilisés à plusieurs reprises pour tester différentes doses du candidat médicament ou différentes molécules.

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 des procédures peu invasives réalisées sous anesthésie
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

1607- Le système vasculaire lymphatique joue un rôle important dans le drainage des liquides interstitiels, le transport des cellules du système immunitaire et la dissémination métastatique des cellules tumorales. L'insuffisance vasculaire lymphatique entraîne la formation de lymphœdèmes, gonflements d'une partie du corps dus à l'accumulation de fluides. Les conséquences invalidantes de ces œdèmes restent à ce jour sans traitement efficace.

En situation normale, les valves présentes dans les vaisseaux collecteurs lymphatiques assurent un flux unidirectionnel drainant la lymphe et facilitant son retour dans le système veineux. De nombreux aspects de leur développement demeurent toutefois encore mal connus. Nous venons de mettre en évidence un rôle crucial d'un facteur de croissance, la protéine BMP9 (Bone Morphogenetic Protein 9) dans la formation des valves des vaisseaux collecteurs lymphatiques. Un impact fonctionnel de la déficience en BMP9 sur l'efficacité du drainage lymphatique a pu être observé en parallèle.

La question se pose maintenant de connaître l'implication éventuelle de ce facteur circulant dans le maintien des valves et le développement des lymphœdèmes.

Le programme de travail vise à mettre en évidence et quantifier les taux de BMP9 dans la lymphe chez l'adulte. Il s'agit également d'appréhender si l'inactivation du facteur BMP9 peut conduire chez le nouveau-né et l'adulte à une régression des valves débouchant sur une insuffisance vasculaire lymphatique. Aucune méthode cellulaire ou informatique ne peut fournir ces informations importantes pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques dans les situations de lymphœdèmes. Le recours à des investigations in vivo est donc nécessaire.

Le modèle rongeur a été choisi pour réaliser cette étude. Les animaux sont nés et élevés dans un établissement agréé. Leur nombre de 154 a été déterminé sur la base des données de la littérature et pour répondre aux exigences d'un test statistique (test t de Welch) qui sera appliqué pour chaque expérience. Ainsi, nous veillons à n'utiliser que le minimum nécessaire d'animaux pour assurer la validité des expériences.

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.

1608- Les matériaux céramiques sont de plus en plus utilisés en dentisterie pour leurs propriétés esthétiques et biologiques. Cependant, les études évaluant la biocompatibilité et l'ancrage tissulaires des céramiques et d'autres matériaux utilisés en routine sont peu approfondies.

La perte du volume osseux intra-buccal est très fréquente, et due aux conséquences de la maladie parodontale, aux traumatismes ou à la suite d'avulsion dentaire. La régénération osseuse en vue de permettre le placement d'implant dentaire, est toujours considérée comme un défi thérapeutique.

Le premier objectif de cette étude est d'étudier, d'analyser et de mettre en évidence la performance de biomatériaux innovants composés d'hydroxyapatite naturelle et enrichie avec du phosphate tricalcique.

Le second objectif de cette étude est d'évaluer l'intégration tissulaire de ces différents matériaux.

Procédures et étapes du traitement

Dans un premier temps, des extractions à la mandibule et au maxillaire seront réalisées. Au niveau du maxillaire, un défaut osseux sera créé.

Après une période de cicatrisation de trois mois, les implants seront placés. A la mandibule, deux différents types de biomatériaux seront utilisés sur le défaut osseux créé autour des implants. Au niveau du maxillaire, le placement de 3 implants et de piliers transgingivaux de différents types sera réalisé.

L'euthanasie sera effectuée après 6 mois post-extraction. 6 prélèvements contenant les implants, les environs durs et les tissus mous seront réalisés sur chaque animal, à la mandibule et au maxillaire.

Le mini porc a été choisi du fait de sa dentition et de son régime omnivore similaires à l'homme ; le mini porc est un modèle très fréquemment utilisé pour étudier les implants dentaires pour la similitude de la dentition, des maxillaires et des tissus gingivaux. Les contraintes mécaniques de mastication devraient être comparables à ce qui est observé chez l'homme. La flore buccale, du fait de régimes semblables, devrait être également comparable.

Respect du principe des 3R :

Les expérimentations précédentes que nous avons réalisées avec la même équipe, utilisant des techniques similaires, ont montré l'absence de douleurs induites par ce protocole. Les animaux ont en effet tous continué à bien se nourrir, à grossir, à évoluer normalement dans leur cage et aucun phénomène infectieux n'a été mis en évidence. Par ailleurs, l'un des objectifs poursuivis est d'étudier la réaction inflammatoire et la contrainte mécanique liée à la mastication autour des implants et des piliers : il n'y a pas de modèle artificiels disponibles équivalents.

Cette expérimentation inclura un nombre minimal d'animaux : 5 mini porcs seront opérés. Le nombre minimum d'échantillons à prélever doit être de 6 pour le maxillaire et 6 pour la mandibule pour être statistiquement valide.

Les animaux seront dans une cage individuelle (1.50m/2.50m), vivant sur un lit de paille (enrichissement). Les mini porcs seront nourris deux fois par jour (bouillies) et auront de l'eau à disposition. Avant chaque intervention chirurgicale, ils seront pesés.

Tous les animaux seront anesthésiés. Un personnel qualifié sera en charge quotidiennement des animaux pendant ces périodes. Des apprentissages sont mis en place pour réaliser les bains de bouche antiseptiques quotidiens sans stress.

1609- Les études sur les caractères sexuels secondaires chez les oiseaux chanteurs se sont principalement focalisées sur le chant du mâle. Néanmoins, depuis plusieurs années, on observe un nombre croissant d'études sur les vocalisations des femelles. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la fonction des vocalisations des femelles chez les oiseaux. Ainsi, les femelles peuvent pousser des cris comme une autostimulation pour avancer la date de la ponte. Elles peuvent aussi pousser des cris pour inciter la compétition entre les mâles, inciter les mâles à parader, lorsqu'elles sont en compétition avec une autre femelle pour le même mâle ou lors de conflits territoriaux.

La problématique générale de ce projet, sélectionné par l'école doctorale pour le financement d'une thèse, est d'étudier les fonctions, les mécanismes et les variations saisonnières des signaux spécifiques des femelles de canari domestique (*Serinus canaria*). Cette problématique sera déclinée en 5 objectifs.

Le premier objectif de ce projet est d'étudier les mécanismes hormonaux sous-jacents à l'apparition des vocalisations des femelles canari. Deuxièmement, afin de mieux comprendre la fonction de sollicitation à l'accouplement des trilles spécifiques, le décours temporel des interactions vocales entre mâles et femelles sera finement étudié. Troisièmement, si les trilles spécifiques des femelles canari sont l'expression de leurs préférences pour un chant, nous chercherons à savoir si les femelles canari peuvent prêter attention à une interaction acoustique mâle-femelle, en obtenir de l'information et utiliser cette information pour diriger leurs comportements sexuels et leurs vocalisations. Ensuite, le but sera de tester l'hypothèse du lien entre partenaires en recherchant les paramètres acoustiques des vocalisations des femelles canaris qui pourraient être à l'origine d'une signature individuelle permettant ainsi à leur partenaire de les reconnaître et de maintenir les liens entre les deux individus. Enfin, l'hypothèse du signalement de la fertilité stipule que les signaux des femelles influencent les interactions des mâles et les inciteraient même à entrer en compétition. Cette hypothèse sera testée chez le canari domestique.

Au total, 120 canaris domestiques seront utilisés afin de poursuivre ces cinq objectifs ; pour les objectifs 1 à 4, seuls 20 oiseaux seront utilisés à chaque fois, tandis que 40 oiseaux seront utilisés pour l'objectif 5. Cela permet de minimiser à son maximum le nombre d'individus pour exploiter statistiquement des résultats.

Par ailleurs, ces expériences nécessitent un contrôle optimal de l'environnement acoustique. Les oiseaux sont donc placés dans des caissons d'isolement acoustique durant la période de test. Cet isolement acoustique est fréquemment utilisé pour étudier les vocalisations des oiseaux en laboratoire. Cependant les oiseaux ne sont isolés acoustiquement que quelques heures par jour (environ 2 à 3 heures en milieu de matinée). Le reste du temps, les caissons restent ouverts, permettant aux oiseaux de communiquer (cela ne modifie pas le comportement des oiseaux pendant les tests).

Afin d'étudier les mécanismes hormonaux sous-jacents à l'apparition des vocalisations des femelles, il est nécessaire d'effectuer des prélèvements sanguins. Ces prélèvements sanguins sont effectués tous les dix jours environ, en alternant systématiquement l'aile sur laquelle sera fait le prélèvement. Le minimum de sang requis sera prélevé, à savoir 0.1 mL environ à chaque fois.

De plus, les animaliers effectueront quotidiennement une inspection visuelle de l'état de santé des oiseaux. Tout animal malade ou montrant des signes de fatigue ou de stress dû à l'isolement (prostration, toilettage excessif) sera immédiatement retiré de l'expérience et replacé dans des conditions standards d'hébergement.

Après l'expérience, aucun animal n'est euthanasié ; tous les oiseaux sont replacés dans des conditions d'hébergement standards de l'élevage du laboratoire.

1610- Ce projet concerne une nouvelle approche pour la conception de futurs vaccins. En effet, des méthodes innovantes permettant de fabriquer des virus atténués

représentant de potentiels candidats vaccins ont été récemment développées au sein de notre laboratoire. Cette étude se fera sur le virus de la fièvre jaune. L'impact des modifications apportées aux différents virus étudiés sur leur fitness répliatif est

dans un premier temps étudié in vitro, puis in vivo afin d'évaluer si les virus modifiés ont une pathogénicité altérée et s'ils induisent une réponse immunitaire chez le hamster. Différentes méthodes vaccinales sont testées (vaccin vivant atténué, vaccination ADN). Par la suite, des challenges vaccinaux seront également effectués.

Les expériences se dérouleront en laboratoire de sécurité biologique NSB3. Les procédures ont été adaptées aux contraintes liées à cet environnement. La mortalité étant un des critères majeurs d'observation, nous ne pourrions pas sacrifier les animaux présentant des signes de souffrance, néanmoins nous serons vigilants en ce qui concerne les signes de maladie et d'inconfort des animaux testés. L'administration de paracétamol (10-20 mg/100g de PV/jour de paracétamol per os) et de buprénorphine (1mg/kg par voie sous-cutanée sous anesthésie) a été prévue afin de réduire voir supprimer la douleur et la souffrance (cf tableau d'évaluation de la douleur et de la souffrance p15) des animaux testés. Il est également important de noter que la souffrance n'est pas de longue durée (48h maximum) lorsque le hamster développe une forme sévère d'infection (au moins un des symptômes indiqués pour l'administration de buprénorphine).

Par ailleurs les administrations de virus et prélèvements seront effectués sous anesthésie générale. Des prélèvements de sang (rétro-orbitaux) seront effectués au cours de l'expérience sur les hamsters vivants anesthésiés.

Pour ce projet, nous serons amenés à travailler sur un nombre total de 600 hamsters maximum.

1611- Près de 460 000 nourrissons sont victimes de bronchiolite chaque hiver. Cette maladie se caractérise par une obstruction des voies respiratoires dans le poumon provoquée par la réaction à un virus, le virus respiratoire syncytial. Ce virus respiratoire syncytial touche la presque totalité des enfants avant leurs deux ans mais seulement un tiers développe une bronchiolite, pouvant dans une minorité des cas conduire à une hospitalisation. Or il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin pour protéger les nourrissons contre cette infection et ses conséquences.

Nos travaux de recherche visent à élaborer une stratégie vaccinale contre ce virus qui soit efficace chez le nourrisson. Notre vaccin candidat est un vaccin inerte, basée sur des protéines recombinantes. Il est indispensable d'évaluer les vaccins à l'aide de modèles animaux, car l'obtention d'une réponse immunitaire repose sur un ensemble de cellules de notre organisme, et leur capacité à circuler entre les différents tissus lymphoïdes et les tissus (ici le poumon) touchés par l'infection. Chez la souris adulte, la vaccination avec ces protéines confère une protection efficace contre le virus. Afin d'adapter notre vaccin candidat à l'environnement immunitaire particulier du nourrisson, nous utiliserons le souriceau comme modèle expérimental.

Ce projet va s'étaler sur une période de 5 ans à raison de 3 expérimentations sur 30 souriceaux par an (au total 450 souriceaux) pour pouvoir comparer différentes voies d'administration du vaccin et différents adjuvants. Le nombre d'animaux dans une expérience répond à des besoins statistiques pour prouver l'efficacité du vaccin et à la nécessité d'inclure des groupes expérimentaux témoins non vaccinés. Les souriceaux sont élevés avec leur mère (2 portées par cage) avec du matériel pour nidifier (papier mouchoir) depuis leur naissance jusqu'au sevrage à l'âge de 3 semaines. Ils sont vaccinés à l'âge de 6-7 jours. Après leur sevrage, les souris sont transférées dans des cages (groupe de 5) pour être infectées par le virus par voie nasale sous anesthésie. Les souris infectées sont observées et pesées tous les jours par le personnel de l'animalerie. L'autopsie a lieu de 5 à 8 jours après l'infection (évaluation de l'efficacité du vaccin). Les poumons sont prélevés pour y rechercher le virus et la rate pour y rechercher les cellules immunitaires. Le vaccin est efficace si on ne retrouve pas ou peu de virus dans les poumons et si la rate contient des cellules immunitaires mémoires. Le vaccin est adapté au nouveau-né si la protection contre le virus ne s'accompagne pas d'inflammation dans le poumon (étude histologique du tissu pulmonaire).

1612- Une technique chirurgicale habituelle chez l'homme est la réalisation d'une vaporisation laser de prostate sous anesthésie générale pour traitement de l'adénome prostatique obstructif (ou hypertrophie bénigne de la prostate, première cause des troubles urinaires masculins). Une fibre laser de haute puissance est guidée endoscopiquement dans les voies urinaires mâles pour traiter visuellement l'adénome. Le faisceau laser très puissant vaporise instantanément les tissus sur une très faible épaisseur. La longueur d'onde utilisée est particulièrement absorbée par la couleur rouge des tissus riches en vaisseaux sanguins : cette absorption entraîne une volatilisation sans hémorragie.

Afin d'évaluer la mini-invasivité du geste et quantifier les éventuelles lésions générées, nous envisageons de réaliser cette chirurgie sur 3 chiens selon 2 puissances laser différentes à 4 localisations. Nous vérifierons par IRM (imagerie par résonance magnétique) et échographie de contraste le retentissement en profondeur de la procédure sur les tissus (mesure de la zone de nécrose) et nous comparerons à l'analyse anatomopathologique de la prostate.

Le chien est le modèle de choix du fait des similarités anatomiques de sa prostate avec celle de l'homme.

Les animaux seront des reproducteurs de réforme en provenance d'élevages fournisseurs d'animaux pour l'expérimentation et dûment agréés. Le fait de pouvoir réaliser les 4 incidences laser sur un même animal nous permet de limiter le nombre total à trois chiens pour ce projet.

Les animaux seront transportés en compagnie de leur soigneur (un éventuel tranquilisant sera administré avant le départ) et ce dernier restera à leur côté jusqu'à induction de l'anesthésie et la narcose avérée afin d'éviter tout stress et anxiété. Pour les mêmes raisons, la prise en charge sera immédiate à l'arrivée des animaux sur site.

Il n'y a pas de réveil, les animaux sont euthanasiés sous anesthésie par surdosage barbiturique. L'analgésie sera assurée tout le temps de la procédure par l'administration de morphiniques.

1613- Dans la majorité des troupeaux ovins, on trouve des agneaux orphelins ou délaissés par leur mère ainsi que des brebis prolifiques dont la lactation ne suffit pas pour nourrir la trop nombreuse portée. La solution la plus économique consisterait à faire adopter ces agneaux par d'autres brebis mais elle est difficile à mettre en place car les brebis refusent d'allaiter un agneau qui n'est pas le leur. Ainsi, l'allaitement artificiel (AA) est la solution de rigueur, les éleveurs remplaçant le lait de la

mère par un aliment commercial distribué aux agneaux au moyen d'un nourrisseur. L'avantage de l'AA est la possibilité de sauver des agneaux qui autrement sont voués à la mort. Malgré cela, ce système n'offre pas des gages de satisfaction : croissance décevante, diarrhées fréquentes, mortalité plus élevée que chez les agneaux laissés avec leur mère, avec des conséquences susceptibles de fragiliser les individus sur le long terme. L'origine de cette morbidité/mortalité est multiple mais la séparation précoce d'avec la mère pourrait fragiliser l'état de santé physique et mental des agneaux. Chez les primates, y compris l'espèce humaine, les troubles relationnels rencontrés dans le jeune âge (séparation précoce, orphelinat, négligence parentale) entraînent des effets néfastes sur le comportement, en particulier au plan émotionnel, cognitif et social, et une susceptibilité à développer des pathologies. La pratique de l'élevage en allaitement artificiel, de par l'appauvrissement social lié à l'absence de congénères adultes, serait en mesure de déclencher de tels états chez l'agneau. Le programme a pour objectif d'identifier la source de ces problèmes et de proposer une ou plusieurs solutions. Parmi celles-ci, l'enrichissement social est une piste intéressante à exploiter. Une manière d'enrichir l'environnement social est d'élever des agneaux en présence de brebis adultes tutrices. Ces tutrices offriraient un environnement social plus diversifié et stimulant ; elles joueraient également le rôle de démonstratrices dans l'acceptation des aliments solides, permettraient une transmission de la flore microbienne gastrointestinale susceptible de réduire l'incidence des diarrhées chez les agneaux. La seconde option est de favoriser les contacts avec un soigneur humain au travers d'interactions sociales positives. Des caresses dispensées quotidiennement aident à la construction d'une relation homme-animal, l'homme se substituant à la mère. Ces interactions sont susceptibles d'avoir des effets bénéfiques sur le comportement et la santé du jeune. Nous faisons donc l'hypothèse que l'enrichissement social ovin ou humain temporisera les effets délétères de la mise en allaitement artificiel. Des essais préliminaires ont montré qu'une cohabitation entre brebis adultes et agneaux en allaitement artificiel était tout à fait envisageable et nos travaux antérieurs ont montré que ces derniers s'attachent à leur soigneur.

L'objectif du présent projet est :

- 1) Caractériser le comportement spontané des agneaux mis en allaitement artificiel (en condition non enrichie, ou en présence de tuteurs adultes, ou avec contacts humains quotidiens), en comparaison de ceux élevés par leur mère.
- 2) Evaluer l'impact des conditions de vie sur le développement du comportement social des agneaux pendant la période d'allaitement (développement d'un lien d'attachement avec la mère, ou les tuteurs, ou le soigneur ; développement d'une cohésion de groupe entre agneaux familiers) et sur leurs capacités cognitives et émotionnelles après sevrage.
- 3) Suivre l'état de santé des agneaux : degré de propreté de la toison, occurrence de diarrhées, identification des agents pathogènes dans les fèces, évolution de la formule sanguine.
- 4) Identifier la flore intestinale des agneaux en regard de la présence ou non de brebis adultes.

La règle des 3R a été suivie en limitant le nombre maximum d'individus à 100 sans nuire à l'objectif final de l'analyse du comportement et de l'état de santé des animaux qui doit prendre en compte la variabilité interindividuelle. REDUIRE. Le projet sera réalisé sur 2 ans avec un total de 80 agneaux (trois groupes de 16 la 1ère année, deux groupes de 16 la 2nde). S'ajouteront également pour la première année les 16 brebis allaitantes du groupe d'agneaux maternés (un agneau par brebis) ainsi que 4 brebis tutrices. Ces effectifs (N=16) ont été définis en accord avec les contraintes de l'analyse statistique et la littérature pour permettre une étude conclusive. RAFFINER. Les procédures appliquées sont peu (prise de sang) voire non douloureuses (tests comportementaux, collecte de fèces), et les agneaux sont élevés en groupe dans des conditions d'élevage traditionnel. REMPLACER. Compte tenu des objectifs, il est incontournable de travailler sur le modèle de référence c'est-à-dire l'agneau. Enfin, il faut souligner qu'à l'issue de l'expérience, tous les animaux seront restitués à l'établissement d'élevage.

1614- La neurogénèse chez l'Homme adulte reste limitée à des zones très spécifiques du cerveau, à savoir le bulbe olfactif, la zone sous-ventriculaire qui longe le ventricule latéral et enfin une sous-région de l'hippocampe. Cette régénération spontanée de cellules souches neuronales est très conservée chez les mammifères et a été décrite chez beaucoup d'espèces, y compris chez l'Homme. Malgré le fait que cette neurogénèse soit un phénomène continu dans la vie adulte, le degré de régénération cellulaire est faible et dépend du contexte. L'âge, des facteurs environnementaux, la production d'hormones et d'autres pathologies concomitantes dans le cerveau peuvent la réguler. Les déficits cognitifs d'apprentissage et de mémoire décrits chez l'Homme au cours du vieillissement normal ou dans des conditions pathologiques comme la maladie Alzheimer pourraient être en partie liés à une réduction progressive de la neurogénèse hippocampale chez l'adulte. Des stratégies thérapeutiques visant à pallier les symptômes cognitifs en favorisant le renouvellement des cellules souches dans le cerveau humain pourraient ainsi constituer une approche innovante et méritent d'être testées dans une espèce proche de l'Homme.

Des expériences chez le rongeur montrent que la neurogénèse hippocampale peut avoir un rôle dans le comportement cognitif de cet animal, mais il existe des différences entre le processus décrit in vivo chez le rongeur et celui observé chez l'Homme, notamment en rapport avec l'importance du contexte et l'environnement. Afin de caractériser le rôle fonctionnel de la neurogénèse in vivo dans une espèce qui présente une complexité anatomique et biologique similaire à celle de l'Homme, nous proposons d'étudier ce phénomène chez le primate non humain chez lequel la neurogénèse peut être bloquée par irradiation focale des cellules en division dans l'hippocampe. Cette technique est utilisée actuellement en clinique pour traiter les patients atteints de gliomes.

Le suivi longitudinal non-invasif comporte l'imagerie par résonance magnétique pour évaluer l'anatomie du cerveau et la présence d'effets adverses tels qu'un œdème et une réaction inflammatoire ainsi qu'une atteinte éventuelle de la matière grise (atrophie). En parallèle, l'étude du comportement cognitif sera réalisée en administrant des tests spécifiques de l'apprentissage et de la mémoire avant et après irradiation. La description histologique de la neuroinflammation et de différents stades de la prolifération, maturation et intégration neuronale des cellules souches néoformées compléteront

l'analyse de l'impact fonctionnel de l'ablation de la neurogénèse et de l'effet de l'entraînement cognitif à plus long-terme sur les fonctions mnésiques chez le primate non-humain.

Le modèle primate se justifie par la possibilité d'évaluer les fonctions cognitives dans une espèce proche de l'Homme qui puisse prédire un effet fonctionnel.

Les 3 animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et ont été élevés dans des élevages reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données suffisantes afin d'évaluer l'impact de la neurogénèse dans le cerveau adulte. Dans une démarche translationnelle, l'évaluation fonctionnelle sera menée en utilisant des techniques indolores et non-invasives telles que l'imagerie et l'étude du comportement. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures d'irradiation focale ont été définis et validés par une équipe vétérinaire en suivant les consignes utilisées en clinique pour le traitement des gliomes. Un suivi clinique régulier et l'application de critères d'arrêt permettront de veiller au bien-être des animaux.

1615- La maladie d'Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative héréditaire caractérisée par l'apparition progressive de symptômes moteurs et cognitifs extrêmement invalidants pour les patients, associée à une atrophie du striatum et du cortex cérébral. Elle est en général fatale dans les 15 à 20 ans après la survenue des premiers symptômes. La maladie est due à la mutation du gène HTT qui est traduit en une protéine, la huntingtine (Htt). La huntingtine mutée (mHtt) est toxique pour le cerveau via différents processus, en particulier une altération du métabolisme énergétique.

Il n'existe pour le moment aucun traitement ralentissant l'évolution de cette maladie. Toutefois, une meilleure connaissance de ses mécanismes physiopathologiques permettrait d'identifier des biomarqueurs (caractéristique biologique mesurable) précoces en neuro-imagerie, et la capacité d'évaluer et de quantifier ces altérations de manière non-invasive serait d'un énorme intérêt. Des preuves convaincantes soulignent le rôle clé de certains défauts énergétiques dans le développement de la maladie. Ces défauts pourraient donc constituer un biomarqueur de l'état de la maladie et de sa progression. Cependant, les outils de mesure actuels n'offrent qu'une vision parcellaire et figée du métabolisme énergétique *in vivo*.

L'objectif de ce projet est de développer et valider de nouvelles méthodes de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) et d'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) afin d'accéder à des mesures dynamiques et plus représentatives du métabolisme énergétique cérébral. Les méthodes seront optimisées puis utilisées *in vivo* chez un modèle de rongeur de la MH (modèle BAC-HD) afin de mieux caractériser les défauts énergétiques impliqués dans la maladie.

Le recours à l'animal est nécessaire pour ce projet car aucun milieu de culture ou simulation numérique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité du métabolisme énergétique du cerveau. De plus, l'utilisation d'une souche de rongeur mimant la forme humaine de la MH permet d'espérer une application en clinique plus rapide des méthodes développées. Les modèles rongeurs sont pertinents pour l'étude du cerveau par RMN et IRM, car leur petite taille permet de les examiner dans des scanners IRM à haute performance.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet, sont nés et élevés en captivité. Ils proviennent d'un élevage autorisé ainsi que d'une colonie établie au sein de notre laboratoire. Le projet prévoit l'utilisation de 350 rongeurs. Ce nombre correspond au minimum nécessaire pour pouvoir répondre à notre question scientifique.

Les examens RMN et IRM, examens non invasifs, sont effectués sous anesthésie générale et avec application locale d'analgésique afin d'éviter tout stress ou douleur liés au système de positionnement de l'animal qui diminuerait son bien-être. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et des échelles cliniques journalières, un soutien nutritionnel et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller à leur bien-être.

1616- Chez l'homme la perte de l'odorat génère des handicaps dans la vie quotidienne des individus atteints par une pathologie dont un des symptômes est l'anosmie (perte totale) ou l'hyposmie (réduction). Par ailleurs, ces 2 symptômes peuvent être un indice dans l'évolution de maladie neurodégénérative comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson. Ainsi en médecine translationnelle l'étude de l'olfaction pourrait amener à l'établissement de marqueurs diagnostics précoces.

- Ainsi, l'étude du degré de perte olfactive dans les pathologies associées à l'âge ou à des maladies neurodégénératives pourrait aider à la mise en place d'un diagnostic précoce sur l'apparition de symptômes. Il a été récemment établi qu'il existait un lien entre l'apparition de dysfonction sensorielle et l'apparition plus tardive des premiers symptômes de la maladie d'Alzheimer.

La mise en œuvre de différents modèles animaux mimant des maladies mettant en jeu une atteinte du système olfactif permettra d'étudier les mécanismes sous-jacents et d'évaluer l'effet thérapeutique de nouvelles molécules.

- L'anosmie (perte totale de l'odorat) est un des symptômes invalidants de la rhinosinusite chronique (RSC) avec polyposse nasale qui est une maladie invalidante qui touche environ 4% de la population. Les causes de cette maladie sont mal connues, mais sont vraisemblablement allergique et inflammatoire. Dans un modèle murin de la maladie, l'étude de la récupération de ce symptôme après traitement permettra d'affiner la mise en place de cette thérapeutique.

Nous utiliserons les modèles expérimentaux induisant une réduction ou perte de l'olfaction qui ont déjà été développées chez la souris. De plus, cette espèce est l'espèce de choix si des modifications génétiques sont nécessaires à la réalisation de l'étude. 2000 souris seront utilisées pour les 5 ans du projet.

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, la mise à mort), et ayant toutes pour objectif de prévenir ou réduire toute souffrance ou détresse chez l'animal. Dans ce projet, le signe clinique attendu est la perte de l'odorat qui peut engendrer une modification du comportement alimentaire et tout est mis en œuvre pour réduire la contrainte et la souffrance à l'animal. Par ailleurs, chaque

procédure impliquant l'utilisation d'un animal est soumise à approbation par le Comité d'Éthique, avant toute intégration des animaux dans les études. Un support en biostatistiques est apporté au Comité d'Éthique par des experts, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées, et réduire ainsi le nombre d'animaux utilisés. Enfin, les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques et comportementaux fondamentaux.

1617- Les modèles animaux d'inflammation cutanée sont indispensables à la compréhension des mécanismes de développement des maladies inflammatoires cutanées humaines, telle que le psoriasis. De nombreux modèles murins ont été développés pour mimer quelques aspects de ces maladies humaines, cependant les rongeurs présentant des différences immunologiques significatives avec l'homme, la translation clinique reste peu prédictive. De plus, le développement pharmacologique d'anticorps monoclonaux (immunothérapie) souffre du manque de cross-réactivité entre le rongeur et l'homme. Ainsi, nous avons développé et caractérisé un modèle peu invasif d'inflammation cutanée mimant le psoriasis, induit par l'application topique d'Aldara crème (principe actif: Imiquimod 5%) chez des primates non-humains (PNH) qui possède un système immunitaire très proche de celui de l'homme.

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 dirigés contre l'IL7-R ou CD127 humain, et retenue le meilleur d'un point de vue activité. L'équipe a par ailleurs démontré que ces anticorps possèdent une cross-réactivité avec les 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 réaction inflammatoire cutanée (Aldara) chez le PNH.

Le nombre maximum d'animaux utilisés au cours de cette étude sera de 16. Dans un souci de respect de la règle des 3R, l'étude de pharmacocinétique/ pharmacodynamique de la molécule sera conduite de façon simultanée au modèle Aldara sur les mêmes animaux. Chaque animal sera son propre contrôle dans l'évaluation de sa réponse à l'Aldara. De plus, de façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures de ce projet seront réalisées chez des 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 seront hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères.

1618- En pisciculture les poissons peuvent être sujets à plusieurs stress environnementaux abiotiques (variations de la qualité d'eau) et biotiques (prédation, agressions de congénères, manipulation, densité de stockage...). Parmi les stress abiotiques, les hausses de température, dues aux conséquences de changement climatiques, peuvent avoir des effets délétères dans les élevages de truite.

L'objectif de ce projet est de comparer les réponses à des stress thermiques de deux groupes de truites (un groupe résistant et un groupe sensible). Ces groupes ont été préalablement sélectionnés selon leur performance de croissance face aux changements de température (bonne ou mauvaise croissance).

Après une exposition de 4 semaines à trois régimes de température différents ((1) 12°C, situation contrôle; (2) 20 °C; (3) fluctuant chaque jour de 12 à 20 °C), les capacités des deux groupes à (1) répondre à un stress de confinement de courte durée, similaire à certaines procédures utilisées dans les élevages de truites lors des tris et (2) à maintenir leur balance hydrominérale (maintien des contenus en eau et sels de l'animal) seront comparées.

Au final, ce projet devrait fournir des premières informations nécessaires pour sélectionner des truites résistantes aux modifications de température et envisager des solutions d'adaptation à long terme au changement climatique.

Le nombre d'animaux nécessaires au projet est de 660 poissons. Le projet prend en compte la règle éthique des 3Rs :

- Remplacer : Il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car nous recherchons précisément les réponses physiologiques des poissons au stress thermique chronique.

- Réduire : Le nombre d'animaux est adapté au plus juste pour permettre à la fois une densité de poissons par bassin représentative des conditions d'élevage et à la fois une évaluation statistique de la variabilité individuelle de la réponse.

- Raffiner : Les prélèvements ne seront réalisés que sur des animaux euthanasiés et ce, dans les conditions réglementaires. Le protocole permettra de décider d'une interruption de l'expérimentation en cas de franchissement du point-limite

1619- Les anticorps sont des molécules qui ont la propriété de se "mouler" sur leur cible. Ils peuvent être générés par des processus de vaccination. En effet, ils sont sécrétés par des cellules du système immunitaire qui peuvent être isolées, immortalisées, et clonées. Les anticorps monoclonaux sont alors utilisés comme médicament à "action ciblante", ou en recherche pour "détecter" le produit étudié ; dans des domaines très variés allant de l'agronomie à la santé humaine.

L'expérimentation animale présentée dans ce projet est effectuée dans le cadre de la recherche et le développement d'anticorps monoclonaux utilisés dans le domaine de l'oncologie et de la recherche fondamentale :

Le cancer du sein représente une pathologie hétérogène au regard des profils moléculaires présentés et des issues cliniques. Parmi les cancers du sein (48 763 nouveaux cas et 11 886 décès en 2012 pour la France), les cancers dits triples négatifs (TN)

représentent 10 à 20% de l'ensemble de ces cancers. Ces cancers TN montrent un plus mauvais pronostic comparé aux autres cancers du sein car ces patientes présentent un risque accru de développer des métastases (dans plus de 30% des cas).

Un nouveau biomarqueur permettant d'identifier les patientes atteintes du cancer du sein TN avec un risque beaucoup plus élevé rechuter après un premier traitement a été identifié : la forme clivée du CD95L (cl-CD95L). Un outil thérapeutique est en cours de développement, mais la détection et la quantification de ce marqueur dans le sérum n'est actuellement ni reproductible ni sensible. L'objet du projet est donc générer des anticorps sélectifs de la forme clivée du CD95L, dans le but de développer un test mesurant de manière précise, ultra-sensible et reproductible le cl-CD95L dans le sérum des patientes TNs.

Pour ce projet, le nombre maximal d'animaux prévu est de 10 souris blab/c afin de respecter au mieux la règle des 3R :

Réduire : L'antigène, le CD95L, est disponible dans le commerce sous forme purifié. La voie d'immunisation intrasplénique a été choisie compte tenu de la nature de cet antigène, ainsi que son coût. En effet, cette procédure permet d'immuniser des animaux à l'aide de quelques microgrammes de protéine par injection. Ainsi, l'impact de ces quantités réduites de cytokine chez la souris, outre la production d'anticorps, devrait être réduit. Nous prévoyons deux lots de souris afin de garantir un nombre d'individus immunisés suffisants pour l'obtention d'anticorps monoclonaux, mais le second lot dépend des résultats du premier : Si des anticorps monoclonaux d'intérêt sont obtenus avec le premier lot, aucune expérience ne sera réalisée avec un second lot. De même, dès que les hybridomes d'intérêt sont identifiés et cryoconservés, l'expérimentation sur les animaux prendra fin.

Raffiner :

Il s'agit d'une procédure chirurgicale modérée. Cependant, des soins pré-, per- et postopératoires sont prévus dans la procédure d'immunisation : les animaux sont rasés la veille de l'opération, un mélange d'analgésique et d'anesthésique est injecté quelques minutes avant l'opération (réalisée sous anesthésie gazeuse), et de la morphine est administrée aux souris en postopératoire.

Enfin, pour chaque projet d'immunisation, les conditions d'immunisation et les réponses observées sont consignées dans un fichier. Une analyse rétrospective des expériences réalisées sera effectuée dans le but d'améliorer le nombre d'animaux nécessaires pour ce type d'immunisation.

1620- Lors d'une attaque par un agent infectieux, une des premières réponses de l'organisme consiste à recruter des leucocytes ou globules blancs à partir du sang circulant, vers le foyer infectieux. Ce recrutement met en jeu toute une série de récepteurs à la surface d'une part des leucocytes mais aussi à la surface de la paroi vasculaire qu'ils doivent traverser pour migrer vers les tissus infectés. Cette réponse physiologique ou réponse inflammatoire aiguë est nécessaire pour lutter contre les infections et réparer des lésions tissulaires. Malheureusement lorsque l'inflammation perdure et devient chronique, le recrutement constant de leucocytes à partir du sang peut s'avérer néfaste et il devient alors important de limiter la migration de ces cellules.

Nous avons récemment mis en évidence la capacité d'une molécule à inhiber la première étape du recrutement leucocytaire. Cette preuve de concept a été obtenue à l'aide de modèles in vitro sur des cellules isolées. Il est donc désormais important pour valider cette protéine de la tester in vivo afin de voir si elle peut effectivement inhiber le recrutement des leucocytes vers l'extérieur du compartiment vasculaire. Un modèle murin nous permettant de visualiser la vasculature et les leucocytes sera utilisé pour tester l'effet de cette molécule. Nous prévoyons d'utiliser 60 souris pour ce protocole. Ce nombre a été calculé au plus juste pour tester différentes concentrations du produit tout en gardant un nombre suffisant d'animaux pour obtenir des résultats statistiquement valables. La procédure est effectuée sous anesthésie générale et des points limite ont été fixés pour arrêter l'expérimentation dans le cas de souffrance ou de détérioration de l'état des animaux.

1621- La sclérose en plaques est une maladie chronique inflammatoire affectant le système nerveux central. Si ses causes restent encore mal connues, ses manifestations cliniques sont la conséquence d'une démyélinisation des fibres nerveuses du cerveau et de la moelle épinière. La maladie débute dans la grande majorité des cas chez l'adulte jeune, typiquement entre 20 et 40 ans, et se traduit par des troubles neurologiques touchant diverses fonctions comme la motricité, la sensibilité, la vision.

Les premiers épisodes de démyélinisation régressent sur le plan clinique, mais la maladie évolue ensuite vers des formes progressives sans phase de rémission, ce qui reflète l'absence de réparation des gaines de myéline. Or, en l'absence de myéline, les neurones dégèrent. Les traitements actuellement disponibles en clinique permettent de réduire l'inflammation, mais aucun n'induit la régénération de la myéline indispensable dans la phase évolutive de la maladie.

Les raisons de ce défaut de réparation sont méconnues, mais mettent vraisemblablement en jeu les différentes sous-populations de cellules présentes dans le tissu lésé. Certaines sous-populations semblent favoriser et d'autres empêcher la régénération de la myéline. Nous allons caractériser ces populations cellulaires afin de définir quelles sont les cibles les plus prometteuses des molécules qui devront être développées dans le futur dans un but thérapeutique. Nous venons de démontrer l'activité réparatrice de la myéline de la voie de signalisation Hedgehog. Nous allons moduler l'activation de cette voie dans un modèle de démyélinisation in vivo chez la souris afin de caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires qui permettent de régénérer le tissu lésé. Ce projet nécessite d'utiliser des animaux afin de mimer le processus de dégénérescence de la myéline observé chez l'Homme dans les maladies de la myéline. En effet, des cultures de cellules ne pourront jamais servir de modèle, car elles ne peuvent reproduire les mécanismes complexes qui se produisent au cours des processus de lésion, puis de réparation du tissu cérébral. Cependant, nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux à utiliser en calculant que 12 animaux par groupe sont suffisants pour mettre en évidence une différence. Les expériences seront reproduites 2 fois pour chaque groupe au cours des 5 années du projet. Nous inclurons donc dans nos expériences 288 souris pour les 5 années du projet. Le mode de démyélinisation utilisé induit une lésion de taille très réduite. Nous

raffinons au maximum la technique permettant de réaliser la lésion en utilisant une aiguille extrêmement fine et récemment mise à disposition de la communauté scientifique pour ce type d'approche. Les animaux sont placés sous anesthésie générale pendant 20 minutes puis sous surveillance jusqu'à leur réveil et la reprise d'une activité normale soit environ 1h30 après le début de l'anesthésie. Aucune souffrance de ces animaux liée à la chirurgie n'est observée. La lésion se répare en une quinzaine de jours et les animaux ne montrent aucune altération de leur état général.

1622- Le virus Ebola appartient à la famille des Filovirus. Cinq souches ont été identifiées : Zaïre, Bundibugyo, Soudan, Reston et Côte d'Ivoire. Le virus à l'origine de la flambée 2014 en Afrique de l'Ouest appartient à la souche Zaïre (appelée également souche Gabon). Le virus Ebola provoque une maladie aiguë et grave, souvent mortelle. La maladie à virus Ebola est apparue pour la première fois en 1976, lors de deux flambées simultanées à Nzara (Soudan) et à Yambuku (République démocratique du Congo). Yambuku étant situé près de la rivière Ebola, celle-ci a donné son nom à la maladie. Les flambées de fièvre hémorragique provoquées par le virus Ebola surviennent principalement en Afrique avec un taux de mortalité variant de 25% à 90% selon le type de virus et les conditions de prise en charge. La précocité et la qualité de cette prise en charge jouent un rôle important pour diminuer la mortalité associée à la maladie. La flambée qui sévit actuellement en Afrique de

l'Ouest (dont les premiers cas ont été notifiés en mars 2014) est la plus importante et la plus complexe depuis la découverte du virus en 1976. Elle a produit plus de cas et de décès que toutes les précédentes flambées réunies. Cette flambée a également comme particularité de s'être propagée d'un pays à l'autre, partant de la Guinée pour toucher la Sierra Leone et le Libéria (en traversant les frontières terrestres), le Nigéria (par l'intermédiaire d'un seul voyageur aérien) et le Sénégal (par l'intermédiaire d'un voyageur arrivé par voie terrestre). D'après de récentes données, l'épidémie a provoqué plus de 20 000 cas dont 10 000 décès. Les pays les plus touchés (la Guinée, la Sierra Leone et le Libéria) ont des systèmes de santé très fragiles. Le 8 août 2014, il a été déclaré que cette flambée constituait une urgence de santé publique de portée internationale. Aucun traitement homologué n'a pour l'instant démontré sa capacité à neutraliser le virus et face au manque de solutions thérapeutiques disponibles pour la prise en charge des infections à virus Ebola, nous avons entrepris le développement de molécules antivirales. Le but de ce projet est ainsi d'étudier l'efficacité antivirale de deux molécules, dans un modèle murin sensible au virus Ebola (souris IFNAR -/-). Ce projet nécessite l'utilisation de 60 souris IFNAR -/-.

Conformité avec les 3R :

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats interprétables et statistiques. Dans la mesure où ces molécules ont montré une efficacité significative in vitro, la confirmation de cette efficacité dans un modèle murin adapté est une étape obligatoire. Afin de raffiner l'expérimentation, une attention particulière sera portée sur l'enrichissement confort (nid coton) et l'enrichissement de stimulation (maison en carton). Les animaux sont suivis et observés individuellement pendant la période critique. Dès le point limite atteint, l'animal concerné est euthanasié.

1623- L'objectif scientifique de cette validation d'un système invasif de mesures et d'analyses des pressions artérielles et de cathétérisme cardiaque est :

Le système circulatoire est constitué principalement d'une pompe cardiaque et de vaisseaux sanguins (artères et veines). Cette pompe a pour effet de faire circuler le sang depuis les artères jusqu'à la microcirculation.

Le sang enrichi quitte le cœur gauche (ventricule gauche) par les artères tandis que le sang appauvri retourne vers le cœur (ventricule droit) grâce à des réseaux de veines.

Le cœur (pompe cardiaque) à un fonctionnement cyclique, en effet, le sang enrichi s'éjecte du ventricule gauche (éjection) lorsque ce dernier se contracte également appelé la systole ventriculaire ; alors que le ventricule droit se remplit du sang appauvri (remplissage), lorsque le cœur se relâche c'est la phase de relâchement ventriculaire. L'ensemble de ces phénomènes s'intitule l'hémodynamique cardiaque.

Différents facteurs influencent l'hémodynamique : l'activité cardiaque et pulmonaire, le diamètre des artères ou des veines et leurs rétrécissements, la consistance du sang et la vascularisation.

Parmi les méthodes d'investigation en hémodynamique, l'exploration des pressions intracardiaque (Pressions Ventriculaires Gauches ou Droites) et intravasculaire (Pressions Artérielles) qui se fait principalement par le cathétérisme invasif. Celle-ci consiste à introduire une sonde dans les différentes cavités cardiaques (droite ou gauche) pour mesurer des pressions.

D'un point de vue pratique la validation se déroulera en deux phases :

Dans un premier temps nous allons procéder à la validation de notre système de mesure par administration d'un agent permettant d'augmenter la pression artérielle (PA) et la pression ventriculaire gauche (PVG). Pour chaque souris, la PA et la PVG de base seront mesurées puis il sera administré l'agent hypertenseur (Phényléphrine), et les PA et PVG seront de nouveau mesurés.

Dans la seconde phase de la validation nous utiliserons des souris chez lesquelles sera induit une hypertension artérielle caractérisée (nourriture riche en sel plus agent hypertenseur) comparées à des souris contrôles (nourriture standard).

Dans l'élaboration de notre protocole, nous nous sommes attachés à réduire au maximum le nombre de souris utilisées tout en permettant un traitement statistique des données concernant la reproductibilité des résultats et obtenir des informations pertinentes permettant la validation de notre système.

Notre expérience au laboratoire a montré qu'il est nécessaire d'avoir un effectif de 9 souris au minimum afin de pouvoir conclure sur l'étude. Ainsi nous avons 3 groupes de 9 souris.

Avec ce protocole nous nous sommes attachés à éviter au maximum toutes formes de souffrances des souris impliquées. En effet, le cathétérisme invasive se fait sous anesthésie et ne provoque donc aucune souffrance animale.

A ce jour, il n'est pas possible de remplacer l'utilisation de souris par des techniques alternatives pour la validation de notre système de mesures invasives des pressions

1624- L'objectif scientifique de ce développement et validation d'un modèle d'hypertrophie cardiaque dite physiologique induite par l'exercice prolongé (nage forcée) et comparaison avec un modèle d'hypertrophie cardiaque induite par l'isoproterenol est :

L'entraînement physique intense peut induire des modifications cardiaques morphologiques et fonctionnelles chez l'homme comme chez la souris. Dans ce cadre, c'est le ventricule gauche qui est hypertrophié. L'hypertrophie ventriculaire gauche, directement liée à la pratique sportive et à l'entraînement, est le plus souvent modérée. C'est un mécanisme d'adaptation physiologique à une pratique sportive intense.

Dans le cadre d'un partenariat entre l'ICS et un industriel, une piscine reliée à un compresseur permettant la génération de bulles dont les spécificités en tailles, débits et positionnements a été étudié pour forcer les souris à produire un effort dans le but de créer une hypertrophie cardiaque physiologique par l'exercice physique a été développé. Nous allons valider le protocole de nage et le matériel en montrant la présence d'une hypertrophie cardiaque chez les souris nageuses et caractériser et décrire ce modèle d'hypertrophie cardiaque par échographie et histologie. Nous allons également comparer cette hypertrophie cardiaque dite physiologique avec une hypertrophie cardiaque induite par un agoniste des récepteurs β 1- et β 2-adrénérgiques, l'isoprotérénol

D'un point de vue pratique nous utiliserons des souris que nous utilisons habituellement au laboratoire.

Dans l'élaboration de notre protocole, nous nous sommes attachés à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en permettant un traitement statistique des données concernant l'inflammation et obtenir des informations pertinentes pour pouvoir conclure :

Notre expérience au laboratoire a montré qu'il est nécessaire d'avoir un effectif de 6 souris au minimum afin de pouvoir conclure sur l'étude. Dans une étude précédente, nous avons mis en évidence qu'une proportion non négligeable de souris nageuses, refusent de nager. Ainsi le nombre de souris nageuses est augmenté pour permettre d'avoir à la fin de l'étude au moins 6 souris qui ont nagé et suivi tout le protocole.

Nous estimons qu'il est nécessaire d'étudier les tissus de 4 souris au minimum pour pouvoir conclure en histologie.

Ainsi nous utiliserons 38 animaux pour ce projet, répartis en 5 groupes

Un groupe de souris nageuse (10 souris) de souche C57BL/6, souche couramment utilisée au laboratoire avec un groupe de souris sédentaire (6 souris) servant de contrôles. Un groupe de souris nageuse (10 souris) de souche CD1, souche ayant une bonne aptitude à la nage, avec un groupe de souris sédentaire (6 souris) servant de contrôles. Enfin, un groupe de souris avec une hypertrophie cardiaque induite par l'isoproterenol, (6 souris) de souche C57BL/6.

Avec ce protocole nous nous sommes attachés à éviter au maximum toutes formes de souffrance des souris impliquées. Le protocole de nage a été mis au point pour permettre un entraînement progressif des souris à l'effort et de ce fait ne provoque pas de souffrance. L'exploration échographique sous ne provoque pas de souffrance.

A ce jour, il n'est pas possible de remplacer l'utilisation de souris par des techniques alternatives pour étudier le développement de ces pathologies

1625- L'objectif de notre projet est de comprendre le rôle du gène étudié chez l'adulte. En effet, des études précédentes que nous avons réalisées ont montré que les souris ne possédant pas ce gène (après inactivation au moment de l'étude) avaient une survie de moins de 15 jours. Les analyses effectuées avant la mort des animaux ont mis en évidence des anomalies multiples. Particulièrement, les données obtenues montrent des anomalies au niveau intestinal semblables aux anomalies observées dans le cas d'un cancer colorectal chez l'Homme.

Notre projet a ainsi pour but de réaliser un modèle pertinent pour l'étude du cancer colorectal maladie qui représente près de 40 000 nouveau cas en France chaque année. Ce cancer, en France, sur la période 2003-2007, a fait en moyenne chaque année 8 690 victimes chez les hommes et 7 740 chez les femmes.

Ce projet va donc être réalisé en utilisant des souris génétiquement modifiées, seuls animaux chez lesquels les techniques de mutation génétique pertinentes pour cette étude sont actuellement bien maîtrisées. De plus l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode in vivo ne peut remplacer les interactions avec l'organisme résultant dans le développement du cancer.

La mutation génétique étudiée a des conséquences sur l'animal. Afin de réduire toute souffrance à son minimum, les animaux seront euthanasiés dès les premiers signes de perte de poids.

Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, les précédentes études ont permis d'avoir des résultats avec des groupes de 6 à 8 animaux. Ainsi, dans ce projet un total de 20 animaux sera utilisé lors des procédures expérimentales. De même, les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter tout duplicata d'étude

1626- La pédiculose est une maladie parasitaire due à un arthropode ectoparasite hématophage: *Pediculus humanis corporis*. Cette maladie qui est cosmopolite affecte particulièrement les populations défavorisées dans les pays développés (SDF) et dans les pays en voie de développement. La transmission s'effectue par contact direct d'un individu porteur ou par l'environnement. Outre le prurit et les possibilités de surinfection par des micro-organismes tels que les staphylocoques ou des streptocoques cette parasitose peut être la source d'épidémie. En effet cet arthropode est le vecteur de bactéries pathogènes : *Bartonella quintana*, *Rickettsia prowazekii*, *Borrelia recurrentis*.

En Afrique, le traitement de cette pédiculose repose sur l'utilisation d'insecticide ou d'un antiparasitaire (Ivermectine). Des résistances à ces 2 types de traitements commencent à y être décrites suite à l'inobservance de traitement et à la contrefaçon de médicaments.

Le pou de corps possède un microbiote qui lui apporte la vitamine B5 indispensable à sa croissance. Des études préliminaires réalisées dans notre laboratoire montrent une sensibilité de ce microbiote aux antibiotiques utilisés en médecine humaine tels que la doxycycline ou l'azithromycine.

Le but de ce projet est de tester un traitement novateur couplant un antiparasitaire et un antibiotique. Comme il n'existe pas de système ex-vivo capable d'élever cet arthropode et que la mise au point sur des patients est éthiquement discutable, le modèle animal est incontournable. Comme notre laboratoire maintient une lignée de poux de corps sur des lapins depuis de nombreuses années, nous testerons l'association de ces molécules avec des lapins.

Comme la piqûre du pou peut infliger un léger prurit et que les animaux seront utilisés vigiles, une procédure d'adaptation à la contention et à la manipulation sera suivie. Une procédure de nettoyage de la peau et antiprurigineuse post manipulation sera également appliquée.

Nous souhaitons étudier 2 associations antiparasitaire/antibiotique. Aussi pour avoir un nombre suffisant de poux exposés aux principes actifs nous utiliserons 3 lapins par association. Donc ce projet nécessitera 6 lapins. Dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés par le laboratoire, les animaux utilisés dans ce projet seront repris dans un protocole pour lequel le laboratoire a reçu un avis favorable du comité d'éthique (immunisation du lapin pour la production de sérum polyclonal).

Les manipulations seront effectuées dans une animalerie A1.

1627- Les maladies métaboliques (diabète, dyslipidémie, obésité...) sont un problème de santé publique qui touche de plus en plus de personnes dans le monde. Des traitements existent mais ils sont contraignants et souvent non satisfaisants. Ces maladies et leurs conséquences (neuropathie, néphropathie, troubles cardiovasculaires etc...) sont en constante augmentation et représentent un enjeu thérapeutique de taille pour les chercheurs. Les mécanismes du développement de ces pathologies ne sont pas encore connus, c'est pourquoi une recherche active de nouvelles thérapies, de nouveaux procédés d'administration, de biomarqueurs et de nouvelles cibles thérapeutiques est nécessaire. Cette recherche peut se faire grâce à des modèles animaux de ces troubles métaboliques (modèles pathologiques). La composante génétique jouant un rôle important dans ces maladies, des souris transgéniques pourront être utilisées comme modèles pathologiques et/ou mécanistiques de ces troubles.

L'objectif de ce projet est d'une part, d'étudier les altérations métaboliques et leurs conséquences physio-pathologiques par l'observation de biomarqueurs en biochimie et/ou imagerie, consécutives à un régime alimentaire gras de quelques semaines à plusieurs mois chez la souris, et d'autre part de tester de nouvelles approches thérapeutiques (petites molécules, siRNA, anticorps, peptides...). En effet, les souris pourront être soumises à des administrations répétées d'agents thérapeutiques simultanément ou à la suite d'un régime gras.

Dans le cadre du processus de développement des médicaments, les études in vivo sont pratiquées seulement pour les meilleurs produits identifiés in vitro, et ceci afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés. Seul le recours à des tests in vivo, sur un modèle approprié, permet de valider dans un organisme intégré "complexe" l'activité du produit. Les techniques d'imagerie permettent des études longitudinales du développement d'une pathologie et/ou de l'efficacité d'un traitement thérapeutique en réduisant le nombre total d'animaux nécessaires à leurs validations. Les études réalisées au sein du Centre de Recherche sont encadrées par des consignes établies et validées par le Comité d'Éthique, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (l'hébergement, les soins, la manipulation, les expérimentations), et ayant toutes pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal. Par ailleurs, chaque procédure impliquant l'utilisation d'un animal est soumise à approbation par le Comité d'Éthique, avant toute intégration des animaux dans les études. Un support en bio-statistiques est apporté au Comité d'Éthique par des experts de la spécialité, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées, et réduire ainsi le nombre d'animaux utilisés dans les études. Enfin, les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques fondamentaux. Ce projet couvre l'utilisation d'un maximum de 4200 souris pour 5 ans.

1628- La rythmicité est un aspect universel dans le fonctionnement physiologique de la plupart des systèmes biologiques. Des variations régulières des paramètres biologiques sont décrites, allant de l'expression journalière dite circadienne (du latin circa : autour + diem : jour) de gènes au cycle menstruel. Dans l'étude de la perception des odeurs, il a été établi que l'activité nerveuse dans le premier relais central de l'information olfactive du cerveau (bulbe olfactif) diffère entre le jour et la nuit. Le système olfactif est impliqué dans la régulation de la prise alimentaire, la reproduction, les interactions sociales. Une meilleure connaissance de sa régulation/son évolution durant la journée permettrait de mieux apprécier et étudier de nombreux aspects de la physiologie animale.

La muqueuse olfactive (site de détection des odeurs) pourrait participer à ce rythme biologique, cependant une étude précise de changement au niveau de la première étape de la détection des odorants n'a jamais été envisagée.

Le but de ce présent projet est de caractériser une variation journalière rythmique de la détection des odorants. Pour cela nous désirons mesurer la réponse aux odeurs et mesurer le niveau de différents mécanismes de détection des odeurs, à différents moments de la journée, ou en conditions constantes lorsque les indices externes qui règlent l'horloge biologique sont contrôlés. La complexité des mécanismes mis en jeu est impossible à reproduire dans un modèle in vitro et nous contraint à travailler sur un modèle animal en prélevant des tissus après euthanasie. Le nombre d'animaux (360 rats) a été réduit en prélevant le maximum de tissus sur chaque animal tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques

paramétriques. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience ce qui nous permettra d'intervenir de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Nous étudierons tout d'abord les oscillations au sein de la muqueuse olfactive (réponses électrophysiologiques, expression de gènes, dynamique cellulaire) puis chercherons à en étudier les mécanismes en enlevant les indices de temps autour de l'animal. Ces indices peuvent être aussi bien lumineux (alternance du jour et de la nuit supprimée en maintenant les animaux dans l'obscurité en continu) qu'olfactifs (contrôle des odorants arrivant à l'animal) que liés à la prise alimentaire (passage à un repas à heure fixe au lieu d'une alimentation continue). Ce travail nous permettra de mieux comprendre comment durant la journée la perception du monde odorant peut évoluer pour s'ajuster aux besoins physiologiques de l'organisme.

1629- Les dommages permanents de la fonction auditive (surdité) causent des déficits fonctionnels persistants handicapants avec pour conséquence des problèmes de communication, d'isolement, de dépression et des problèmes cognitifs.

Actuellement, aucun traitement ciblé et efficace n'est disponible pour les patients souffrant de telles pathologies. Nous travaillons à l'identification et au développement de traitements ciblés pour satisfaire ce besoin médical en santé publique. Ce projet répond aux demandes des autorités réglementaires liées au développement d'un composé d j   identifié mais aussi de futurs composés ayant une efficacité plus élevée et moins d'effets secondaires. Après avoir été testés dans des études in vitro, il est nécessaire que ces composés démontrent efficacité et sécurité in vivo chez l'animal avant passage chez l'homme. La capacité des candidats-médicaments à atteindre les cibles dans l'oreille interne et traiter la surdité ne peut être évaluée que chez l'animal avec un système auditif complet, capable de reproduire le fonctionnement et les symptômes observés chez le patient. De plus, pour soutenir le développement d'un candidat-médicament, il est nécessaire de bien établir la relation entre les doses efficaces et l'exposition au produit.

C'est pourquoi ce projet inclut 3 procédures : Les deux premières permettent de tester l'efficacité des candidats-médicaments sur les modèles pathologiques chez le rat, la dernière permet d'étudier la pharmacocinétique des candidats-médicaments chez le rat également. Il couvre l'utilisation d'au maximum 11120 rats sur 5 ans. Les études réalisées au sein du centre de recherche, par du personnel formé et compétent, sont encadrées par des recommandations internes, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux ( thique, hébergement, soins, manipulation, expérimentations), et ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal (utilisation d'anesthésiques et d'antalgiques). Une analyse statistique optimise les méthodes expérimentales employées, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés au strict nécessaire. Tous ces éléments assurent l'application maximale du principe des 3R.

1630- La perception de l'odeur de l'aliment joue un rôle important dans la prise alimentaire. Le système olfactif participe à l'élaboration de la valeur hédonique des aliments et intervient dans la régulation de l'appétit, de la prise alimentaire et du niveau de satiété. Certaines bases physiologiques des variations de perception olfactive en fonction de l'état métabolique ont été identifiées. La muqueuse olfactive (site de réception des odeurs) et le bulbe olfactif (BO; premier site d'intégration du message olfactif vers le Système Nerveux central (SNc)), sont riches en récepteurs aux hormones de la prise alimentaire (insuline, leptine, orexines, NPY), et la modulation de ces hormones par la mise à jeun modifie le fonctionnement et/ou l'expression g nrique des cellules de ces structures. Plusieurs travaux indiquent que l'olfaction et sa régulation par l'état métabolique sont altérées dans les situations d'obésité, chez l'homme et dans les modèles murins. Cependant la caractérisation de ces altérations et la mise en évidence des mécanismes sous-jacents restent largement à étudier.

Notre projet cible les interactions neurones-astrocytes au niveau du BO. Les neurones sensoriels de la muqueuse olfactive projettent directement dans les glomérules du BO, structures très plastiques où les prolongements astrocytaires et ceux des neurones s'entremêlent. Ces glomérules constituent un site potentiel d'intégration des multiples facteurs régulant la perception olfactive. Le rôle de l'astrocyte y est souligné par quelques travaux récents. En effet, les astrocytes sont aujourd'hui reconnus comme des partenaires à part entière de la synapse et considérés comme des méta-régulateurs de la neurotransmission dans le SNc. Dans plusieurs régions cérébrales, il a été montré une influence de signaux physiologiques (comme le statut en oméga-3 ou le vieillissement) sur la couverture astrocytaire et sur sa régulation du fonctionnement synaptique. L'objectif du projet est donc d'avancer sur les mécanismes reliant la perception des odeurs et la prise alimentaire dans le BO. Nous étudierons l'impact de l'état métabolique (jeûne/satiété) et d'un neuropeptide régulant la prise alimentaire (le NPY) sur les régulations astrocytaires s'exerçant sur les synapses glutamatergiques au sein des glomérules, chez le rat, en utilisant des niveaux d'approches complémentaires :  tudes sensorielles (in vivo), analyses moléculaires et immunohistochimiques, réponses physiologiques astrocytaires sur tranches (ex vivo) et sur cultures primaires de BO (in vitro). Les résultats permettront de comprendre comment l'état de faim/satiété régule la sensibilité olfactive au niveau du bulbe, ce qui devrait ouvrir des pistes intéressantes sur la dérégulation de ces mécanismes dans l'installation des  tats d'obésité.

La complexité des mécanismes étudiés les rend impossibles à reproduire dans un modèle in vitro. Néanmoins la combinaison optimisée des approches sur les mêmes lots d'animaux, et la réalisation d'une partie de nos expériences sur des cultures primaires de cellules, nous permettent de proposer un projet de recherche réaliste, portant au maximum sur 315 rats de 5/7 semaines et 150 rats nouveau-nés. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des résultats. Tous les protocoles sont de sévérité légère à l'exception d'un seul classé en sévérité modérée, et les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux.

1631- La sclérose en plaque est la première cause de troubles neurologiques d'origine non accidentelle du jeune adulte en Europe. Cette maladie touche plus de 80 000 personnes en France, dont plus de la moitié présentent des déficits neurologiques graves, qui perturbent lourdement leur vie et celle de leur proche de façon irréversible pendant des dizaines d'années.

La compréhension de la physiopathologie, le développement de méthodes de diagnostic par l'imagerie in vivo et la mise au point de thérapies adaptées pour la sclérose en plaque, sont étroitement liées à l'utilisation de modèles animaux. Ce projet vise à créer, caractériser et utiliser, un modèle récapitulant les caractéristiques principales des pathologies démyélinisantes pour le développement de nouvelles stratégies diagnostic et thérapeutique pour la clinique humaine. Pour cela, le choix d'une espèce de primate se justifie par le degré de parenté avec l'homme, sur un plan immunitaire, anatomique et fonctionnel. Une étude récente montre que l'espèce de Primate Non Humain retenue récapitule la diversité et la complexité des tableaux cliniques de cette pathologie chez l'homme.

Par ailleurs, une partie importante du projet est basée sur l'utilisation de cultures de cellules des animaux pour diagnostiquer, analyser les mécanismes physiopathologiques et mesurer les effets des thérapies testées. Ce choix diminue par trois environ le nombre d'animaux. De plus, au sein de chaque procédure, des analyses multiples sur les animaux (suivi au niveau cellulaire, développement, mise au point et validation de méthodes d'imagerie in vivo et de diagnostic, suivi clinique in vivo et post mortem, évaluation de stratégies thérapeutiques) permet de diviser par cinq le nombre d'animaux

Afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs, le projet nécessitera 90 animaux mâles ou femelles (sexe indifférent) nés dans un élevage reconnu, âgés de 5 à 15 ans dans un premier temps, puis de moins d'un an dans une autre série, sur une durée de 5 ans. Le nombre d'animaux demandé prend en compte l'hétérogénéité interindividuelle du décours de la maladie.

La mise en œuvre de méthodes non invasives, le suivi quotidien des animaux et l'application de critères d'arrêt adaptés optimisent le bien-être des animaux. L'utilisation d'analgésique et d'antalgique, après avis vétérinaire, permettra de réduire la durée et l'intensité des crises de la maladie pour ces travaux d'analyse longitudinale.

L'obtention d'un modèle animal mimant réellement la sclérose en plaque a pour but de comprendre la physiopathologie de la maladie, identifier de nouveaux biomarqueurs, mieux comprendre les éléments de l'imagerie diagnostique et enfin tester de façon pertinente, des stratégies thérapeutiques réellement applicables à l'homme.

1632- L'utilisation massive d'antibiotiques en productions animales est un problème de santé publique. Le plan Ecoantibio 2017 prévoit de réduire de 25% en 5 ans l'usage des antibiotiques en élevage et médecine vétérinaire, plan auquel adhère la filière porcine. Actuellement, pendant le mois qui suit le sevrage, les pertes dues à la mortalité de porcelets oscillent entre 2 et 3%. Ce résultat n'est possible que grâce à l'utilisation très fréquente d'aliment 1er ou 2ème âge supplémenté en antibiotiques, qui représentent environ 60% des antibiotiques utilisés en production porcine. La volonté de réduire cet usage conduit à reconsidérer les modalités de traitement (du collectif à l'individuel), et à rechercher l'obtention de porcelets plus robustes, témoignant d'une meilleure aptitude à répondre et à s'adapter au stress du sevrage. La recherche d'indicateurs et de prédicteurs de la robustesse, sur lesquels sélectionner les animaux ou s'appuyer pour piloter l'élevage, sont ainsi deux enjeux majeurs.

Des résultats préliminaires dans des élevages commerciaux ont permis d'identifier certains indicateurs sanguins du statut oxydatif comme de potentiels marqueurs candidats (composés hydroperoxydes et capacité anti-oxydante totale). L'objectif du projet est de confirmer, en conditions expérimentales contrôlées, que ces deux indicateurs varient effectivement au moment du sevrage et corréler avec les signes cliniques et la bonne croissance des animaux. Il aura aussi pour objectif de fournir des niveaux de référence porcins pour ces deux indicateurs, en fonction de l'âge, du sexe.

Un pre-essai permettra de valider que ces deux marqueurs varient en réponse le sevrage dans notre élevage expérimental et d'en estimer la variance afin d'adapter les effectifs d'animaux nécessaires pour l'étude principale (Réduction). Pour ce faire, 10 porcelets tous venants soumis au mode de conduite habituel de l'élevage seront soumis à deux prises de sang (5 mL), la veille et une semaine après le sevrage, afin de doser les deux marqueurs biologiques d'intérêt.

L'essai principal prévoit actuellement 64 porcelets des deux sexes, qui seront sevrés par moitié aux deux âges pratiqués sur le terrain (21 et 28 jours), soit en conditions environnementales optimales, soit en conditions dégradées, comme cela peut parfois se voir sur le terrain (soit 4 conditions testées). Nous estimons que 16 animaux par groupe expérimental devraient être suffisants, mais cet effectif sera ajusté en fonction des résultats de la pré-étude (Réduction). Les porcelets seront logés en collectif (4 à 8 animaux par loge). Les mesures réalisées seront : des pesées régulières, la température rectale autour du sevrage, l'examen clinique journalier (toux, consistance des fèces, lésions corporelles). Chaque porcelet subira 5 prises de sang entre 14 et 63 jours d'âge, et sera rendu à l'élevage expérimental à la fin de l'étude (pas d'euthanasie). Les prises de sang permettront la mesure de paramètres en lien avec la santé des porcelets (Raffinement). Les procédures seront effectuées par du personnel expérimenté et les porcelets seront observés tous les jours afin de détecter précocement des signes de souffrance (Raffinement). Etant donnée la complexité du phénomène du sevrage (changement alimentaire, stress social, nouvel environnement physique et microbien), il est impossible de remplacer l'approche animale par une approche in vitro ou in silico.

1633- Chez les animaux d'intérêt agronomique, l'échec élevé et précoce de la gestation réduit la performance de la reproduction et l'efficacité des systèmes d'élevage. Chez les ovins et les bovins, cet échec survient le plus souvent pendant les périodes péri-implantatoires correspondant à la réceptivité de l'endomètre (épithélium de la muqueuse utérine) et au développement rapide de l'embryon. Un dysfonctionnement de la fonction utérine est une des causes identifiées comme responsable des échecs de la gestation. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires nécessaires à

l'établissement de la gestation est donc essentielle pour améliorer nos connaissances sur la réceptivité de l'endomètre maternel avant l'implantation de l'embryon.

Chez les ruminants, l'implantation de l'embryon dépend des communications entre les cellules de l'endomètre utérin et celles de l'embryon. Chez l'humain, la brebis et la truie il a été montré récemment l'existence dans le fluide utérin (obtenu par lavage de l'utérus) de petites vésicules sécrétées ayant la capacité de transporter des molécules entre les cellules. Ces vésicules pourraient jouer un rôle clé dans la communication cellulaire entre l'endomètre maternel et l'embryon pendant l'implantation.

Notre objectif, dans ce protocole, est de mettre en évidence des vésicules dans le fluide utérin chez la brebis et d'en obtenir en grande quantité pour les étudier ex vivo.

Les résultats attendus devraient contribuer à une meilleure connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réceptivité utérine et la reconnaissance maternelle de la gestation au cours de l'implantation chez ces animaux d'intérêt agronomique.

Afin de respecter la règle des 3R, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux (N=12). Toutefois, afin de diminuer le nombre d'animaux, des expériences seront aussi réalisées à partir de cultures cellulaires dérivées des prélèvements effectués sur les animaux de ce protocole. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour limiter au maximum toute souffrance lors des interventions sur les animaux. De plus afin de réduire une éventuelle angoisse, les conditions de vie des brebis seront identiques à celles rencontrées en élevage classique. Les animaux seront également transportés en groupe pour éviter tout stress.

1634- 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-vasseaux 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.

Les étapes du projet sont:

1. L'étude de la faisabilité technique : cette étape va rechercher quels paramètres microcirculatoires sont mesurables et sur quel tissu.
2. La comparaison des mesures de microcirculation obtenues avec un dispositif de référence utilisé en clinique.
3. Une étude pilote de faisabilité de mesures simultanées multiparamétriques in vivo sur des tissus accessibles sélectionnés dans l'étape 1.
4. L'évaluation complète du dispositif sur sa sensibilité à capter les changements de microcirculation et des mesures multiparamétriques au cours de perturbations hémodynamiques.

Ces expérimentations utiliseront un modèle murin particulièrement adapté à l'étude de la microcirculation par méthode optique. Les vascularisations étudiées dans le point 1 comprennent le foie, le rein gauche, l'intestin, le péritoine et le crémaster. L'étude de ces territoires nécessitera une laparotomie pour exposer les organes d'intérêt préalablement sélectionnés. Les deux territoires présentant le maximum d'intérêt (qualité des paramètres mesurés) seront étudiés dans la suite du projet.

Les situations pathologiques étudiées dans l'étape 4 seront: un modèle de choc cardiogénique, c'est à dire de dysfonction myocardique aigue médicamenteuse par surdosage en bêta1-bloquant ; un choc hémorragique contrôlé, c'est-à-dire le prélèvement de sang via un cathéter positionné dans un gros vaisseau ; ainsi qu'une exposition à l'hypoxie et à l'hyperoxie.

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

L'échec de l'anesthésie durant la phase de préparation ou d'expérimentation malgré une adaptation titrée de la posologie, c'est-à-dire la présence de mouvements ou de dyspnée (respiration anormale), entraînera un arrêt de la procédure et l'animal sera mis à mort.

Les animaux utilisés seront des rats Wistar, au nombre maximum de 70. Ce nombre prend en compte de l'incertitude des études pilotes des étapes 1 à 3 et la mortalité éventuelle liée aux états pathologiques étudiés dans la série 4. 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.

1635- Les bactéries *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont reconnues internationalement comme des pathogènes associés à des épidémies alimentaires de grande envergure souvent gravissimes. Les épidémies à EHEC pointent du doigt les aliments issus du bovin tels que les produits au lait cru ou la viande hachée.

Néanmoins, les plans de surveillances officiels montrent que le nombre de cas épidémiques dus à la consommation de matrices alimentaires dérivées du lait cru, potentiellement contaminées, reste faible. La matière grasse, notamment, semble impliquée dans l'inhibition de l'adhésion de nombreuses bactéries à l'intestin humain, diminuant ainsi leur nocivité.

L'objectif du projet est d'évaluer l'impact de la matrice alimentaire, ainsi que différentes molécules retrouvées dans ces matrices sur l'adhésion des EHEC chez la souris.

Pour ce projet, 440 souris au maximum seront utilisées sur 5 ans, ce qui représente 20 tests différents (souche bactérienne différente et/ou matrice alimentaire/molécule différente)

En fonction des résultats obtenus, des méthodes de remplacement disponibles, et des matrices alimentaires à évaluer, le nombre d'animaux utilisés pourra être diminué.

Le nombre d'animaux prévu par test est le minimum nécessaire afin d'obtenir des résultats scientifiquement interprétables.

Les souris sont reconnues comme étant un modèle pertinent pour l'étude de la colonisation du tube digestif par les EHEC.

Durant tout le projet, tout sera mis en œuvre afin de ne pas générer de stress chez les animaux, en leur fournissant des conditions d'hébergement adaptées à leur espèce (notamment avec des blocs à ronger et du matériel de nidification). Toutes les manipulations et les soins quotidiens seront réalisés par du personnel qualifié.

Le principal bénéfice attendu du projet est le développement de nouvelles voies de traitement et de prévention de la survenue d'infections humaines liées à ces pathogènes.

1636- Le cisplatine est couramment utilisé au cours des chimiothérapies néo-adjuvantes ou adjuvantes chez les patients atteints de tumeurs solides variées telles que les cancers de la tête et du cou, du poumon, de l'ovaire, de la prostate, du colon ou encore les cancers issus de cellules germinales. Alors que le traitement par le cisplatine s'avère efficace chez 80% des patients atteints d'un cancer testiculaire à cellules germinales, dans de nombreux autres types de cancers, en dépit de réponses initiales prometteuses, le bénéfice thérapeutique est rapidement limité par le développement d'une résistance des cellules cancéreuses à cet agent. Un ensemble de données récentes suggère que l'oncogenèse et la progression tumorale (y compris le développement d'une chimiorésistance) sont intimement associées aux altérations du métabolisme cellulaire. Récemment, notre équipe a mis en évidence des altérations métaboliques responsables de la résistance au cisplatine dans de nombreux cancers d'origines tissulaires variés. Par ailleurs, nous avons constaté *in vitro* que les cellules cancéreuses résistantes au cisplatine étaient particulièrement sensibles à la restriction calorique. Ce défaut du métabolisme énergétique pourrait être exploité pour lutter contre les cancers résistants au cisplatine par une approche physiologique visant à limiter l'apport calorique. Le but de ce projet est de valider l'effet de la restriction calorique *in vivo* sur des tumeurs humaines.

Nous avons montré *in vitro* que les cellules cancéreuses résistantes au cisplatine peuvent être tuées spécifiquement par des stratégies de restriction calorique. Afin de pouvoir envisager une approche thérapeutique chez l'homme, nous devons réaliser chez l'animal des xénogreffes de tumeurs humaines résistantes ou non au cisplatine afin de tester l'effet anti-tumoral d'une molécule et de la privation nutritionnelle (réduction de la taille des tumeurs et amélioration de la survie des souris) sur un organisme entier.

Pour cela, nous effectuerons des expériences de xénogreffes de cancers humains de poumon résistants au cisplatine chez des souris immuno-déficientes qui seront soumises à des manipulations expérimentales bien tolérées par l'animal visant à perturber spécifiquement le métabolisme des cellules cancéreuses afin de réduire la croissance tumorale. Au total, 360 souris seront utilisées. Cette estimation du nombre est minimale et fondée sur des données existantes, sur lesquelles nous avons inféré un modèle de croissance exponentielle (suivi longitudinal, linéaire sur le log₁₀ des tailles de tumeur et t-tests à des temps donnés).

Nous avons choisis les agents/conditions qui se sont révélé(e)s les plus efficaces *in vitro* et qui sont connus pour leur bonne tolérance chez la souris selon la littérature. Les animaux seront examinés quotidiennement pour prévenir les effets indésirables pouvant être liés à l'expérimentation (i.e. stress, perte de poids, souffrance, taille tumorale >1.5 cm³). Les effets bénéfiques escomptés sont une réduction de la croissance tumorale et une augmentation de la survie des souris significatives permettant d'envisager une nouvelle approche thérapeutique des cancers résistants au cisplatine. Nous prévoyons que l'accomplissement de ce projet fournira des connaissances sur les caractéristiques métaboliques des cancers résistants au cisplatine pour la mise en place de stratégies thérapeutiques ciblées.

1637- L'acide hyaluronique se trouve dans de nombreuses parties de l'organisme et notamment dans le liquide synovial des articulations. Il permet à l'articulation de résister au poids, d'absorber les chocs et de faciliter le mouvement. Il joue également un rôle anti-inflammatoire au niveau de l'articulation. Il participe au maintien du cartilage en inhibant certaines enzymes de destruction du cartilage et stimulant la régulation entre destruction et réparation du cartilage. Enfin, l'acide hyaluronique permet de protéger les récepteurs localisés dans la membrane synoviale (et de la capsule), prévenant ainsi l'apparition de la douleur.

L'infiltration d'acide hyaluronique, aussi appelée viscosupplémentation, a pour but de diminuer la douleur articulaire et d'améliorer le fonctionnement de l'articulation dans le cas de certaines affections articulaires.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de la viscosupplémentation suite à une rupture de ligament croisé antérieur.

Situé au centre du genou, le ligament croisé antérieur (LCA) s'oppose au déplacement vers l'avant ainsi qu'à une rotation interne excessive du tibia par rapport au fémur.

En cas de torsion violente du genou, le LCA peut se rompre ; et une fois déchiré il ne cicatrise pas. Si sa rupture n'empêche pas la reprise normale des activités de la vie courante, elle peut entraîner en revanche une instabilité du genou dans la pratique des sports. La rupture du LCA est non seulement la blessure ligamentaire la plus courante du genou, mais aussi la blessure du genou nécessitant le plus couramment un traitement clinique.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable le comportement de produits injectés dans un organisme entier vivant. Ce comportement dépend de très nombreux facteurs tels que la zone d'injection, les tissus environnants, l'activité de l'animal...

Les produits seront donc injectés en intra-articulaire chez des lapins sur lesquels aura été réalisée une rupture du ligament croisé antérieur d'un des deux genoux.

Le lapin est l'espèce couramment utilisée pour modéliser une rupture du ligament croisé.

En effet, l'anatomie du genou du lapin est proche de celle de l'homme et sa taille facilite les analyses histologiques et d'imagerie par rapport à des plus petites espèces. De plus, il s'agit d'un animal couramment employé en expérimentation animale, permettant ainsi d'une part de gérer plus facilement son bien-être au cours de l'étude et d'autre part de travailler sur des lots homogènes (âge et sexe fixés).

Un nombre minimal de 8 animaux par groupe sera utilisé afin de pouvoir réaliser des analyses statistiques.

Environ 400 lapins seront utilisés par an (correspondant à 5 études de 80 lapins par an), soit un total de 2000 lapins maximum en 5 ans.

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long des études.

Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites et d'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 de mettre en place les traitements adaptés le plus rapidement possible.

Le stress des animaux sera limité par le respect d'une période d'acclimatation d'au moins trois semaines avant le début de l'étude et en conservant les groupes dans le cas d'un hébergement collectif.

Les gestes techniques tels que la chirurgie et les injections de traitement seront effectués sous anesthésie afin d'éviter toute souffrance de l'animal.

Après la chirurgie, un suivi post-opératoire sera effectué sur chaque animal en vérifiant son état de bien-être et de santé, et en lui administrant des traitements ou soins locaux adaptés (antibiotiques pour empêcher une infection de la zone opérée, antalgique pour supprimer la douleur liée à la chirurgie,...)

1638- Ce projet vise à comprendre les mécanismes qui président à la construction du cerveau au cours du développement de l'embryon, afin d'identifier l'origine d'anomalies cérébrales observées dans certaines maladies humaines dites « neuro-développementales » comme certaines ciliopathies ou la maladie de Kallmann. Le modèle Danio (poisson-zèbre) que nous utilisons dans ce projet a des intérêts scientifiques et techniques uniques : transparence des embryons, développement externe, possibilité de produire des animaux transgéniques et mutants par ingénierie du génome.

Le développement externe des embryons nous permet de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés. Pour l'ensemble du projet, nous utiliserons 2100 animaux. Les conditions d'hébergement des animaux sont très précises afin de préserver le bien-être animal et d'enrichir son environnement, et les expérimentations sont limitées au minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (raffinement). Dès que possible nous utilisons des modèles cellulaires pour remplacer l'expérimentation animale, qui reste essentielle afin d'identifier, sur un organisme vertébré entier, les processus de développement d'un organe aussi complexe que le cerveau.

1639- L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre de prestations contractuelles pour le compte d'un client qui développe des formules alimentaires lactées hydrolysées pour nourrisson pour lesquelles il souhaite obtenir des allégations santé relatives à la « réduction du risque d'allergie aux protéines de lait ». Parmi les contraintes réglementaires associées à ces allégations santé, la Directive Européenne 2006/141/CE fixe, dans son ANNEXE 4, les conditions autorisant ce type d'allégation santé, et notamment le fait d'être en mesure de démontrer que « les préparations pour nourrissons administrées par voie orale ne doivent pas provoquer de réactions de sensibilisation chez les animaux auxquels les protéines intactes qui sont à la base de la préparation pour nourrissons ont été administrées » (<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32006L0141>). Ainsi, dans le cadre de demandes de cette allégation santé, et afin de tester la sécurité des formules hydrolysées à base de lait de vache avant les premières études chez l'humain, il est inévitable de mesurer, chez l'animal, leur allergénicité sur un modèle sensibilisé avec les protéines intactes natives, ainsi que leur capacité résiduelle d'induction d'anticorps spécifiques envers ces mêmes protéines.

Dans ce contexte réglementaire, le principal objectif de la présente étude est de développer et de valider un modèle à façon d'allergie alimentaire provoquée par des protéines de lait de vache chez la souris, afin d'être en mesure d'évaluer par la suite la propriété hypoallergénique de formules lactées en développement par la société cliente. Le modèle mis au point doit permettre de mesurer :

1) la capacité réduite de provocation d'un phénomène allergique par les formules à tester chez des souris préalablement sensibilisées à des protéines de lait intactes.

2) la sensibilisation résiduelle éventuelle que pourrait provoquer l'ingestion de ces mêmes formules.

En tant que programme de recherche global visant au développement d'un modèle animal à façon, la présente étude sera conduite sur la base de séries expérimentales répétées, visant l'obtention d'un modèle reproductible et l'identification de biomarqueurs fiables.

Les séries expérimentales seront basées sur un paradigme expérimental de 5 semaines durant lesquelles les animaux recevront un régime dépourvu de protéines de lait et comportant deux procédures majeures :

- Procédure de sensibilisation: Une administration orale hebdomadaire pendant 4 semaines d'une protéine de lait de référence ou d'une formule lactée.

- Test de provocation : Réalisée une semaine après la dernière procédure de sensibilisation, cette procédure se décompose en deux étapes : Une injection intradermique (patte postérieure) d'une formule lactée (lorsque la sensibilisation aura été réalisée par la protéine de référence : test de la capacité de provocation de la formule lactée) ou d'une protéine intacte de référence (lorsque la sensibilisation aura été réalisée par la formule lactée : test de la sensibilisation résiduelle de la formule lactée), suivie d'une période d'observation des animaux permettant une évaluation des symptômes allergiques (œdème cutané, température corporelle, réaction anaphylactique). Après 48h, une administration orale des mêmes composés sera réalisée, suivie d'un prélèvement sanguin.

Dans le cadre du développement du modèle, il est prévu de tester 4 protéines intactes de références (à deux doses) ainsi que 4 formules lactées (à deux doses, et selon 3 formes : poudre, liquide et épaissie) et ceci pour les deux conditions expérimentales (sensibilisation par la protéine de référence et test de provocation par la formule lactée d'une part, et sensibilisation par la formule lactée et test de provocation par la protéine de référence d'autre part). Compte tenu du grand nombre de combinaisons que le projet implique, l'ensemble du développement nécessitera un total maximum de 296 groupes de 8 animaux, soit 2368 souris sur 2 ans.

Le projet est basé sur des procédures expérimentales en elles-mêmes peu invasives, mais les réactions allergiques induites peuvent conduire jusqu'au choc anaphylactique lors des phases de provocation réalisées en fin de procédure expérimentale, l'induction de ce dernier étant un des paramètres critiques à mesurer au cours de l'étude. L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici du fait des contraintes réglementaires exposées au début du présent paragraphe et du fait qu'il n'existe, à ce jour, aucune méthode de substitution efficace n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude du caractère hypoallergénique d'une formulation destinée à l'humain, tout particulièrement lorsque l'allergie en question est d'origine alimentaire.

1640- La grande toxicité et la relative facilité d'obtention de la ricine font de cette toxine un composant majeur de la menace bioterroriste. Le diagnostic d'une intoxication à la ricine doit être réalisé très rapidement et avec certitude afin de pouvoir mettre en œuvre tous les moyens disponibles pour traiter les patients atteints. Un outil de détection rapide de l'intoxication à la ricine par inhalation a été développé avec succès chez le rongeur. Cet outil doit maintenant être validé dans une espèce proche de l'Homme.

Le primate non humain (PNH) a été choisi afin d'avoir, d'une part, un modèle d'exposition du tractus respiratoire bien maîtrisé car anatomiquement comparable à celui l'homme et, d'autre part, une réponse biologique et clinique quantifiable à l'aide d'outils transposables immédiatement chez l'Homme.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 6 primates non humains nés et élevés en captivité et provenant d'élevages agréés. En application de la règle des 3R, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les mêmes animaux serviront de contrôle en recevant, au préalable, une exposition avec un placebo et le nombre d'animaux par groupe a été réduit à un minimum nécessaire permettant une analyse statistique (3 animaux par groupe). Les méthodes expérimentales ont été conçues pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : les interventions (prélèvements de sang, intoxication expérimentale) seront faites sous anesthésie générale, et les volumes de sang prélevés seront réduits au minimum pour obtenir des résultats fiables. Les animaux seront hébergés en groupe avant intoxication et en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales pendant la durée des signes cliniques après exposition à la toxine (maximum 2 semaines). Des critères d'arrêt basés sur l'observation de signes cliniques d'intoxication sont prévus afin de prendre en compte les effets liés à l'intoxication. Dans ce cas, le vétérinaire en charge de l'installation sera sollicité afin de prescrire un traitement approprié ou de décider d'une euthanasie. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure de « bien-être animal » de l'établissement.

1641- Le but du projet est de mettre en place différents protocoles sur un nouvel équipement de mesure de calorimétrie indirecte. La dépense énergétique sera évaluée dans les conditions basales ainsi que dans des conditions de challenge telles que l'exercice volontaire sur roue d'activité, apport alimentaire régulé, régime hypercalorique, exposition au froid. Dans les dernières décennies l'obésité a considérablement augmenté dans les pays industrialisés et est responsable de nombreuses pathologies (diabète, hypertension, atteintes vasculaires...). L'homeostasie énergétique est une composante importante de cette affection, l'augmentation de l'apport énergétique et/ou la diminution de la dépense énergétique sont impliquées dans son développement. L'utilisation de souris mutantes permettra d'étudier les gènes impliqués dans le contrôle de la dépense énergétique et de mieux comprendre les mécanismes. Cela également dans le but de trouver de nouveaux traitements.

L'utilisation de l'animal est indispensable car les interactions entre les différents organes impliqués dans le métabolisme ne peuvent être remplacées par des techniques in vitro. De plus, la souris étant l'espèce dans laquelle les mutations génétiques

sont les mieux maîtrisées à l'heure actuelle, elle est le modèle de choix pour l'étude des gènes impliqués dans la dépense énergétique.

Afin de valider les protocoles et de tester des modèles d'intérêt des souris sauvages C57BL/6N ainsi que 12 modèles de souris génétiquement modifiées (gènes connus, impliqués dans la dépense énergétique ou gènes d'intérêt identifiés au cours de l'exploration systématique dans le cadre du consortium international (IMPC),) seront utilisées. Notre expérience a montré qu'en vue de la variabilité des mesures un nombre minimum de 9 souris par groupe est nécessaire pour une analyse statistique des données. Etant donné que la plupart des expérimentations génèrent un stress faible et pas de douleur, l'ensemble des expérimentations sera conduit sur 2 cohortes d'animaux avec des périodes de récupération variables entre chaque protocole. Le nombre total de souris sera de 288 (9 souris / groupe, mâles et femelles).

Le nouvel équipement qui sera utilisé est constitué de cages de mesure de dépense énergétique par calorimétrie indirecte (mesure de la consommation d'oxygène et de la production de dioxyde de carbone). Afin de minimiser les stress des animaux, ces cages sont identiques aux cages d'hébergement. Dans les conditions de mesures habituelles mis à part l'isolement de l'animal (1 animal / cage) la souris n'est soumise à aucun stress particulier et évolue librement dans son environnement habituel. Au cours des tests d'exposition à différentes températures les souris seront soumises à un stress, pour cela la durée d'exposition ne dépassera pas 24h et une période de repos/récupération de 1 semaine sera prévue entre chaque expérimentation.

Nous n'attendons pas de symptômes dommageables chez ces souris. Cependant, 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 général des animaux.

1642- 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 chercheurs.

Le but de ce projet est d'intégrer à la biothèque des prélèvements de lait ainsi que les biopsie de peau ou de muscles provenant de 398 PNH.

Ces prélèvements biologiques sont réalisés selon les bonnes pratiques de laboratoire, sans effet délétère pour l'animal. Tous les prélèvements sont réalisés dans le respect du bien-être animal (Raffinement) en s'appuyant sur l'anesthésie et l'analgésie si nécessaire.

1643- Le bisphénol A (BPA) a largement été décrit comme nocif pour les êtres vivants. Cette molécule, reconnue comme étant un perturbateur endocrinien, agit sur l'équilibre hormonal et possède des propriétés oestrogéniques (hormone féminine). Les effets du BPA sont encore mal connus et pourraient être de plusieurs ordres : impact sur la fonction de reproduction, sur le développement cérébrale, ou rôle dans la carcinogenèse... Depuis 50 ans, le BPA est massivement utilisé dans l'industrie du plastique, et l'exposition des individus à cette molécule a été confirmée par des concentrations très élevées de celle-ci dans l'organisme d'une large majorité de la population, quel que soit l'âge, et notamment chez les enfants. De plus, des dosages de BPA dans les eaux de robinet (eaux de boisson) ont révélés des taux importants de BPA et de ses composés chlorés. Les composés chlorés du BPA se forment par ajout de molécule de chlore, produit chimique utilisé dans les stations d'épuration, créant ainsi des molécules monochlorées, dichlorées ou trichlorées (une, deux ou trois molécules de chlore par molécule de BPA, respectivement).

Les études, publiées jusqu'à maintenant, concernent le BPA, mais rien n'a encore été réalisé concernant les effets des composés chlorés, connus pour avoir des activités oestrogéniques plus importantes que le BPA lui-même.

L'étude des effets de ces composés sur la santé humaine nous semble donc très importante. Basés sur des dosages de BPA et des composés chlorés dans les eaux de boisson, nous nous proposons d'étudier les effets de ces molécules sur un modèle de souris.

Pour ce faire, ce projet prendra en compte la règle des 3R (article R214-105 du Code rural et de la pêche maritime). En effet, ces études sur les souris ne peuvent pas être remplacées par un modèle cellulaire ou inanimé, modèle ne permettant pas de recueillir toutes les informations physiologiques d'un organisme vivant (fonction de reproduction, développement cérébrale ou cancers à long terme). Le nombre d'animaux utilisé a été réduit au maximum tout en permettant des analyses statistiques sur les résultats des manipulations. Ce nombre est estimé à 2275 individus pour nous permettre de tester les différents composés chlorés sur des souris mâles ou femelles. Enfin les conditions d'élevage des animaux utilisés (hébergement, soins, niveau de stress et/ou de douleur) ont été raffinées afin de garantir un état de stress et d'angoisse le plus faible possible.

L'étude consiste à exposer des souris à de faibles concentrations de BPA et/ou de ses composés chlorés durant le développement embryonnaire et pendant la lactation. L'exposition sera réalisée par injection quotidiennement des mères gravides de polluants durant la gestation puis la lactation permettant ainsi une exposition, d'une part, des fœtus via le passage placentaire et, d'autre part, des nouveau-nés via le passage dans le lait.

Enfin, le but final de cette étude est de déterminer les effets à court, moyen et long terme d'une exposition au BPA et/ou de ses composés chlorés sur l'organisme, pris sous forme individuel ou en cocktail.

1644- Le but du projet est de déterminer l'impact de la délétion d'un gène sur la mise en place des mécanismes de contrôle de la glycémie. Ce projet sera réalisé en utilisant des souris génétiquement modifiées, afin de mettre en évidence l'impact de la suppression du gène, par comparaison avec des animaux contrôles non modifiés. Ce projet visant à étudier un mécanisme physiologique complet, l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut actuellement se substituer à l'étude du gène cible dans son environnement et ses interactions au sein de l'organisme.

Pour procéder à cette étude, des souris mutantes n'exprimant plus le gène d'intérêt sont générées et étudiées en comparaison avec des animaux contrôles. Quatre cohortes de 54 animaux (9 animaux par sexe et par génotype (contrôle, hétérozygote et homozygote)) seront utilisés afin d'obtenir une puissance statistique suffisante à l'étude. Ces animaux seront soumis à un protocole comportant différents tests permettant de caractériser les capacités d'homéostasie glucidique, à différents âges. Deux cohortes seront utilisées avec une nourriture d'hébergement habituelle, alors que les deux autres cohortes seront placées sous nourriture enrichie en graisse et sucre afin de mettre en évidence l'implication du gène dans ces deux conditions. Tous les tests utilisés font partie des tests de phénotypage classiquement utilisés dans la recherche préclinique et décrits dans la littérature. Ces batteries de tests permettent de mettre en place un corpus de données visant à déterminer l'impact de cette délétion à plusieurs stades du développement des animaux.

Ce protocole permet ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés afin de satisfaire les exigences de réduction.

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 souris utilisées sont déjà en cours d'élevage et aucun phénotype léthal ou majeur n'a été observé sur ces lignées.

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

Ce projet se tiendra sur un nombre total d'animaux d'environ 216 souris.

Ces lignées n'ont aucun phénotype dommageable.

1645- Des gènes porteurs de résistance aux antibiotiques (ARG) peuvent apparaître dans des bactéries, pathogènes ou non, hébergées chez l'homme ou l'animal traité par antibiotiques. Le développement de bactéries pathogènes résistantes à de multiples antibiotiques représente un problème important de santé publique. Des mesures ont été prises afin de réduire l'utilisation des antibiotiques en élevage : le plan Ecoantibio 2017 prévoit de réduire de 25% en 5 ans l'usage des antibiotiques en élevage et médecine vétérinaire. Les filières porcines et cunicoles ont pris l'initiative de réduire l'utilisation des antibiotiques et de mettre en place des dispositifs de bon usage des traitements médicamenteux pour réduire l'antibiorésistance.

Ces mesures pourraient être complétées par des mesures visant à limiter la persistance des ARG observée malgré l'arrêt ou la réduction de l'utilisation de certains antibiotiques. La composition du microbiote intestinal, qui s'implante précocement chez le porcelet, dépend de son environnement. Les porcelets, ayant un comportement naturel de fouissage, ingèrent naturellement des fèces maternelles présentes dans leur environnement. Ce comportement contribue à l'inoculation de bactéries intestinales maternelles pouvant être porteuses d'ARG.

L'objectif du projet est de développer une approche permettant de limiter la transmission des ARG de la mère au jeune en élevage porcin, en utilisant le comportement d'investigation naturel du porcelet. Cette approche ne peut être mise en œuvre que sur l'animal vivant (Remplacement). L'hypothèse est que l'inoculation de communautés microbiennes dépourvues d'ARG peut empêcher l'implantation d'autres communautés porteuses d'ARG.

Deux essais seront réalisés. Un premier essai sera conduit en conditions contrôlées sur 16 porcelets séparés de leur mère à 2 semaines d'âge et nourris artificiellement avec une formule lactée pour porcelets pendant 2 semaines. Les porcelets seront logés dans des cages individuelles. A cet âge, les porcelets apprennent rapidement à boire le lait tiédi qui est distribué automatiquement dans une auge. Dès la séparation de la mère, une suspension bactérienne (2 ml) dont le statut en ARG est connu sera administrée par voie orale. Cette procédure n'induit pas de douleur à l'animal. Le second essai sera conduit sur 16 portées de porcelets non séparés de leur mère. Des fèces dont le statut en ARG est connu seront dispersées dans l'environnement pour que les porcelets les ingèrent naturellement. Les porcelets seront sevrés à l'âge de 4 semaines. Pour les 2 essais, les porcelets seront pesés régulièrement afin de contrôler leur croissance. Une prise de sang sera effectuée sur l'ensemble des porcelets (16) de l'essai 1 et sur 5 porcelets par portée (80) de l'essai 2, à l'âge de 4 semaines. Ces prises de sang permettront la mesure de paramètres en lien avec la santé des porcelets (Raffinement). Des collectes de fèces seront effectuées. Seuls les 16 porcelets de l'essai 1 seront euthanasiés à la fin de l'essai. L'ensemble des procédures sera effectué par du personnel expérimenté et les porcelets seront observés tous les jours afin de détecter précocement des signes de souffrance (Raffinement). L'essai 1 sera réalisé sur un nombre limité de porcelets dans des conditions contrôlées afin d'établir la preuve de concept. L'essai 2 ne sera réalisé que si l'essai 1 permet d'établir la possibilité de modulation du portage des ARG. Nous estimons que 20 porcelets par groupe expérimental seront suffisants pour évaluer l'efficacité du transfert et à établir la variabilité de ce transfert (Réduction).

1646- La Rétinopathie Pigmentaire, maladie touchant environ une personne sur 4 000 dans les pays occidentaux, 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.

Les premières études menées par l'équipe ont montré que le RdCVF, l'un des produits du gène *Nxn1*, est sécrété par les photorecepteurs à bâtonnet et médie une activité protectrice sur les photorecepteurs à cône en activant l'entrée du glucose.

Le second produit du gène *Nxn1*, le RdCVFL (thiorédoxine), jouerait un rôle protecteur sur les photorécepteurs à bâtonnet des effets photo-oxydatifs de la lumière. L'équipe avait aussi montré qu'il existe une interaction entre RdCVFL avec la protéine TAU (qui a un rôle dans l'assemblage et la stabilisation des microtubules). Cette interaction inhiberait la phosphorylation de TAU dans la rétine, la protégeant ainsi des atteintes du stress oxydatif.

Nous nous proposons ici d'approfondir le rôle de cette voie et d'étudier l'importance de TAU dans les processus qui conduisent à la mort des photorécepteurs à bâtonnet. Il est intéressant de préciser que c'est la protéine TAU qui est impliquée dans les processus neurodégénératif de la maladie d'Alzheimer.

Dans un premier temps, nous comparerons la fonctionnalité et l'histologie de la rétine au cours du vieillissement (3,6, et 12 mois) de souris déficientes en RdCVF avec des souris déficientes à la fois en RdCVF et TAU. Un total de 24 animaux sera nécessaire pour cette étude.

Dans la seconde partie de ce projet, nous analyserons la fonctionnalité et l'histologie de la rétine de souris rd10 (modèle murin de rétinopathie pigmentaire) chez lesquelles du RdCVF sera injecté via des outils permettant de cibler spécifiquement les photorécepteurs à bâtonnet. La fonctionnalité et l'épaisseur de la rétine seront analysées à 3, 4, 5 et 6 semaines. Des études histologiques et biochimiques sur les rétines seront ensuite réalisées. Au total 24 animaux seront nécessaires pour cette partie.

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 ».

1647- La théorie de l'esprit est définie comme la capacité individuelle à attribuer aux autres des états mentaux, comme l'intention, le désir ou la croyance. On distingue trois grands aspects au sein de cette théorie: l'attribution de perception attribution d'intention (il peut comprendre le but d'un autre individu, en le voyant agir) et l'attribution de savoir et/ou de croyance (le sujet agit en fonction du savoir ou de l'ignorance de ses congénères).

Cette capacité à attribuer des états mentaux à l'autre est probablement liée à l'empathie, qui est la capacité à identifier les états émotionnels de l'autre et la motivation d'y remédier. On distingue plusieurs niveaux d'empathie: Le niveau le plus simple est la contagion émotionnelle (la transmission rapide d'un état émotionnel d'un individu à l'autre). Vient ensuite l'implication compatissante avec l'émergence de l'évaluation de la situation de l'autre sans pour autant nécessairement en comprendre les causes (ex : consolation). Et enfin, vient le niveau empathique le plus complexe: le point de vue empathique qui correspond à la capacité de se mettre à la place de l'autre et d'agir spécifiquement pour lui venir en aide via l'aide ciblée.

Plusieurs études ont été menées à ce propos sur les primates (y compris chez les humains adultes ou enfants) mais très peu d'entre elles se sont concentrées sur les oiseaux alors que certaines espèces telles que les psittacidés (la famille des perroquets) se révèlent être de très bonnes candidates. Ces animaux possèdent en effet un gros cerveau, vivent longtemps, et montrent des capacités cognitives importantes. Qui plus est, ces oiseaux forment des couples fidèles à vie, au sein desquels naissent des coopérations solides et durables, en plus de vivre au sein de sociétés complexes. Le rapport à l'autre et la capacité à identifier ses états mentaux et émotionnels se révèlent donc primordial pour leur survie.

L'objectif de cette thèse est d'étudier les liens qui existent entre théorie de l'esprit et empathie chez les psittacidés, qui est la famille d'oiseaux présentant la cognition la plus complexe. Etudier ces oiseaux dans le cadre de cette thématique projette un nouvel éclairage et de nouvelles clés pour tenter de comprendre notre société et les origines de la compréhension de « l'autre » et du comportement de coopération.

12 perruches calopsittes *Nymphicus hollandicus* (6 mâles et 6 femelles) seront testées au cours de ce projet.

Pour ce qui est de l'application des 3 R au sein de notre projet : le recours à l'animal vivant est indispensable pour répondre à nos questions mais peu d'oiseaux (le minimum pour pouvoir obtenir des résultats généralisables) sont utilisés au cours de cette thèse et les expériences ne sont pas invasives. Certaines peuvent déclencher un stress chez l'animal mais qui est extrêmement limité, c'est-à-dire, que d'une part, la phase de stress est très courte, et d'autre part, si l'animal montre des signes de stress trop importants, l'expérience est stoppée immédiatement. Les situations de stress auxquelles les animaux seront exposés seront les suivantes : séparation du groupe social (uniquement le temps de l'expérience, c'est-à-dire, pas plus de 2h), contention et privation alimentaire (n'excédant pas 3h). Aucune injection, ou aucune douleur physique ne sera provoquée chez les sujets expérimentaux.

1648- La résistance aux insecticides chez les moustiques vecteurs est une préoccupation grandissante. C'est pourquoi la sensibilité des moustiques doit être surveillée périodiquement pour s'assurer de la bonne efficacité des insecticides utilisés en routine. Ceci permet d'anticiper, si besoin, le développement de nouvelles molécules alternatives.

Nous prévoyons d'évaluer la sensibilité d'*Aedes albopictus* au Vectra 3D® (dinotéfurane, pyriproxifène et perméthrine) (Ceva, Libourne, France), un antiparasitaire externe à usage vétérinaire.

Pour ce faire, nous allons mener une étude comparative de type traités/non traités, dans laquelle deux lots de souris seront constitués. Toutes les souris seront anesthésiées puis exposées aux moustiques femelles, pendant une heure. Les souris du lot "traité" seront auparavant traitées par le Vectra 3D®. La douleur engendrée par les piqueuses de moustiques pendant l'exposition sera prise en charge par injection intrapéritonéale d'un cocktail à base d'analgésique et d'anesthésique. Pour le confort des animaux un enrichissement sera mis en place à l'aide des dômes. Ainsi, pour mener à bien ce projet, on aura besoin de 20 souris, souche BALB/c.

1649- La transplantation pulmonaire est la proposition thérapeutique de dernier recours chez les sujets porteurs d'insuffisance respiratoire évoluée. La complication principale de cette procédure est la survenue d'une dysfonction chronique du greffon (CLAD pour chronic lung allograft dysfunction). Notre équipe a mis en place la plus importante cohorte multicentrique de transplantés pulmonaires au monde. Grâce cette cohorte, nous recherchons des biomarqueurs précoces prédictifs du rejet de greffe. Néanmoins, aucun modèle de souris n'est disponible pour étudier le mode d'action de ces molécules et surtout de les tester comme cibles thérapeutiques. Les modèles développés jusqu'à présent l'ont été soit sur des animaux pour lesquels les outils de génétique moléculaire sont insuffisants (rats, porcs), soit sont des greffes hétérotopiques de trachée (greffe sous-cutanée) peu pertinentes car ne rétablissant ni la continuité bronchique et donc l'exposition à l'air, à l'environnement et au flux respiratoire, ni la fonction pulmonaire d'échanges gazeux. Ainsi l'utilisation de souris est nécessaire. Au cours de cette étude, le principe des 3R sera appliqué de façon à réduire, remplacer et raffiner l'utilisation de l'expérimentation animale. Ainsi, l'expérimentation animale est un élément essentiel de ce projet afin de modéliser efficacement la réponse physiologique globale du système. Le modèle animal utilisé sera constitué de souris C57Black/6 mâles et de souris C57Black/10 mâles. Soit un total de 500 souris C57Black. Les animaux seront logés dans un environnement avec une humidité relative, une température contrôlée et bénéficieront d'un enrichissement.

Les pathologies cardio-vasculaires représentent un enjeu majeur de santé publique dans les pays développés. Le nombre de décès, suite à des accidents vasculaires aigus, imputables à ces maladies, est estimé à 30% de la mortalité mondiale. Il est donc d'un intérêt clinique majeur d'avoir une méthode d'imagerie non-invasive capable de caractériser de manière exhaustive une pathologie vasculaire, par exemple l'athérosclérose, afin de prédire l'évolution d'une pathologie vasculaire vers un événement aigu.

Le grand potentiel de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) dans la caractérisation des pathologies vasculaires et dans la définition de biomarqueurs d'imagerie liées au risque accru de survenu d'un accident aigu a été démontré dans nombreuses études. Cependant, l'IRM seule ne permet pas d'obtenir une vue exhaustive de la pathologie vasculaire. Le développement technologique très récent de l'imagerie hybride IRM/TEP (Tomographie par Emission de Positons) a le potentiel d'offrir des informations spécifiques sur la physiologie de la paroi vasculaire, informations impossible à obtenir en IRM seule. Ce projet vise à mettre en œuvre des stratégies d'acquisition d'images vasculaires sur un nouveau système d'imagerie hybride IRM/TEP, unique en France actuellement.

Compte tenu du fait que la difficulté de l'imagerie vasculaire in vivo est principalement l'écoulement sanguin, la mise en œuvre et l'optimisation des stratégies d'imagerie doit impérativement se faire chez l'animal. L'écoulement sanguin au moment de l'acquisition doit être soit mis en évidence (techniques d'angiographie sang blanc) soit annulé (techniques sang noir). Par la suite, les stratégies mises au point dans ce projet pourront être utilisées dans des études réalisées chez des modèles animaux d'athérosclérose afin d'obtenir une meilleure compréhension de la pathologie. De plus, la taille de l'aorte abdominale de lapin est très proche de la taille des artères carotides humaines ce qui permettra le transfert chez l'homme des stratégies d'imagerie mises au point dans cette étude pilote.

Il s'agit donc d'une étude pilote d'imagerie vasculaire, qui sera réalisée sur une durée de 3 mois sur 3 lapins. Chaque animal sera examiné trois fois, à raison d'un examen par mois, pour une durée de 1h1/2 sous anesthésie gazeuse. L'animal sera monitoré au cours de la session d'imagerie.

A la fin de l'étude les animaux seront euthanasiés par injection intraveineuse d'un agent euthanasiant vétérinaire.

Des échantillons de l'aorte abdominale seront prélevés pour une analyse histologique qui permettra de valider l'imagerie IRM/TEP ; par la mise en évidence des composants de la paroi artérielle comme les fibres d'élastine.

1650- La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après l'étude multicentrique STAR*D, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement. En outre, les patients rétablis à la suite d'un premier épisode dépressif présentent un risque de récurrence dans les 6 mois évalué à 50% en cas d'arrêt du traitement et il a été montré qu'en l'absence de traitement 15% des patients succombent à la suite d'un suicide et qu'entre 60% et 80% des suicides (entre 10000 et 15000 par an en France) sont le fait d'individus fortement dépressifs. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements et la compréhension des mécanismes physiopathogéniques et étiopathologiques sous-jacents. Certains de ces mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant l'utilisation de techniques d'immunohistochimie par exemple. C'est le cas des études qui s'intéressent à la neurogenèse adulte, processus qu'il est très difficile de mesurer chez l'Homme, ce qui nécessite des travaux reposant sur des modèles précliniques. La pertinence d'un modèle animal à reproduire une pathologie humaine dépend de trois critères : sa validité prédictive (à savoir que les traitements efficaces en clinique doivent l'être dans le modèle), sa validité phénoménologique (la capacité du modèle à induire les symptômes de la pathologie) et sa validité théorique (la place du modèle par rapport au cadre théorique). Seul le développement de modèles animaux dans lesquels un état anormal est induit et maintenu pendant une période prolongée, durant laquelle une « thérapie » peut être administrée, peut fournir un outil pour répondre à ces questions. C'est la raison pour laquelle nos travaux se basent sur l'utilisation du modèle du stress chronique léger imprédictible (SCI). De façon intéressante, il s'agit du seul modèle pour lequel il existe une signature moléculaire commune entre la dépression

humaine et celle existant après stress chronique imprédictible chez la souris. Ce modèle de stress chronique imprédictible a également été validé pharmacologiquement, et semble le mieux adapté et le plus pertinent pour étudier la pathophysiologie de la dépression et la contribution de la neurogenèse.

Des études en Psychologie cognitive ont montré que les fonctions exécutives jouaient un rôle clef dans la dépression et des études en Neurosciences ont montré le rôle crucial de la neurogenèse adulte dans l'hippocampe adulte dans la rémission d'un état dépressif. Le but de cette étude est donc de tester si l'augmentation de la neurogenèse est suffisante à améliorer les fonctions exécutives dans un modèle de dépression.

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

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

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

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

Cette expérience s'intéresse à l'aptitude de la neurogenèse adulte à reverser les effets du SCI sur les fonctions exécutives. Pour cela, 240 souris réparties en 8 lots sont requises.

1651- Les maladies cardiovasculaires sont une des causes majeures de morbi-mortalité dans le monde. Parmi les nombreux facteurs de risque connus, les dyslipidémies (anomalies qualitative ou quantitative d'un ou de plusieurs lipides plasmatiques : cholestérol total et ses fractions, HDL-cholestérol et LDL-cholestérol, triglycérides) jouent un rôle prépondérant.

L'objectif de ce projet est de pouvoir identifier de nouvelles voies thérapeutiques et évaluer l'effet de molécules pharmacologiques innovantes visant à améliorer le métabolisme lipidique et les bénéfices attendus sur les complications cardiovasculaires sous-jacentes. Ces évaluations seront réalisées sur différents modèles de souris transgéniques. Par exemple, les souris triple KO FRG (FAH, Rag2, IL2 γ) avec foie humanisé est un modèle particulièrement adapté et translationnel pour l'étude de la synthèse et du catabolisme des lipoprotéines car il possède un métabolisme et un profil lipidique très proche de celui de l'homme. Les souris exprimant un ou plusieurs gènes humains (transgènes) d'intérêt cardio-métabolique sont aussi un modèle permettant d'approcher la physiopathologie cardiaque humaine

Le métabolisme des lipoprotéines est un processus complexe impliquant les fonctions hépatiques mais aussi les autres tissus utilisateurs des lipides (muscles, tissu adipeux...). L'évaluation du bénéfice d'un composé pharmacologique préalablement sélectionné « *in vitro* » et destiné au traitement des dyslipidémies et de leurs conséquences cardiovasculaires nécessite donc une approche « *in vivo* » intégrée et pertinente, permis par le recours à l'animal.

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

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

Le nombre maximal de souris utilisées dans le cadre de ce projet est d'au maximum 3200 souris sur 5 ans.

1652- Les maladies du système nerveux (Parkinson, Alzheimer, Huntington,) sont une préoccupation croissante en santé publique. De nouveaux outils diagnostiques associés à de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires pour améliorer la prise en charge des patients.

Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de contrecarrer l'évolution naturelle de la maladie d'Alzheimer (MA). La découverte d'un nouveau traitement (seuls 4 médicaments sont actuellement sur le marché) pourra être considérée comme une révolution, que ce soit en termes de nombre de patients (actuellement 26 millions de cas dans le monde et 65 millions en 2030 en l'absence de nouveaux traitements, 870 000 cas en France) qu'en termes humains (répercussions sur la santé des conjoints) et financiers pour le système de santé.

Nos projets consistent à caractériser l'efficacité thérapeutique de différentes stratégies innovantes contre la maladie d'Alzheimer. Nous utiliserons comme critères les améliorations cognitives et les modifications biochimiques et/ou histologiques résultants des traitements testés.

Nous avons d'ores et déjà mis en évidence que des injections intracérébrales d'un vecteur viral de type AAV (Adeno-associated Virus) codant pour la protéine CYP46A1 induisaient une amélioration des symptômes de la maladie dans un modèle murin de la pathologie. En effet, elle entraîne une réduction de l'inflammation ainsi qu'une amélioration des fonctions cognitives. Nous avons également pu confirmer l'effet bénéfique de cette stratégie dans un modèle murin transgénique. Ces résultats confirment que l'utilisation de vecteurs de thérapie génique, pourrait constituer une approche thérapeutique potentielle dans la maladie d'Alzheimer. D'autres approches utilisant des séquences géniques alternatives ou des traitements pharmacologiques seront également testées au cours de cette étude.

Le recours à l'animal est nécessaire car aucun milieu de culture ou système synthétique ne peut aujourd'hui reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau, et en particulier leurs interactions structurelles et fonctionnelles. Les 3000 rongeurs étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et ont été élevés en captivité dans des établissements reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement significatives.

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

1653- Les infections fongiques invasives sont une cause majeure de morbidité et de mortalité, avec plus de 800 000 décès par an dans le monde. Les espèces *Candida albicans* et *Candida glabrata* sont les pathogènes les plus souvent incriminés dans les infections fongiques à levures. Actuellement, seules quatre classes de médicaments sont disponibles pour traiter ces infections. Ces médicaments agissent en ciblant la paroi et la membrane fongiques, ou en inhibant la synthèse des acides nucléiques. Le nombre limité de traitements antifongiques, le coût élevé et la toxicité des médicaments disponibles, l'augmentation des souches résistantes et l'augmentation du nombre de patients à traiter rendent indispensables le développement de nouveaux agents thérapeutiques.

Ce projet consiste à étudier une nouvelle stratégie thérapeutique antifongique en se basant sur l'utilisation de composés anticancéreux qui ciblent une famille spécifique de régulateurs de l'expression des gènes: les protéines BET (Bromodomaine extraterminal). La découverte récente d'inhibiteurs de BET humaines a permis d'établir que ces protéines sont des nouvelles cibles thérapeutiques anti-cancéreuses. Les études préliminaires que nous avons réalisées sur des levures (*Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*) suggèrent que la protéine BET fongique, Bdf1, est différente des protéines BET humaines et peut constituer une nouvelle cible pour des médicaments antifongiques. En effet, l'inhibition de la fonction de cette protéine entraîne, dans des expérimentations sur des cultures de levures, une disparition des caractéristiques associées à la virulence (défaut de croissance, défaut de filamentation, sensibilité à différents stress) et une incapacité pour la levure à se développer et à se multiplier.

A ce stade, des expérimentations animales sont indispensables afin de confirmer la pertinence thérapeutique de l'inhibition des bromodomains de Bdf1 de *C. albicans* et *C. glabrata*. Les modèles cellulaires ne permettent pas d'analyser la réponse immunitaire associée à une infection. Le recours à des animaux vivants (modèle murin) est indispensable pour évaluer la diminution réelle de la virulence des levures après inhibition des protéines Bdf1.

Les animaux étudiés seront des rongeurs nés en captivité et provenant d'élevages reconnus et autorisés. Le nombre d'animaux nécessaire a été évalué à 180 grâce aux expériences décrites dans la littérature et a été réduit au maximum tout garantissant la significativité des résultats. Les animaux seront hébergés dans une structure adaptée, surveillés durant toute l'expérience afin de détecter tout signe d'inconfort. Des critères d'arrêt de l'expérience sont définis précisément et permettent d'éviter toute souffrance. Les protocoles d'anesthésie sont clairement établis

1654- La prise en charge des douleurs des patients est une préoccupation récurrente des médecins. Bien que des médicaments antidouleurs existent leurs actions présentent des limites et certaines douleurs sont résistantes aux traitements actuellement disponibles. Les difficultés de prise en charge proviennent surtout du fait qu'il n'y ait pas une douleur mais des douleurs dont les mécanismes sont différents. Les douleurs peuvent être divisées en 2 types : les douleurs nociceptives et les douleurs neuropathiques, bien que des formes mixtes soient également décrites.

Les douleurs nociceptives sont dues à une lésion ou à une inflammation d'une partie du corps sans atteinte des nerfs. En règle générale, les douleurs nociceptives ont une durée limitée car elles disparaissent une fois le tissu endommagé réparé. L'arthrite est une notable exception dans le sens où elle n'est pas limitée dans le temps (chronique).

Par contre les douleurs neuropathiques sont directement liées à l'atteinte et au dysfonctionnement des nerfs. Même si les lésions nerveuses peuvent avoir des origines diverses, bien souvent, l'inflammation des tissus joue un rôle important. Les douleurs neuropathiques sont souvent chroniques et pourraient persister même longtemps après une guérison apparente des tissus endommagés. Il a été rapporté qu'un composant neuropathique lié à l'altération et à la destruction des nerfs sensoriels existe dans le cas de l'arthrite chez l'homme et chez les animaux de laboratoire (*Yonsei Med J* 53(4):801-805, 2012), conduisant ainsi à considérer le traitement de la douleur neuropathique dans ce contexte.

Dans ce projet, il est question de tester de nouvelles molécules antidouleur afin d'améliorer la prise en charge des douleurs articulaires.

Dans ce but, nous observons l'effet de nouvelles molécules sur des rats auxquels une douleur de type articulaire est induite pharmacologiquement. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 12 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soin au animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. Nous favorisons une durée d'expérience la plus courte possible afin de ne pas maintenir des animaux présentant une douleur plus longtemps que nécessaire. De plus, nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permette de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle afin de ne pas multiplier les groupes. Ainsi 2 produits peuvent être testés en parallèle afin d'utiliser pour chacun les mêmes animaux de témoin ou de référence.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 5400 rat est envisagée. Ce nombre correspond à 15 études de 72 animaux par an.

1655- Grâce à ses nombreuses qualités organoleptiques et atouts économiques, le sandre *Sander lucioperca* pourrait constituer une voie stratégique de diversification de l'aquaculture continentale européenne. Mais le développement de son élevage est actuellement limité par une perturbation de la vitesse de croissance et une forte mortalité, notamment à la suite des manipulations d'élevage comme les manipulations nécessaires pour le tri des juvéniles et les variations dans la qualité de l'environnement physique comme la qualité de l'eau et de la lumière. La réponse au stress relative à ces procédures d'élevage et aux conditions environnementales pourrait donc être une des causes majeures limitant le développement de la productivité de cette espèce en conditions intensives d'élevage.

Malheureusement, les connaissances sur la biologie du stress sont limitées chez les poissons, plus particulièrement chez les espèces en cours de domestication comme le sandre. Le comportement du sandre face aux diverses procédures zootechniques n'est pas bien connu.

Cette étude vise à approfondir les connaissances relatives à l'impact de différentes pratiques en aquaculture intensive sur le bien-être des poissons. Plus spécifiquement, l'objet de ce projet est de déterminer les facteurs majeurs de stress en élevage intensif par une approche multifactorielle afin d'optimiser la vitesse de croissance et le bien-être du sandre. Cette recherche est menée dans le cadre d'un vaste projet européen, qui vise à améliorer les connaissances sur la biologie des espèces d'intérêt pour la diversification de l'aquaculture en Europe. Le protocole expérimental in vivo comprend 16 unités expérimentales et durera deux mois et demi. Au cours de cette période, divers organes seront prélevés en trois phases sur 272 juvéniles en vue d'évaluer les paramètres physiologiques et immunitaires. En accord avec la règle des 3R, 272 poissons est le nombre juste nécessaire et suffisant pour répondre à la question scientifique. Des juvéniles (2528) supplémentaires seront utilisés afin d'optimiser le bien-être des poissons (en phase avec la règle des 3R), car une faible densité est défavorable pour la croissance et le comportement des espèces grégaires comme le sandre. Ces individus supplémentaires seront gardés en vie à la fin de l'expérimentation.

1656- Un autovaccin vétérinaire est un vaccin préparé à partir de germes pathogènes isolés d'un sujet malade ou d'un animal sain du même élevage et destiné à être administré à cet animal malade ou aux animaux de cet élevage (Code de la santé publique, article L. 5141-2, 3°- art R.5141-141).

Les autovaccins répondent à l'un des axes énoncé dans le plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire publié fin novembre 2011 par le ministère de l'agriculture : « Développer les alternatives aux antibiotiques ». Ce plan doit conduire à une réduction de 25% de l'utilisation des antibiotiques en élevage à échéance de 5 ans. Les autovaccins répondent également à deux axes de progrès : le respect de l'environnement, par une progression vers moins de résidus d'antibiotiques dans les effluents d'élevage et le développement économique des filières animales, en permettant aux professionnels de poursuivre leurs efforts vers des productions de qualité, indemnes de résidus d'antibiotiques. Ils devraient donc a priori connaître un essor important dans les années futures d'autant plus si des solutions sont apportées pour améliorer leur innocuité et leur efficacité.

Cette technique utilisée depuis déjà de nombreuses années est souvent pratiquée de manière relativement empirique et très peu de travaux ont porté sur l'évaluation de l'innocuité des produits utilisés comme adjuvants, en particulier sur les aspects anatomopathologiques (morphologie des tissus et cellules) au site d'injection. En production porcine, la présence de lésion au niveau de l'échine liée à l'injection d'autovaccin n'est pas rare et engendre une souffrance des animaux ainsi blessés et des saisies notables à l'abattoir représentant un coût pour la filière porcine.

Les objectifs des deux études expérimentales proposées sont d'évaluer de façon rigoureuse l'innocuité clinique et lésionnelle, d'une part, de quatre adjuvants et, d'autre part, de quatre autovaccins sur espèce cible, le porc. Quatre adjuvants différents utilisés pour des autovaccins contre les infections à *Streptococcus suis* et *Haemophilus parasuis* seront étudiés. Soixante porcs EOPS âgés de 7 semaines d'âge seront utilisés. Les lots expérimentaux seront constitués de 5 porcelets (effectif minimum pour effectuer des analyses statistiques de variances les plus justes possibles). Les animaux seront examinés au cours d'une visite quotidienne (y compris le premier week-end). Les animaux présenteront, dans la pire des situations, de l'hyperthermie et une perte d'appétit très modérée au cours des 24 heures suivant la vaccination. En cas de non réponse aux stimuli tactiles et visuels et de pertes d'appétit et de poids importantes, les porcs seront euthanasiés.

Il n'existe pas d'alternative à cette étude expérimentale puisque nous cherchons à évaluer l'état de santé général de l'animal ainsi que les réponses inflammatoires locales (au point d'injection). Les adjuvants et autovaccins seront préparés selon la réglementation décrite en particulier dans le décret n°2005-374 du 20 avril 2005 relatif aux autovaccins à usage vétérinaire.

1657- Le cancer du sein est un véritable problème de santé publique. C'est le cancer le plus fréquent chez la femme (52 588 nouveaux cas de cancer du sein en 2010). Une femme sur 8 est actuellement touchée par le cancer du sein et ce chiffre pourrait grimper à une sur 7 d'ici vingt ans. En 2008, on notait 11 605 décès. C'est la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Le coût total du cancer du sein est de 3,2 milliards d'euros par an (source : Haute Autorité de Santé, Participation au dépistage du cancer du sein : Recommandations de la HAS pour les femmes de 50 à 74 ans). Environ 25% des cancers du sein sont caractérisés par une expression très élevée de la protéine HER2. Le récepteur HER2 fait partie de la famille des récepteurs EGFR (pour Epithelial Growth Factor Receptor). Il est impliqué dans la régulation de la prolifération et de la survie des cellules et, en particulier, des cellules cancéreuses. Ainsi, des médicaments visant à réprimer l'expression de cette protéine, seraient d'un intérêt majeur de santé publique.

Les ARNi, ARN interférents, sont des molécules capables de supprimer l'expression d'un gène.

L'objectif de ce programme est l'étude de médicaments basés sur l'utilisation d'ARNi, des ARNi-médicaments, visant HER2. L'étude visera plus particulièrement l'adressage des molécules transportant les ARNi jusqu'aux cellules cancéreuses. En effet,

lorsqu'ils sont injectés, les ARNi doivent être protégés et véhiculés jusqu'aux cellules cancéreuses. Pour cela, les ARNi seront transportés jusqu'aux cellules cibles, grâce à l'utilisation de nanoparticules lipidiques cationiques, qui serviront de vecteurs. Ces nanoparticules ont prouvé in vitro leur aptitude à transférer efficacement des ARNi ciblant HER2 dans des modèles cellulaires. Pour les études in vivo, les cellules tumorales humaines seront implantées sous la peau de souris immunodéprimées, sur le flanc. L'implantation des cellules tumorales sera réalisée sous anesthésie et la croissance des tumeurs sera surveillée 3x/semaine jusqu'à atteindre 250 mm³ ce qui est un stade de développement non douloureux pour l'animal.

L'objectif est d'évaluer le devenir des nanoparticules et des ARNi après injection par voie intraveineuse. Par conséquent, les nanoparticules, chargées en ARNi ciblant HER2, seront injectées par voie systémique. Le devenir biologique des nanoparticules et des ARNi, marqués avec des fluorophores différents, sera étudié par imagerie de fluorescence, avec une attention particulière au regard de leur accumulation dans la tumeur.

Deux nanoparticules seront testées dans ce projet, qui nécessitera l'utilisation de 60 souris nues

1658- L'estimation du niveau de production d'anticorps contre un pathogène constitue un moyen incontournable d'évaluer la capacité de protection d'un vaccin. Dans ce cadre, ce projet vise à produire des anticorps polyclonaux (AcP ; dirigés contre plusieurs protéines d'un pathogène) et/ou monoclonaux (AcM ; dirigés contre une unique protéine d'un antigène), qui serviront d'outils pour : 1/ comprendre la dynamique d'interaction des pathogènes avec son hôte, 2/ évaluer l'efficacité d'un vaccin, 3/ développer et valider des tests de diagnostic ou autre technique immunologique. Ces objectifs passent par l'inoculation d'animaux avec des souches virales ou bactériennes atténuées (pas virulentes), inactivées (mortes) et adjuvées ou des sous-unités vaccinales (parties d'un pathogène, comme une protéine, l'ADN etc..) ou simplement avec des micro-organismes non pathogènes et des protéines d'intérêt.

Pour obtenir des résultats satisfaisants et éviter les répétitions de protocoles et, par conséquent, réduire le nombre d'animaux utilisés, le choix des animaux sera effectué avec soin. Plusieurs facteurs sont à être pris en compte dans ce choix comme la taille des animaux qui doit être proportionnelle à la quantité d'anticorps souhaitée et l'espèce et lignée animales qui doivent être adaptées. Pour éviter le maximum la douleur chez l'animal, l'antigène à injecter ne sera pas toxique, sera préparé dans des conditions d'asepsie et aura un pH ajusté aux conditions physiologiques de l'animal. Le volume d'injection sera le plus petit possible et dans les limites recommandées pour chaque espèce. Les rappels seront évités au maximum. La voie d'injection sera adaptée à l'espèce et choisie. Toutes les procédures seront adaptées à l'espèce animale choisie réalisées par du personnel expérimenté. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur hébergement. Par exemple, pour réduire le stress, les souris et les rats seront hébergés en groupe et leur milieu enrichi par l'ajout de tunnel et/ou carré de cellulose ; celui des lapins sera enrichi par des bûchettes de bois à ronger (par exemple briquettes de peuplier).

Les espèces animales choisies pour ce projet sont les espèces cibles ou les modèles animaux des maladies étudiées. Il pourra donc s'agir de souris (99) et lapins (28).

1659- La technologie des vaccins thérapeutiques anti-cytokines (dits Kinoïdes), couplant une cytokine à une protéine porteuse spécifique permettant rendre le complexe immunogène est en cours de développement. Concernant le syndrome de Sjögren, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement de fond bien défini, particulièrement en ce qui concerne l'atteinte exocrine spécifique (syndrome sec oculaire et buccal, avec présence d'infiltrats inflammatoires des glandes correspondantes), dont les mesures de suppléance sont trop souvent insuffisantes.

Depuis plusieurs années, de nombreuses publications rapportent une surexpression de la voie de l'interféron (IFN) alpha dans le sérum et les glandes salivaires des patients. On suspecte un rôle de cette surexpression dans la genèse et l'entretien de la maladie (de la même manière que dans le lupus érythémateux systémique) et cette voie constitue, de fait, une cible thérapeutique potentielle.

L'objectif de notre étude est de démontrer une preuve de concept quant à l'intérêt d'une vaccination thérapeutique anti-IFN alpha, appliquée à un modèle murin de syndrome de Sjögren. Le vaccin choisi, appelé IFN-Kinoïde, a déjà été utilisé dans une étude préclinique faisant appel à un modèle murin de lupus érythémateux systémique (LES), avec une bonne immunogénicité (fabrication d'anticorps neutralisants ciblant l'IFN alpha en réaction à la vaccination), des résultats favorables sur les manifestations cliniques (augmentation de la survie et de l'atteinte rénale) ainsi qu'une tolérance parfaite (aucun effet indésirable rapporté).

La méthodologie appliquée aux animaux, notamment les conditions d'hébergements seront contrôlées. Les tests ont été réfléchis afin de limiter ou d'éviter la douleur et la souffrance subie par les animaux, en particulier en fixant des points limites. Nous serons aussi très attentifs au bien-être des animaux. Afin de ne pas causer de douleur aux animaux, l'euthanasie sera précédée d'une anesthésie générale. Durant les protocoles expérimentaux, un suivi quotidien des animaux sera mis en place afin de surveiller tous les signes évoquant une douleur importante chez l'animal (des troubles comportementaux comme une hyperactivité anormale, l'isolement et des troubles physiologiques comme l'augmentation de la fréquence respiratoire, la présence d'un dos voûté, la perte de poils ou poils hérissés et la perte de poids ($\geq 10\%$ du poids initial)). Dès l'apparition d'un des signes indiqués, l'animal sera anesthésié avant d'être sacrifié par dislocation cervicale.

Nous utiliserons 60 souris MRL/lpr, qui développent spontanément un phénotype associant des signes de lymphoprolifération (adénopathies, splénomégalie) et une connectivité avec des caractéristiques mixtes de LES et de syndrome de Sjögren : atteintes salivaires et lacrymales, signes neuropsychiatriques, neuropathie périphérique, arthrites, protéinurie et insuffisance rénale ainsi qu'un certain degré d'auto-immunité.

1660- Le [18F]FPEB, est un médicament radiopharmaceutique marqué au fluor 18 qui présente d'excellentes caractéristiques pour l'exploration de la neurotransmission glutamatergique en TEP (Tomographie Emission positons). Il cible plus précisément le sous-type 5 du récepteur au glutamate, impliqué dans de nombreuses pathologies neurologiques du système nerveux central telles que la maladie de Parkinson, l'anxiété, la dépression...

L'objectif principal de l'étude préclinique que nous proposons de réaliser réside dans la caractérisation in vivo du [18F]FPEB.

En effet, seront étudiés :

1. l'étude de l'influence de la concentration synaptique en glutamate sur la fixation cérébrale du [18F]FPEB, et donc sur la quantification du signal radioactif détecté in vivo.
2. l'étude du métabolisme in vivo à la fois dans le plasma et dans le cerveau.
3. l'étude de la spécificité de la liaison.

Cinquante rats mâles adultes Sprague-Dawley sont nécessaires à la totalité de cette étude pré-clinique (n1=25 ; n2=15 ; n3=10). En effet, cette étude de caractérisation in vivo du radiopharmaceutique sur des rongeurs ne peut être substituée par une méthode alternative in vitro ou sur cellules (Remplacement).

Grâce à une planification rigoureuse des expériences, le nombre d'animaux utilisés proposé est réduit au minimum indispensable afin d'obtenir des résultats interprétables (Réduire).

De plus, le développement et l'utilisation des techniques d'exploration fonctionnelle in vivo telle que la micro-TEP permettent de considérablement diminuer la pénibilité des expériences subies par l'animal de laboratoire dans l'objectif de réduire la souffrance et le stress de l'animal (Raffiner).

Les animaux seront en présence d'un enrichissement (tunnel plastique, papier absorbant).

1661- Depuis de nombreuses années, les caractères de production (croissance, nombre d'œufs, efficacité alimentaire...) ont été considérablement améliorés chez " la poule pondeuse" grâce à la sélection génétique ainsi qu'à l'amélioration de la qualité de l'aliment, des conditions d'élevage et de la prophylaxie. Néanmoins, l'amélioration des performances semble s'accompagner d'une diminution de la réponse des animaux vis à vis des pathogènes. Les fonctions immunitaires semblent donc être affaiblies par l'amélioration des performances du fait que la plupart des ressources métaboliques est consacrée à la production et l'équilibre entre la production et la réponse immunitaire est compromise.

L'objectif du projet est donc d'analyser l'allocation des ressources (trade-off) entre production et réponse immunitaire à partir de 2 populations de poulettes "futurs pondeuses" sélectionnées de façon divergente depuis quarante générations sur un critère de "consommation alimentaire résiduelle".

La consommation alimentaire résiduelle représente la différence entre la consommation observée et la consommation prédite sur une période donnée et permet de mesurer l'efficacité alimentaire des animaux. Cela est fait grâce à une équation de régression multiple prenant en compte le poids corporel moyen, la variation de poids et, pour les femelles, la masse d'œufs produite.

Les comparaisons des systèmes immunitaires se feront au travers de différents paramètres comme les formules sanguines, les réponses vaccinales et l'expression des gènes du système immunitaire. L'effectif mis en œuvre est de 54 animaux (27 par lignée).

Respect de la règle des 3R :

- Remplacer : Pour évaluer le lien entre immunité et digestion, il faut disposer des mesures sur les animaux et le modèle le plus adapté pour l'évaluer sur le poulet est le poulet lui-même
- Réduire: des calculs statistiques ont été effectués pour estimer le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de cette expérience
- Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions comparables à celles des poulets d'élevage et les prises de sang limitées au strict minimum (2 fois) pour limiter leur stress

1662- L'élevage des animaux dans le respect de leurs besoins fondamentaux et de leur bien-être exigent un personnel compétent. Pour cela, il se doit de connaître les espèces qu'il est susceptibles de manipuler, entretenir et élever. L'acquisition de ces connaissances impose une formation complète que ce soit de la physiologie de l'animal, de son alimentation, des conditions de son élevage mais également de son comportement et de son anatomie. C'est pour cela que le législateur a souhaité que la formation du personnel assurant les soins aux animaux comporte une partie de travaux pratiques permettant au personnel en formation d'acquérir les bons gestes mais aussi une connaissance suffisante pour distinguer les signes éventuels de stress ou de souffrance. C'est dans ce but que ce projet d'enseignement pratique a été conçu. Chaque session sera composée de 20 personnes travaillant en binôme disposant chacun d'un animal, rat ou souris, mâle ou femelle. Les personnes pourront aller d'un atelier à l'autre de façon à se familiariser à la manipulation de tous les types d'animaux sans jamais réaliser d'acte susceptible d'engendrer une douleur ou un stress. Ainsi, pour chaque séance de travaux pratiques, 10 animaux seront utilisés soit 160 animaux au total sur ce projet. Après avoir été manipulé sans aucune utilisation de protocole invasif, ces animaux seront mis à mort selon les préconisations de la Directive 2010/063 et une fois la mort vérifiée, ils seront autopsiés de façon à étudier les différents systèmes anatomiques. Pour cette formation, les animaux utilisés sont issus des animaux de réforme issus de notre élevage et qui sont normalement destinés à l'alimentation des reptiles et rapaces.

1663- Une des principales complications après transplantation pulmonaire pour les patients est le rejet chronique du greffon, qui se manifeste par la Bronchiolite Oblitérante (BO). Cette pathologie affecte 50% des patients dans la 5ème année post-transplantation. La BO implique une obstruction progressive des petites voies aériennes par un tissu inflammatoire et

fibroprolifératif qui cause des difficultés respiratoires. Les médicaments immunosuppresseurs actuellement utilisés après transplantation pulmonaire peuvent donner des améliorations chez certains patients mais aucun ne permet le traitement de la BO, d'où la nécessité de recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans notre laboratoire, nous avons émis l'hypothèse d'une nouvelle cible thérapeutique dans la BO – la protéine kinase MSK1 (Mitogen- and Stress-Activated Kinase 1). MSK1 est une kinase nucléaire dont un des substrats est le principal facteur de transcription impliqué dans l'inflammation, NF- κ B, qui est responsable de l'activation de gènes pro-inflammatoires.

Chez les patients avec BO, l'inflammation et la fibroprolifération sont associées à un remodelage vasculaire dans le tissu pulmonaire et à une activité angiogénique accrue dans le lavage broncho-alvéolaire. Nous étudierons la cinétique de revascularisation dans le modèle de transplantation hétérotopique de trachée et l'influence de l'allogénéité pour comprendre les mécanismes de développement du rejet dans ce modèle. L'inhibition de l'inflammation par les inhibiteurs de MSK1 pourrait entraîner non seulement une diminution de la fibroprolifération mais aussi de l'angiogenèse aberrante dans les allogreffes.

Dans notre projet, nous utiliserons le modèle de BO par transplantation de trachée en position hétérotopique dans le tissu sous-cutané chez la souris. Ce modèle est très reproductible et couramment utilisé pour induire et étudier cette pathologie chez la souris. C'est le modèle animal le moins invasif et le moins douloureux pour la BO.

Les objectifs de ce projet sont de :

1/ caractériser la vascularisation du greffon : ceci n'a pas été encore décrit dans ce modèle de BO ; nous visualiserons et quantifierons les vaisseaux sanguins et lymphatiques et analyserons l'expression de gènes impliqués dans la vascularisation,

2/ évaluer l'effet de nouveaux inhibiteurs de MSK1 sur le développement de la BO après transplantation hétérotopique de trachée, en particulier sur la revascularisation du greffon.

1664- Nous estimons le nombre de composés, nouveaux inhibiteurs de MSK1, à évaluer dans le modèle de transplantation hétérotopique à 6-8, d'abord pour une première sélection sur l'obstruction trachéale. Ensuite 2 composés seront choisis pour l'évaluation de leur effet sur la ré-épithélialisation et la revascularisation du greffon et l'expression des gènes d'intérêt. De ce fait dans ce projet seront utilisées pendant la période de 5 ans 1505 souris BALB/c et 631 souris C57BL/6.

Les composés à utiliser in vivo seront choisis parmi une série de molécules pré-sélectionnées in vitro dans un modèle cellulaire de fibroblastes pulmonaires humains produisant sous l'effet de l'IL-1 β l'IL-6 sous la dépendance de MSK1. La cytotoxicité sera évaluée sur ces cellules par un test de cytotoxicité au WST-1. Toute molécule cytotoxique in vitro sera éliminée de l'étude in vivo.

Nous avons réduit le nombre d'animaux utilisés au minimum nécessaire pour réaliser les analyses souhaitées. Nous exploiterons les données de cette étude en réalisant les nombreuses analyses possibles sur un même échantillon collecté. Le bien-être de l'animal sera assuré en respectant la surface des cages et en enrichissant le milieu par des tubes en carton. Les animaux seront particulièrement surveillés après la transplantation pour éventuels signes de souffrance (baisse de l'appétit, modification de l'apparence, prostration), ce qui arrive rarement avec ce modèle. Dans un tel cas, les animaux seront euthanasiés de façon appropriée. Des anesthésiques ayant un effet analgésique seront utilisés pendant la transplantation afin d'éviter la douleur. Aucune méthode alternative (p.ex. cellulaire) ne permettra d'évaluer le développement de la BO et l'effet des inhibiteurs de MSK1.

1665- Les cancers sont un problème majeur de santé publique et font l'objet de nombreux programmes de prévention et de dépistage dans le monde. En dépit des nombreux plans mis en place pour prévenir et traiter les cancers et malgré les progrès de la médecine et des traitements, le nombre de cas de cancer diagnostiqué dans le monde reste considérable. Les principales approches de traitements sont la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, et l'hormonothérapie. Depuis quelques années, l'immunothérapie paraît être une nouvelle option pour limiter le risque de récurrence du cancer. Ceci est rendu possible grâce notamment à une meilleure compréhension de la réponse immunitaire anti-tumorale et du rôle du système immunitaire dans le développement de la tumeur.

En effet, on sait aujourd'hui que la réponse immunitaire est essentielle pour éliminer la tumeur, que ce soit par la réponse innée (cellules NK, cellules présentatrices d'antigènes) ou par la réponse adaptative (lymphocytes T et B). Seulement, de nombreux mécanismes suppresseurs déjouant la surveillance du système immunitaire ont été mis en évidence lors du développement des tumeurs. Ces mécanismes présents physiologiquement deviennent indésirables quand il s'agit d'éliminer les cellules tumorales puisqu'ils régulent le système immunitaire, ce qui conduit à un développement tumoral non contrôlé.

Parmi ces mécanismes suppresseurs, on distingue des populations suppressives (Treg, MDSC) ou des récepteurs inhibiteurs (PD-1, CTLA-4). Certaines de ces molécules sont déjà des cibles thérapeutiques dans quelques essais cliniques pour certains cancers. Ces essais ont été rendus possibles grâce à la preuve de concept sur des modèles précliniques murins.

Nous souhaitons tout d'abord examiner dans le développement tumoral le rôle d'un gène : SIRPalpha exprimé par les MDSC et macrophages, pour lequel nous allons générer des rats déficients pour cette molécule ainsi que des rats transgéniques pour la molécule SIRPalpha humaine (ces rats auront d'abord été rendus déficients pour la molécule SIRPalpha de rat). Nous posons l'hypothèse que ce gène participe à des mécanismes permettant l'échappement tumoral.

D'un point de vue thérapeutique, nous proposons de traiter les animaux avec des traitements expérimentaux ciblant le système immunitaire.

Ce type d'étude nécessite une preuve d'efficacité in vivo dans des modèles précliniques, c'est pourquoi nous voulons tester ces thérapies combinées chez le rat. Le nombre d'animaux utilisé sera de 576 rats pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages dans un cycle jour/nuit de 12h/12h

avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre d'animaux/cage dépendant de leur âge dans le but de diminuer le stress dû au manque de place et à la surpopulation.

1666- La xénothérapie est un domaine d'avenir qui englobe toutes les thérapies à partir de tissus animaux, dévitalisés ou vivants ou de molécules d'origine animale. Les connaissances actuelles dans ce domaine ne permettent pas d'envisager la production de ces tissus par des méthodes "in vitro". La production par des animaux vivants est donc la seule méthode vraiment efficace.

Le projet a pour objectif la production d'une lignée de lapins qui pourraient être utilisés dans ce domaine. La modification génétique consiste à supprimer le fonctionnement d'un des gènes responsables de la présence de certaines molécules à la surface de toutes les cellules d'un individu. Ce gène n'est pas fonctionnel dans l'espèce humaine. Ainsi, l'invalidation du gène chez le lapin permettrait de supprimer la présence de ces molécules à la surface des cellules chez le lapin, et « d'humaniser » le lapin donnant ainsi la possibilité d'utiliser ces individus génétiquement modifiés dans les divers domaines de xénothérapie.

La production de lapins génétiquement modifiés sera effectuée par la technique de « gene editing ». Cela consiste à injecter dans l'embryon unicellulaire de lapin une nucléase qui cible une région choisie du génome et provoque l'introduction de mutations à l'origine de l'invalidation du fonctionnement du gène.

Le protocole comprend diverses étapes

- la saillie de lapines ayant reçu un traitement hormonal de superovulation,
- la récupération des embryons unicellulaires par euthanasie des lapines, et l'injection de l'enzyme de modification,
- leur transfert dans les voies génitales d'une lapine receveuse,
- l'élevage des petits après leur naissance, l'analyse de leur génotype et de leur phénotype,
- la reproduction des animaux dont le génotype a été modifié avec succès pour obtenir au moins un lapin male chez lequel le gène a été invalidé.

Le protocole prévoit d'utiliser au maximum 80 animaux répartis sur les différentes étapes. A chaque étape du protocole, un objectif est fixé, ainsi que le nombre d'animaux nécessaires. Dès qu'un objectif est atteint, l'expérimentation sur les animaux s'arrête et le protocole passe à l'étape suivante.

Toutes les précautions sont prises pour utiliser les animaux dans des conditions telles que les souffrances éventuellement engendrées sont réduites au maximum. Des points limites sont définis pour les étapes où cela semble nécessaire. L'expérimentation est arrêtée à chaque fois que les points limites sont atteints.

1667- Les maladies hépatiques chroniques telles que la cirrhose du foie et le carcinome hépatocellulaire (CHC) sont des défis majeurs pour la santé mondiale. Le CHC est en effet la 2ème cause de mort par cancer dans le monde. Les thérapies permettant le traitement de cette pathologie sont très limitées et les stratégies thérapeutiques visant à prévenir le CHC chez les patients à risque, infectés par le virus de l'hépatite B ou C (VHB, VHC), et présentant une cirrhose hépatique ou une fibrose avancée sont inexistantes. De plus, il a été montré que même suite à l'éradication du VHC, le risque de développement de CHC persiste quand une fibrose avancée est déjà présente. Cette absence d'option thérapeutique reflète notre méconnaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la progression de la maladie hépatique. Les mécanismes de développement du CHC conduisant de la fibrose/cirrhose à la carcinogenèse étant communs à différentes étiologies, nous utilisons le modèle d'infection par le VHC afin de comprendre les événements moléculaires sous-jacents à la progression de la maladie. Nos données in vitro fournissent des indications fortes quant à la dérégulation de voies de signalisation par le VHC impliquées dans l'évolution de la maladie hépatique. Ces études devraient nous permettre d'identifier des facteurs clés importants pour la compréhension de la pathogenèse hépatique et plus particulièrement du CHC. Afin de valider l'implication des différentes voies moléculaires identifiées in vitro, nous souhaitons utiliser la technologie CRISPR-Cas9, permettant l'invalidation spécifique de gènes in vivo, chez la souris adulte. Cette technologie doit nous permettre d'éteindre l'expression d'un ou plusieurs gènes clés afin de récapituler in vivo le développement de la maladie hépatique conduisant au CHC. Pour cette étude, nous envisageons d'utiliser 400 à 500 souris. Afin de remplacer et de réduire au maximum le nombre d'animaux requis la majorité des expériences seront menées en amont, in vitro sur des lignées cellulaires et ex vivo sur des biopsies de patients atteints de maladie hépatique (VHC, VHB, cirrhose, stéatose hépatique non alcoolique...), ce qui nous permettra de sélectionner finement les gènes clés les plus importants. Afin de raffiner aux mieux notre méthodologie nous avons mis en place des points limites que sont l'apparition de signes de mal être et de douleur, persistant au-delà de 48h suite à l'injection d'un analgésique.

1668- Les maladies hépatiques chroniques telles que la cirrhose du foie et le carcinome hépatocellulaire (CHC) sont des défis majeurs pour la santé mondiale. Le CHC est en effet la 2ème cause de mort par cancer dans le monde. Les thérapies permettant le traitement de cette pathologie sont très limitées et les stratégies thérapeutiques visant à prévenir le CHC chez les patients à risque, infectés par le virus de l'hépatite B ou C (VHB, VHC), et présentant une cirrhose hépatique ou une fibrose avancée sont inexistantes. De plus, il a été montré que même suite à l'éradication du VHC, le risque de développement de CHC persiste quand une fibrose avancée est déjà présente. Cette absence d'option thérapeutique reflète notre méconnaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la progression de la maladie hépatique. Les mécanismes de développement du CHC conduisant de la fibrose/cirrhose à la carcinogenèse étant communs à différentes étiologies, nous utilisons le modèle d'infection par le VHC afin de comprendre les événements moléculaires sous-jacents à la progression de la maladie. Nos données in vitro fournissent des indications fortes quant à la dérégulation de voies de signalisation par le VHC impliquées dans l'évolution de la maladie hépatique. Ces études devraient nous permettre d'identifier des facteurs clés importants pour la

compréhension de la pathogenèse hépatique et plus particulièrement du CHC. Afin de valider les différentes voies moléculaires identifiées *in vitro*, nous souhaitons utiliser le modèle de souris chimérique au foie humanisé. Ces souris transgéniques sont immunodéficientes et peuvent être transplantées avec des hépatocytes humains et ainsi être infectées par le VHB et le VHC. Nous envisageons donc d'utiliser ce modèle de souris afin de moduler l'expression de gènes clés identifiés *in vitro* directement dans les hépatocytes humains greffés. Cette modulation peut se faire soit *ex vivo* avant la greffe, soit *in vivo* une fois que les hépatocytes ont repopulé le foie. Nous souhaitons également développer une nouvelle approche consistant en la greffe d'hépatocytes (présentant une perturbation d'une voie identifiée) et de cellules non parenchymateuses (cellules de Kupffer, cellules de Ito) avec de déterminer si ces cellules jouent un rôle dans la progression de la maladie. Pour cette étude nous estimons le nombre d'animaux nécessaire à environ 250-300. Afin de remplacer et de réduire au maximum le nombre d'animaux requis la majorité des expériences seront menées *in vitro* sur des lignées cellulaires et *ex vivo* sur des biopsies de patients atteints de maladie hépatique (VHC, VHB, cirrhose, stéatose hépatique non alcoolique...), ce qui nous permettra de sélectionner finement les gènes clés les plus importants. Afin de raffiner au mieux notre méthodologie nous avons mis en place des points limites que sont l'apparition de signes de mal être et de douleur, persistant au-delà de 48h suite à l'injection d'un analgésique.

1669- Les résultats d'une étude préalable du transcriptome de rats soumis à une hypertension artérielle, nous ont permis d'identifier un nouvel acteur dans la physiopathologie de maladies rénales intitulé l'isthmine (ISM). Ces rats ont été étudiés dans des conditions normales puis après avoir développé des lésions liées à l'HTA (néphroangiosclérose) puis après réparation rénale. Sa découverte repose sur les critères suivants : (i) la mise en évidence d'une importante variation de son expression au cours de la néphroangiosclérose et de la réparation sur l'étude transcriptomique (ii) l'absence de donnée disponible de cette molécule au niveau rénal pour faire une recherche innovante, (iii) la disponibilité d'outils pour son étude. L'isthmine est une protéine sécrétée de 460 AA et de 60kDa, encore très peu étudiée. Les données se limitent à quelques études sur le développement et le cancer. Ces premières études montrent que l'isthmine est exprimée au niveau des vaisseaux. Elle prévient la croissance des vaisseaux et favorise la mort des cellules endothéliales. L'administration d'isthmine recombinante chez l'animal prévient le développement de cancers. L'isthmine a deux récepteurs identifiés, l'intégrine alpha v bêta 5 exprimée aussi sur l'endothélium, notamment dans le rein, plus précisément dans le glomérule au sein des capillaires glomérulaires. Cette intégrine est impliquée à la fois dans l'activation du TGF-bêta au cours de processus de fibrose mais aussi dans le développement des maladies rénales. Le deuxième récepteur de l'isthmine de découverte récente est le glucose-regulated protein 78 kDa (GRP78) impliqué dans le stress du réticulum et les maladies rénales. A ce jour, l'expression et le rôle de l'isthmine dans le rein sont inconnus.

Nos objectifs sont d'étudier l'expression de l'isthmine et sa variation dans le rein normal et au cours de différentes néphropathies expérimentales et humaines, préciser sa localisation cellulaire et identifier ses partenaires. Dans un deuxième temps, nous chercherons à comprendre le rôle de l'isthmine en modulant son expression.

Par ces travaux, nous préciserons l'expression de l'isthmine rénale dans des conditions normales, et au cours de différentes néphropathies. Nous pressentons une variation d'expression au cours des maladies rénales. Du fait de son rôle connu qui empêche le développement des vaisseaux, nous étudierons aussi son expression au cours de l'ischémie/reperfusion rénale. Sur la base d'un rôle anti-angiogénique, l'inhibition de l'isthmine devrait améliorer les lésions liées à l'HTA et des lésions induites par l'ischémie/reperfusion rénale.

Le recours à des animaux est justifié par l'objectif de l'étude qui consiste à étudier des maladies rénales humaines dont des modèles expérimentaux très similaires ont été développés chez le rat. Nous utiliserons 100 rats Sprague Dawley mâles car :

- Afin de limiter le nombre d'animaux, il y aura 1 groupe témoin commun à 2 modèles sur 3 de néphropathie. Par ailleurs, des échantillons de biopsies rénales humaines et expérimentales seront utilisées pour étudier l'expression de l'isthmine limitant le nombre d'animaux étudiés.

- Les modèles de néphropathies étudiés notamment la néphroangiosclérose et le syndrome néphrotique chez le rat sont très proches de la maladie humaine. Il est presque impossible d'obtenir une néphroangiosclérose chez la souris, comme d'ailleurs un syndrome néphrotique comparable à la pathologie humaine.

- Le modèle d'hypertension par l'administration de LNAME et le modèle d'ischémie reperfusion sont parfaitement maîtrisées par notre équipe et réalisées depuis des années dans l'unité. Le modèle PAN largement décrit dans la littérature est pertinent par comparaison à la pathologie humaine sera réalisé pour la première fois sous les conseils de chercheurs expérimentés pour le modèle.

- Nous disposons de rares anticorps spécifiques contre l'isthmine qui fonctionnent contre l'isthmine de rat.

- D'autre part, le rat SD est non consanguin, il est donc un meilleur reflet de la population humaine pour les modèles d'hypertension.

1670- Les progrès réalisés dans le domaine de l'endoscopie digestive interventionnelle thérapeutique en passant par la voie naturelle du tube digestif ont permis de lui accorder une place grandissante dans le traitement curatif des lésions précancéreuses et cancéreuses superficielles du tube digestif. Contrairement à la plupart des techniques d'exérèse chirurgicale, les techniques d'exérèse endoscopique telles que la polypectomie, la mucoséctomie et, plus récemment la dissection sous-muqueuse permettent un traitement conservateur de l'organe atteint associé le plus souvent à un risque moindre de morbidité/mortalité.

L'objectif de ce projet est de former des médecins gastroentérologues séniors et juniors à des techniques d'exérèse endoscopique sur modèle vivant de porc. A cette fin, il sera organisé 4 ateliers sur une journée (3 ateliers destinés à des

médecins séniors et un atelier destiné à des médecins juniors en formation) nécessitant chacun un porc anesthésié pour la réalisation de cette formation. Chaque atelier sera encadré par un médecin expert formé aux techniques d'exérèse endoscopique. Seront réalisées lors de cette formation la dissection sous-muqueuse et la mucoséctomie oesophagienne et gastrique auxquelles seront associées des procédures de traitements endoscopiques des complications éventuelles (hémorragies, perforations).

Remplacement : La mise en place et le recours à ce type de formation est un pré-requis indispensable à la pratique et à la diffusion ce type de technique en clinique pour la prise en charge des patients atteints de lésions pré-cancéreuses et cancéreuses superficielles du tube digestif. L'apprentissage pratique sur modèle animal permet d'acquérir la dextérité suffisante avant de pratiquer en bloc opératoire hospitalier.

Réduction : Quatre porcs seront anesthésiés pour ces travaux pratiques. Il est nécessaire que chaque stagiaire puisse réaliser le geste technique sur l'animal, il faut donc un minimum d'animaux pour permettre cette pratique.

Raffinement : Les porcs seront maintenus en groupe sociaux et hébergés sur de la paille fraîche avant l'anesthésie. Un monitoring des fonctions vitales (fonction cardiaque, respiratoire, oxymétrie) permettra de s'assurer du maintien de l'anesthésie et de sa profondeur. Les animaux ne seront pas réveillés en fin de procédure.

1671- Le but de cette étude est de mesurer par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) les temps de relaxation du tissu cérébral chez la souris. L'objectif de ce travail multicentrique est d'établir des cartes paramétriques T1 et T2 de relaxométrie de la souris, sur un protocole d'acquisition communs. Cela permettra de partager entre centres des données brutes, des données dérivées et de comparer des chaînes de traitement, de calculer des rapports signal/bruit pour différents imageurs, espèce de rongeurs, structures.

L'IRM est une imagerie en contraste étudiant les modifications de relaxation des protons (molécules d'eau) en fonction du milieu dans lequel ces molécules d'eau se trouvent. Son avantage par rapport à d'autres techniques d'imagerie (rayons X, tomographie par émission de positons) c'est le fait que c'est une technique non invasive et également un excellent outil pour investiguer la structure des systèmes vivants.

L'IRM a la capacité d'imager des tissus mous, non seulement d'un point de vue morphologique mais aussi fonctionnel.

L'évaluation fonctionnelle s'effectue en mesurant les temps de relaxation des protons : T1, lié à la relaxation longitudinale des protons et T2 lié à la relaxation transversale. L'imagerie quantitative repose sur des séquences IRM dédiées à la cartographie des temps de relaxation T1 et T2. Leurs variations au sein du tissu sont liées aux différents compartiments d'eau issus d'organisations spécifiques à l'échelle cellulaire. Mesurer ces paramètres permet une analyse quantitative des tissus et donc de mieux caractériser leur microstructure. De cette manière, l'IRM est un moyen idéal pour étudier in vivo les propriétés des organes et de pouvoir départager un tissu normal d'un tissu pathologique.

Les cartographies IRM T1 et T2, en tant qu'images paramétriques, permettent l'évaluation quantitative des différents tissus. Les temps de relaxation T1 et T2 qui sont mesurés par l'IRM et exprimés en millisecondes sont différents pour chaque tissu. Cela permet de caractériser d'une manière quantitative une valeur attribuée à un tissu ; quand ce tissu est pathologique la valeur du T1 et du T2 change par rapport à la valeur physiologique.

Des études in vitro sur échantillons ont été au préalable réalisées ce qui a permis de mettre au point le protocole d'imagerie. La règle de remplacement ne pouvant s'appliquer puisqu'il s'agit d'une étude permettant de caractériser les temps de relaxation des tissus cérébraux in vivo, il a été convenu qu'une cohorte de 10 animaux par centre serait suffisante afin de pouvoir comparer ces temps de relaxation. La règle de raffinement s'applique entièrement dans cette étude où les souris ne subiront que deux examens d'imagerie et celles-ci seront gardées en vie et proposées au reclassement pour d'autres projets.

1672- Notre plateforme IRM réalise une palette de prestations de service très large, allant de la mise à disposition des équipements IRM à la réalisation, par la plateforme, d'expériences IRM selon les besoins du demandeur.

Dans ce contexte, la plateforme est amenée à accueillir temporairement, à la journée, des animaux extérieurs à l'établissement utilisateur dont elle dépend.

Ces animaux sont déjà inclus dans une autorisation de projet rattaché à l'établissement utilisateur concepteur dont dépend le demandeur de la prestation de service.

Ils entrent sur la plateforme IRM préclinique pour y subir un protocole d'imagerie puis repartent dans leur établissement d'origine ou sont euthanasiés sur place en accord avec le protocole expérimental.

Les objectifs de l'imagerie sont (i) la mise en évidence de lésions ou anomalies dans des modèles animaux de pathologies et l'identification de leurs caractéristiques physiologiques (métabolisme, perfusion, présence d'œdème, ...), (ii) le suivi de l'évolution de ces lésions et de leurs caractéristiques au cours du temps après traitement.

Cette demande a pour objectif d'autoriser uniquement les protocoles d'imagerie mis en œuvre sur la plateforme pour le compte des responsables de projet extérieurs à l'établissement utilisateur dont elle dépend. La plateforme s'engage à vérifier que les projets qu'elle accueille ont reçu un avis favorable de la part du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche avant toute expérimentation dans ses locaux.

Les projets accueillis sur la plateforme concernant l'étude de pathologies et leur suivi thérapeutique ou des simulations informatiques (contextes innovants qui nécessitent des expériences pour alimenter les futures simulations). Il est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire car il y a nécessité de prendre en compte (i) les interactions des cellules malades avec les autres cellules de l'organe voire des autres organes, qui peuvent modifier le comportement et les réponses des cellules malades, et (ii) les modifications possibles du médicament dans l'organisme avant d'atteindre la cellule ciblée, ...)

Cette demande d'autorisation est formulée pour un quota de 100 lapins sur une durée de 5 ans. Un décompte des animaux extérieurs imagés sera tenu et une nouvelle demande sera déposée si le quota est dépassé avant la fin de la période de 5 ans. Il faut savoir que l'imagerie permet de réduire le nombre d'animaux utilisés par rapport aux statistiques car elle permet (i) de visualiser de façon non traumatique des lésions internes à l'animal, non visibles autrement, (ii) de constituer des groupes avec des lésions homogènes (en terme de taille ou caractéristique), (iii) de suivre les mêmes animaux au cours d'un traitement. 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.

1673- Les études des pathogènes des animaux peuvent nécessiter l'utilisation d'animaux dits exempts de micro-organismes pathogènes spécifiques (EOPS), afin de disposer de sujets sains au statut sanitaire parfaitement connu avant inoculation des pathogènes spécifiques étudiés. Le contrôle du statut des poulets EOPS nécessite de vérifier, entre autre, que les animaux ne sont pas infectés par le virus de la maladie de Marek. Cela est habituellement réalisé par recherche des anticorps précipitants l'antigène soluble A (ou glycoprotéine gC) du virus. Des tests moléculaires sont théoriquement possibles, mais ils nécessiteraient des contrôles lourds et onéreux et des manipulations beaucoup plus fréquentes des animaux à tester. Il n'y a, à ce jour, aucun test sérologique commercialisé, l'infection (à virus atténué tout comme à virus pathogène) étant relativement généralisée dans les conditions de terrain. La vaccination, largement pratiquée, prévient en effet la maladie mais pas le portage.

L'infection par le virus de la maladie de Marek devant être évitée pour les troupeaux EOPS, il est donc indispensable de préparer l'antigène précipitant pour faire les tests sérologiques de contrôle : cela, à partir d'une souche virulente, car seules les souches pathogènes produisent suffisamment d'antigène A. En théorie, le virus pourrait être multiplié sur cellules rénales primaires ou sur lignée cellulaire, mais le rendement de ces deux méthodes alternatives est beaucoup trop faible pour produire suffisamment d'antigène (la réaction de précipitation exige une grande concentration d'antigène) : compte tenu du temps d'incubation, la mort cellulaire par vieillissement des tapis prend en effet de court la multiplication virale. Il n'est donc pas possible de remplacer l'expérimentation sur animaux dans ce projet. La solution trouvée par les laboratoires spécialisés consiste à infecter des poussins EOPS d'un jour, à prélever leurs reins après euthanasie aux tout premiers symptômes de la maladie et à mettre les cellules rénales en culture. Ces cellules hébergent des virus dont le cycle productif est bien engagé et les tapis cellulaires obtenus se couvrent très rapidement de lésions avec libération de l'antigène A dans le surnageant.

La conduite de la procédure dans les conditions énoncées ci-dessus permet de respecter au mieux le raffinement, en particulier l'observation des premiers signes cliniques est la garantie que le cycle productif et lytique du virus est déclenché chez les animaux concernés. En effet, l'agent infectieux est un herpesvirus et celui-ci peut s'installer dans une phase de latence peu ou pas productive de virus. La phase de latence peut durer entre trois et vingt semaines selon les individus. Cela impose d'infecter un effectif assez grand de poussins pour qu'un nombre suffisant de sujets démarrent leur phase symptomatique avant l'âge de 5 semaines, car à partir de cet âge, la culture des cellules rénales devient très difficile. En pratique, un groupe de 80 animaux permettra l'obtention finale d'un stock d'antigène correspondant à 2 à 4 ans d'utilisation pour la réalisation des tests sérologiques de contrôle.

1674- L'augmentation exponentielle de l'utilisation de la téléphonie mobile et des techniques de communication utilisant les radiofréquences sur les 10 dernières années a conduit en une exposition généralisée de la population aux ondes électromagnétiques. Cette augmentation de l'exposition environnementale pose la question de ses conséquences biologiques et sur la santé humaine. De nombreuses données scientifiques se sont accumulées ces 30 dernières années, cependant il persiste des doutes concernant les effets non thermiques à la fois au plan biologique et comportemental des radiofréquences et en particulier, celles utilisées pour la téléphonie mobile.

L'Homme, comme le rat, est non seulement le résultat d'environ 30 000 gènes mais également celui d'une régulation fine de gènes spécifiques dans un type cellulaire particulier, à un moment donné et qui contribue à l'ensemble des processus biologiques/physiologiques. Ainsi, le développement normal et la santé tout au long de la vie dépendent d'une régulation homéostatique fine basée sur des signaux endogènes et exogènes nécessaire à la communication intracellulaire et aux fonctions de tout organisme vivant. La modulation épigénétique de l'expression des gènes représente un des mécanismes important de ces régulations qui permet l'adaptation de l'individu aux contraintes environnementales internes et externes. L'épigénétique est l'étude des changements héréditaires dans la fonction des gènes qui font apparaître le phénotype sans altération de la séquence d'ADN. En effet, l'accessibilité d'un gène, et donc sa capacité à être transcrit en protéines, dépend de modifications chimiques de l'ADN et des protéines qui l'entourent (histones).

L'objectif du projet est d'étudier sur le cerveau à différentes âges, les effets d'une exposition chronique aux radiofréquences de type 4G, récemment développées en France. Le motif de ce choix est que les adolescents et les jeunes adultes sont d'énormes consommateurs de technologies utilisant les radiofréquences, et les personnes âgées, plus fragiles au plan cognitif sont de plus en plus nombreuses à y venir. En outre, s'agissant de l'environnement, l'exposition est inéluctable. Le modèle choisi est celui du Rat à 3 âges de la vie : adolescent/jeune adulte, adulte et âgé. Le projet aborde deux questions fondamentales : i) la formation d'un souvenir et sa persistance dans le temps et, ii) le mode d'action cellulaire des ondes radiofréquences sur le cerveau via des mécanismes épigénétiques, en condition basale (rat au repos, sans apprentissage) ou au cours de la formation d'un souvenir spatial.

Le projet inclut 558 rats mâles Long Evans, jeunes, adultes et âgés. L'ensemble des expériences impliquant les animaux (manipulation, tests comportementaux, mise à mort) prendra en compte la règle des 3R : le 1er 'R', soit 'réduire' le nombre d'animaux au maximum en fonction du type d'expériences (comportement vs biologie moléculaire) et le 2e 'R', soit 'raffiner' et

notamment, réduire au maximum le stress ou l'angoisse des animaux. Il est à noter que les mesures de performances comportementales nécessitent une prise en compte toute particulière de l'état physiologique et émotionnel de l'animal : son bien-être est de fait une priorité pour l'ensemble de nos expériences in vivo dès l'arrivée au laboratoire.

1675- Environ 10% des décès dans le monde sont d'origine traumatique et 30 à 40% d'entre eux sont liés à une hémorragie. L'état de choc hémorragique est caractérisé par une hypoxie tissulaire systémique persistante, conséquence de la diminution de la volémie plasmatique et de la perte des hématies transportant l'oxygène. Pour tenter de compenser le manque d'oxygène au niveau tissulaire, le métabolisme anaérobie sera activé. Une acidose lactique, la production de radicaux libres et de protons sont ainsi observées entraînant inflammation et mort cellulaire dont les conséquences (défaillance multi-viscérale et coagulopathie) engagent le pronostic vital du patient. En conséquence, améliorer l'oxygénation tissulaire en cas de choc hémorragique présente un intérêt majeur dans la prise en charge du choc hémorragique. Parmi les pistes potentielles, un substitut d'hémoglobine peut être un excellent candidat. Le substitut utilisé pour ce projet a démontré sa grande capacité de fixation de l'oxygène (156 molécules d'O₂ à saturation). Si son innocuité a été montrée (pas de mortalité après injection chez la souris), son efficacité dans le cadre de la prise en charge du choc hémorragique n'a jamais été évaluée. Ce projet nous permettra de mieux comprendre les effets de cette molécule et son intérêt dans le cadre du choc hémorragique. Les travaux réalisés se veulent au plus proche « du terrain ». Ainsi, les protocoles expérimentaux réalisés sur modèle murin seront calqués sur les modalités de prise en charge clinique du choc hémorragique. In fine, l'objectif est de réaliser des travaux précliniques permettant d'évaluer l'intérêt et l'innocuité d'un substitut de l'hémoglobine dans le cadre de la prise en charge du choc hémorragique avant de proposer, en fonction des résultats, des essais cliniques.

Ce projet a une durée de 24 mois. Il a pour objectif d'évaluer les effets d'un substitut d'hémoglobine sur la coagulation et l'inflammation. Il impliquera l'utilisation de 492 rats Sprague Dawley.

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

- il s'agit d'une étude des effets au niveau de l'organisme pour laquelle le remplacement n'est pas possible
- le nombre d'animaux utilisés est limité au minimum permettant une étude statistique cohérente.
- le raffinement est respecté au niveau des conditions d'hébergement des animaux et au niveau des procédures d'anesthésie/Analgésie.

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

1676- La résistance aux traitements est un problème clinique majeur, en particulier dans le cas des ostéosarcomes, tumeurs osseuses malignes les plus fréquentes touchant des patients jeunes (80 % sont des enfants ou adolescents). La chimiothérapie est le pivot central du traitement actuel, suivie d'une chirurgie selon le siège et le volume tumoral puis d'une poly-chimiothérapie sur 6 à 12 mois. Malgré cela, de nombreux ostéosarcomes sont ou deviennent résistants aux agents anti-prolifératifs et les récurrences avec métastases aux poumons et au cerveau sont fréquentes. Le taux de survie des patients (estimé à 30% à 5 ans) a très peu évolué ces dernières années faute de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces. Il est donc absolument nécessaire d'identifier des moyens de contrecarrer cette résistance aux traitements afin d'améliorer la survie des patients.

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

1677- L'anticorps anti-CTLA4 a démontré une efficacité clinique dans plusieurs cancers tels que le mélanome ou le cancer de la prostate. Néanmoins, cette thérapie a un coût important, n'est efficace que chez 15 à 30% des patients et son efficacité clinique est au prix de toxicités comme des colites nécessitant parfois l'interruption du traitement. Ainsi, dissocier l'efficacité des toxicités est un enjeu important dans la prise en charge thérapeutique des patients et l'amélioration des thérapies anti-cancéreuses ciblées.

Des résultats obtenus dans notre laboratoire ont démontré chez la souris que l'efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA4 est diminuée en absence de flore intestinale (après traitement antibiotique ou chez des souris dites axéniques, dépourvues de flore) et qu'une dysbiose (déséquilibre de la flore intestinale) est induite. Ces travaux font suite à deux études qui ont décrit l'importance du microbiote intestinal (ou flore intestinale) dans l'efficacité des chimiothérapies, cyclophosphamide et oxaliplatine ainsi que de l'immunothérapie CpG + anti-IL-10R. De plus, chez les patients atteints de cancer de nombreux facteurs concourent à l'installation d'une dysbiose, comme la toxicité des chimiothérapies sur les muqueuses, la prescription d'antibiotiques pendant la neutropénie ou les corticoïdes entraînant l'anergie lymphocytaire.

Actuellement, dans le cadre d'une étude clinique qui vise à étudier les facteurs immunologiques associés au développement de colite post-Ipilimumab (anti-CTLA4) chez les patients atteints de mélanome, nous collectons les fèces 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 pathologie cancéreuse et post-Ipilimumab chez la souris, en étudiant la conséquence sur 1) l'implantation et la cinétique tumorales (lignées tumorales murines), 2) l'efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA4 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 de la thérapie ciblée et d'exclure le développement de colite.

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, les modèles de tumeur utilisés dans ce projet ont été développés chez la souris et sont indispensables 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 va être décrit pour 5 ans et nécessitera 4500 souris. 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 dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux.

1678- L'imagerie intravitale permet de réaliser le suivi spatiotemporel d'évènements biologiques à l'échelle de la cellule ou du tissu sur animal vivant. L'analyse d'un tissu au sein d'une chambre dorsale implantée chez la souris apporte des informations qualitatives et quantitatives sur les modifications vasculaires et structurales ainsi que sur les interactions cellulaires et moléculaires au cours du temps. Ce principe d'imagerie in vivo haute résolution a donc trouvé des applications dans de multiples domaines et particulièrement en cancérologie.

Notre projet a pour objectif d'optimiser le modèle de chambre dorsale que nous avons développé pour la visualisation macro et microscopique de la vascularisation et du microenvironnement tissulaire in vivo chez la souris. Ce modèle, très bien toléré par l'animal, a été validé en imagerie optique pour le suivi de processus biologiques (sains ou pathologiques) sur plusieurs semaines. Associée à des logiciels de traitement d'images, l'information visuelle est complétée par une cartographie de paramètres quantitatifs tels que la densité et le flux vasculaire par exemple.

Ce projet est donc de type méthodologique, et son but est de proposer des nouvelles méthodes d'exploration précises du développement et de la propagation du cancer.

Les marqueurs fluorescents employés jusqu'alors, identifiant uniquement le réseau vasculaire. Afin d'améliorer la compréhension des multiples processus pathologiques mis en jeu, et d'explorer plus de mécanismes mis en jeu, nous proposons d'associer d'autres biotraceurs pour l'identification des cellules (tumorales et saines) et leurs différents compartiments intracellulaires. De cette manière, la migration des cellules tumorales lors des processus de dissémination (propagation métastatique du cancer) pourra être étudiée et caractérisée. Par ailleurs, d'autres paramètres tels que la perfusion et la perméabilité vasculaire compléteront les données issues de l'optique une fois notre modèle validé en imagerie ultrasonore et IRM.

Plus spécifiquement, il s'agira de valider des biomarqueurs ou traceurs spécifiques des espaces vasculaire, membranaire, cytoplasmique et nucléaire, en microscopie optique. L'IRM permettra de caractériser notamment l'hypoxie et la perméabilité vasculaire tandis que l'échographie apportera des informations tissulaires et fonctionnelles quant à la perfusion tumorale (débit, résistance vasculaire et flux sanguin).

Le développement du cancer est une somme de processus physiopathologiques complexes découlant d'interactions vasculaire, tissulaire, cellulaire et moléculaire de la tumeur avec son microenvironnement. Ce nouveau modèle de chambres dorsales permet le suivi in vivo spatiotemporel du développement tumoral. Une cartographie précise de l'environnement tumoral au cours du temps pourra ainsi être obtenue. Ainsi, le recours à l'animal est indispensable afin d'améliorer la compréhension de ces multiples processus tant du point de vue développement du cancer mais aussi de ses capacités métastatiques. De telles modélisations ne sont pas possibles sans utilisation d'un organisme vivant entier.

Les méthodes d'imagerie proposées ici permettent un suivi longitudinal du même animal, qui est pour partie des observations, son propre témoin: ceci est un premier facteur de réduction. D'autre part, en fonction des résultats obtenus avec chacun des biomarqueurs, et si la première/deuxième dose testée permet d'obtenir des images satisfaisantes, la molécule sera validée et le(s) groupe(s) restants sera/ont abandonné(s): deuxième facteur de réduction.

Le nombre d'animaux a été déterminé en prenant un nombre minimal de 5 animaux par condition. Le nombre maximal (qui ne sera atteint que si des molécules ne sont pas validées précocément dès la première ou la deuxième dose testée) de souris utilisées sera de 150.

Un soin particulier a été porté au bien-être de l'animal. Ainsi la chirurgie sera pratiquée sous anesthésie générale et des analgésiques seront administrés. De l'enrichissement sera ajouté dans la cage au moment du change et de la nourriture gélatinisée sera mise à disposition après la chirurgie afin de favoriser la récupération. Les animaux seront surveillés quotidiennement et pesés au moins une fois/semaine. Leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress.

L'imagerie des animaux se fera sous anesthésie générale, 2 fois par semaine afin de caractériser les modifications anatomiques et fonctionnelles de la tumeur tout en respectant un temps de récupération suffisant entre 2 périodes d'acquisition. Lors des acquisitions d'images, les animaux seront placés dans des dispositifs thermostatés pour maintenir leur homéostasie. En cas de longue durée, les cornées seront humidifiées avec un gel adéquat.

1679- Les lésions consécutives à l'ischémie hépatique induite lors de la chirurgie sont une des causes d'échec lors d'une transplantation du foie chez l'homme.

De nombreux médicaments ou candidats médicaments présentent des caractéristiques physico-chimiques peu favorables au passage des barrières biologiques qui séparent le site d'administration du médicament de son site d'action. Ce problème peut être résolu grâce au concept de « squalénisation ». Ce concept consiste à coupler des principes actifs à une molécule lipophile (à 6 unités isoprènes) dérivée du squalène via une liaison covalente générant ainsi des prodrogues amphiphiles qui ont la capacité de s'auto-assembler spontanément en milieu aqueux sous forme de nanoparticules d'une centaine de nanomètres de diamètre, permettant ainsi leur administration par voie intraveineuse.

Les lésions consécutives à l'ischémie hépatique induite lors de la chirurgie sont une des causes d'échec lors d'une transplantation du foie chez l'homme.

Récemment, il a été montré que la squalénisation de l'adénosine (molécule hydrophile endogène à temps de demi-vie très court) permettait de régénérer des lésions consécutives à l'ischémie cérébrale. A l'occasion de cette étude, il a été observé que le traitement par les nanoparticules d'adénosine-squalène (Ad-SQ) permettait la production de concentrations importantes d'adénosine au niveau du tissu hépatique. Ces résultats amènent à penser que ces NPs pourraient avoir une action protectrice sur les cellules hépatiques. Dans ce contexte, nous formulons l'hypothèse que la « squalénisation » de l'adénosine permettra d'améliorer de manière notable la régénération du foie ischémié.

Ainsi, le but de cette étude est d'évaluer l'activité des nanoparticules d'adénosine-squalène sur le système hépatique, plus précisément l'action protectrice de cette molécule sur le foie suite à une ischémie hépatique totale.

Dans leur transport depuis le site d'administration, les nanomédicaments passent à travers et sont potentiellement modifiés par plusieurs organes et systèmes : ces multiples processus ne peuvent pas être reproduits in vitro.

En effet, la plupart des tests in vitro utilisent des cellules hépatiques d'origine tumorale dont le profil génétique entraîne des réponses ne reflétant pas la réalité clinique. Les cellules primaires ont tendance à perdre rapidement leur capacité métabolique. Enfin, ces cultures souffrent de l'absence du microenvironnement cellulaire (macrophage, cellules endothéliales) et structural du foie.

Il est donc impossible de les reproduire exactement en utilisant des systèmes de culture cellulaire, des modèles informatiques ou d'autres méthodes hors animal vivant.

De telles études doivent donc être menées sur des animaux afin de se rapprocher au maximum du contexte physiologique.

Des études préliminaires ont permis d'établir une dose optimale, seule dose testée dans ce projet les calculs suivants ont permis de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude, et pour avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Ce test sur dose unique prédéterminée permet déjà de réduire au maximum le nombre d'animaux pour répondre à la question.

Un calcul de puissance a été utilisé afin de déterminer le nombre d'animaux qui donne une chance de rejeter l'hypothèse d'absence de différence au niveau de signification de 0,05 à 80%.

Ceci a permis de calculer que 7 animaux par groupe seront nécessaires pour obtenir une puissance suffisante pour observer un effet. Le type de nanoparticules utilisées nécessite plusieurs groupes contrôles, à savoir, un groupe véhicule, un groupe adénosine seul, un groupe squalène seul et le groupe d'animaux traités avec l'adénosine-squalène.

Les données seront analysées selon une analyse de variance non paramétrique et une comparaison des groupes par un test de Kruskal-wallis avec un post test « Dunn's Multiple Comparison ». L'intervalle de confiance sera choisi à 95%

Cette évaluation se fera chez la souris adulte. En conséquence, le nombre total d'animaux utilisés pour ce projet sera de 72.

Les animaux seront hébergés en groupes stables formés d'animaux socialement compatibles.

La chirurgie sera pratiquée sous anesthésie générale et de la buprénorphine sera administrée avant le réveil puis 24h et 48h post-chirurgie. De l'enrichissement sera ajouté dans la cage au moment du change et de la nourriture gélatinisée sera mise à disposition après la chirurgie. Les animaux seront pesés et surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress.

1680- Les tumeurs cérébrales constituent la première cause de mortalité et de morbidité par cancer chez l'enfant et l'adulte jeune. Les gliomes malins infiltrants du tronc cérébral (ou DIPG), qui représentent 10 à 15% des tumeurs cérébrales pédiatriques, sont les formes les plus graves et les plus mal connues sur le plan biologique. Ces tumeurs sont universellement incurables et constituent le plus grand défi thérapeutique de l'oncologie pédiatrique à ce jour.

Nous avons initié un programme de recherche pour caractériser ces tumeurs et montré qu'elles sont très différentes des gliomes de l'adulte et des tumeurs corticales de l'enfant. Des mutations originales de l'histone H3, quasi-constantes dans les DIPG et jamais décrites dans aucun autre type de cancer, ont été découvertes. Il s'agit donc d'un mécanisme oncogénique complètement inédit et intimement lié au développement de cette partie du cerveau. Par ailleurs, les DIPG ne forment jamais de masse tumorale, mais infiltrent les structures cérébrales normales puis se disséminent dans la totalité du cerveau.

Actuellement, peu de modèles d'étude de ces maladies sont disponibles et l'exploration de l'activité de nouveaux médicaments reste encore très limitée. Nous avons récemment réussi à développer trois modèles de DIPG à partir de lignées cellulaires souches cancéreuses établies à partir de prélèvements tumoraux de patients atteints de DIPG, ou encore à partir de biopsies. Ces cellules bioluminescentes peuvent être suivies au cours du temps par imagerie limitant ainsi le nombre d'animaux employés dans l'étude.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'activité antitumorale in vivo de deux molécules: le bortezomib et le mebendazole qui ont récemment montré une efficacité très forte contre des lignées primaires de cellules dérivées de DIPG. Ces deux médicaments sont apparus comme les plus actifs parmi les 4500 évalués dans un crible in vitro.

Les traitements seront évalués dans les trois modèles disponibles à raison de 10 souris /groupe et de deux doses par médicament et comparés à une chimiothérapie standard : l'irinotecan qui constitue un contrôle, soit trois groupes par médicament en incluant leur propre véhicule. En cas d'efficacité, les évaluations seront reproduites une fois pour confirmation, ce qui conduit à un nombre d'animaux total de 504 pour le projet en incluant le nombre de souris greffées.

L'activité des traitements pré-cités a été validée in vitro. Nous souhaitons confirmer cette activité à dose faible <100nM in vitro par des expériences in vivo afin de déterminer si, sous les seuils de toxicité, ces traitements présentent une dose active dans nos modèles orthotopiques (tumeurs in vivo dans le site naturel) de DIPG .

L'évaluation de l'efficacité sera déterminée à l'aide de test non-paramétriques de type Kruskal Wallis, et 10 animaux/groupe seront suffisants pour valider l'analyse. Les procédures seront réalisées sous anesthésie gazeuse et une analgésie (anti-inflammatoire) sera pratiquée en post-opératoire et dès l'apparition d'au moins un signe clinique pour éviter toute souffrance. Les points limites seront strictement appliqués. Les animaux sont stabulés en groupe et le milieu est enrichi.

1681- Il est maintenant bien établi que le cerveau conserve tout au long de la vie, la capacité de se régénérer en produisant de nouveaux neurones même à l'âge adulte. L'hypothalamus qui contrôle les principales fonctions biologiques dont la reproduction est aussi capable de se régénérer. Toutefois, nous ne savons pas précisément le chemin de migration qu'empruntent les jeunes neurones produits dans l'hypothalamus. L'objectif du projet que nous proposons est d'étudier la migration dans le cerveau des nouveaux neurones produits dans l'hypothalamus de brebis. Dans ce projet nous proposons une approche qui utilise une technique de neuroimagerie (IRM) réalisée chez des brebis à des temps différents. Ce protocole permettra de suivre le déplacement des nouveaux neurones au cours du temps.

Remplacer : Cette étude ne peut être réalisée qu'in vivo, car les mécanismes de migration des cellules ne peuvent pas être étudiés ni reproduits in vitro et encore moins in silico.

Réduire : Neuf brebis seront impliquées dans ce protocole car il s'agit d'une expérience préliminaire. Toutefois, neuf animaux sont nécessaires parce que nous ne pouvons pas écarter la perte d'un animal au cours de l'expérience qui s'étale sur 6 mois.

Raffiner : Les neuf brebis constituant le groupe d'animaux expérimentaux seront maintenues ensemble au sein d'un environnement social stable, dans des conditions adaptées aux herbivores, litière de paille et foin ad libitum. L'état général des animaux sera suivi bi-quotidiennement.

1682- Le traitement de la douleur reste un sujet d'actualité puisque malgré l'efficacité reconnue de certains analgésiques, ceux-ci ne sont pas efficaces sur tous les types de douleur. D'autre part des médicaments traitant une pathologie peuvent s'avérer avoir en plus des propriétés analgésiques leur donnant un intérêt supplémentaire, d'où la mise au point de différents modèles de douleur chez l'animal. L'activité analgésique d'un composé ne peut être mise en évidence que chez l'animal soumis à un stimulus douloureux. La douleur ne pouvant être évaluée sur des modèles in vitro, le recours à l'animal est donc inévitable. Dans le cadre de notre projet, des modèles permettant la mise en évidence de l'activité analgésique de composés sont déjà développés chez le rat et devront l'être chez la souris. En effet, l'intérêt d'étudier les deux espèces est qu'il existe une différence de récepteurs à certaines molécules entre ces espèces pour lesquelles il peut y avoir un effet chez la souris mais aucun chez le rat. Ces modèles sont bien documentés dans la littérature scientifique et certains sont déjà en place au laboratoire pour le rat. La mise au point des modèles ne concernera donc que la souris. Des molécules de référence sont connues pour ces modèles et permettent de les calibrer et ainsi de réduire le nombre d'animaux nécessaires à la mise au point, ainsi que le nombre de dose à tester pour évaluer l'efficacité d'un composé. Deux modèles sont utilisés, un de douleur aiguë (de courte durée) provoqué par un agent chimique et un autre de douleur chronique induit par une lésion chirurgicale. Le second modèle ne sera utilisé que pour tester des composés efficaces dans le premier, ceci afin de soumettre un minimum d'animaux au modèle le plus long. Les animaux sont hébergés en groupe avec un enrichissement dans leurs cages. Ils seront observés, pesés tout au long des études afin d'écarter tout animal atteignant les points limites définis pour décider de son euthanasie.

Une estimation de 6100 souris et de 4600 rats est proposée sur les 5 ans de validité du projet.

1683- La génération de souris et de rats génétiquement modifiés est indispensable pour l'analyse fonctionnelle de gènes, pour la génération de modèles de maladies, pour le développement de médicaments et pour des applications biotechnologiques.

Le choix du rat présente pour de nombreuses études de plus fortes similitudes immunologiques et génétiques avec l'homme que la souris. Et il a été précédemment démontré que certains modèles de rats transgéniques ou KO reproduisent mieux les pathologies humaines que les modèles souris existants (ex: HIV, HLA B27, DMD...)

Notre plateforme est la seule structure académique produisant à façon des rats transgéniques, KO ou KI pour des partenaires académiques ou privés qu'ils soient français ou étrangers.

Suite à l'avancée depuis les 4 dernières années, des techniques d'ingénierie du génome (ZFNs, Talens, CRISPR/cas9) qui ont permis la création de modèles de rats KO et KI, cela permet à de nombreux chercheurs d'envisager la création de nouveaux modèles.

Nous limiterons donc au maximum le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans à 7846 rats (femelles et mâles). Les procédures mises en place nous permettront d'optimiser la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner). Nous allons donc pour cela réutiliser dans d'autres protocoles certains animaux non utilisés dans ces procédures. Nous prendrons en compte tous les éléments nécessaires afin de limiter au maximum la douleur de l'animal.

1684- La prolifération rapide des tumeurs nécessite un apport excessif de nutriments et d'oxygène nécessaire pour leur croissance. Des agents anti-angiogéniques et/ou anti-vasculaires sont utilisés afin de réduire voire arrêter ces apports en ciblant les vaisseaux qui alimentent ces tumeurs, ce qui freine par la suite la croissance de ces tumeurs.

Malheureusement, l'effet de ces agents sur ces tumeurs n'est pas maîtrisé en clinique et seulement une partie des patients qui reçoivent ces types de traitements montrent une réponse significative. L'évaluation de l'efficacité du traitement en mesurant la taille de la tumeur (en clinique) se révèle parfois tardive ; le défi est de valider des biomarqueurs qui sont prédictifs à la réponse de ce genre de thérapies. Ce projet préclinique a donc comme objectif de montrer par IRM multiparamétrique la sensibilité des méthodes récemment développées dans notre équipe à détecter des changements. On utilise des biomarqueurs comme le volume sanguin, la perméabilité des vaisseaux et les paramètres de diffusion de l'eau pour réaliser un suivi longitudinal en présence de thérapies anti-angiogéniques et/ou anti-vasculaires. Le but final est de pouvoir prédire précocement l'efficacité du traitement.

Ce projet est une continuité du travail déjà réalisé. En effet, nous avons récemment validé dans notre équipe des méthodes pour mesurer ces biomarqueurs chez les rats et les souris.

Ce travail sera donc consacré à évaluer ces paramètres en présence de ces traitements qui seront administrés par différentes voies. Une fois la capacité de ces biomarqueurs à détecter une différence par rapport aux sujets contrôlés validée, une étude longitudinale sera envisagée afin d'étudier la relation entre ces paramètres et la réponse tumorale au cours du traitement dans le but de prédire une réponse précoce à ce genre de traitement en fonction du mode d'administration.

Notons que l'IRM est la seule technique non invasive qui permet des études in vivo et que toute validation préclinique a un potentiel non négligeable d'être transférée en clinique. Notre protocole d'IRM a plus d'avantage par rapport à d'autres protocoles IRM car 1) on utilise le Gd-DOTA comme agent de contraste approuvé en clinique, 2) la quantification du volume sanguin de la tumeur est absolue et non relative par rapport à d'autres régions. En même temps, cette méthode donne deux paramètres qui évaluent la perméabilité des vaisseaux et le volume de l'extravasation de l'agent de contraste dans le compartiment extravasculaire.

Dans ce projet et c'est une conduite de base, tous les efforts sont faits par les expérimentateurs pour réduire le nombre d'animaux (conformément au décret 2013-118 et de ses arrêtés d'application) tout en assurant un niveau de significativité statistique des résultats scientifiques attendus. 136 rongeurs devront être impliqués dans ce protocole (ce nombre tient compte des pertes pouvant être engendrées au cours des différentes procédures expérimentales). De plus, pendant toute la durée de l'expérimentation, nous prendrons toutes les dispositions pour réduire au maximum le malaise, la douleur et l'angoisse des rongeurs.

1685- Ce projet a pour but d'apporter de nouvelles connaissances biochimiques concernant le fonctionnement normal de nos cellules, en particulier des mécanismes qui permettent l'expression des gènes. Le complexe TFIID est un assemblage de 14 protéines qui est indispensables à la lecture des gènes. Les études récentes montrent qu'il existe en fait plusieurs types de complexes TFIID. Nous nous intéressons à une de ces sous unités dont la présence est indispensable pour la transcription dans l'embryon mais pas chez l'adulte.

Ce projet s'inscrit dans un cadre de recherche qui cherche à comprendre pourquoi il existe différents types de complexes protéiques impliqués dans la lecture des gènes, à différents moments de la vie ou dans différents types cellulaires. Un point important est que la vision que nous avons de ces complexes protéiques a été obtenue, in vitro, à partir de cellules issues de cancers autrement dit, des cellules malades et anormales. Il est donc important d'étudier ces questions dans des conditions physiologiques et normales, autrement dit, dans ces cellules en bonne santé. Notre modèle est le développement embryonnaire puisque le contrôle précis de l'expression des gènes est primordial pour la construction d'un nouvel organisme. Nous nous intéressons à la souris parce que c'est le seul modèle mammifère dans lequel il est possible de générer des mutations.

Ce projet a pour but de générer des embryons mutants en vue de réaliser différents types d'expériences de biochimie et de biologie moléculaire. Etant donné que les approches biochimiques nécessitent beaucoup de matériel, nous proposons ce

projet qui permet d'obtenir 100% d'embryons mutants par portée contre 25% par croisement classique. Le principe est d'induire la mutation suite à l'injection intra-péritonéale d'une molécule permettant de muter spécifiquement notre gène d'intérêt.

Etant donné que les embryons sont notre source première de matériel biologique, ce projet nécessitera 4660 souris maximum pour une période de 5 ans. Ce nombre élevé tient compte de la maintenance et de la production de différents types de souris sur cette période. Seulement 456 souris seront utilisés dans le cadre des procédures faisant l'objet de cette saisine.

Réduction: l'objet principal de cette saisine est une technique permettant de collecter 4 fois plus d'embryons mutants par rapport à un croisement classique (donc de réduire le nombre de femelles nécessaires)

Raffinement: les procédures se résument à une injection non douloureuse qui ne nécessite pas de briser l'environnement social des souris

Remplacement: nous développons aussi en parallèle des systèmes de culture ex vivo non issus de cancer comme sources alternatives de cellules.

1686- La néosporose est une maladie infectieuse à fort impact économique et sanitaire en santé vétérinaire. Elle est provoquée par un parasite *Neospora caninum* et est la cause de 10 à 20% des avortements dans les cheptels de ruminants (principalement chez les bovins). La séroprévalence dans les cheptels est d'environ 16% pour les vaches à lait et 11% pour les vaches à viande.

La contamination des bovins peut se faire selon deux modes principaux. Les vaches peuvent s'infecter en ingérant de l'herbe ou des aliments souillés par des déjections de chiens infectés contenant des oocystes : on parle alors de contamination horizontale. Si la vache est gestante, elle risque d'avorter dans 80% des cas et si elle donne naissance à un veau, il sera quasi systématiquement parasité. Ce passage du parasite de la mère au veau constitue la seconde voie de contamination possible dite verticale. Dans ce cas de figure, la contamination verticale est dite exogène car le parasite est ingéré par la mère. Si la vache est remise à la reproduction, elle peut au cours des gestations suivantes soit de nouveau avorter, soit donner naissance à un veau sain, ou plus souvent transmettre le parasite à son veau. On parle alors de contamination verticale endogène : la mère est déjà infectée avant la gestation et les parasites se multiplient pour aller contaminer le fœtus. Si ce veau est une femelle gardée pour le renouvellement elle aura un risque d'avorter en première gestation et si elle donne naissance à un veau, il sera quasi systématiquement parasité, dans 9 cas sur 10, également par contamination verticale endogène. La néosporose peut donc se transmettre de génération en génération et cette voie de contamination est la voie principale en élevage et celle qui pérennise l'infection dans le troupeau.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccin efficace contre la néosporose bovine puisque l'unique vaccin (i.e. le vaccin NeoGuard© de Merck) n'a jamais été commercialisé en Europe, dû à son manque d'efficacité chez les animaux vaccinés.

Nous disposons aujourd'hui d'un candidat vaccin efficace contre la contamination verticale exogène mais également contre la contamination verticale endogène quand la mère a été infectée préalablement à la gestation. Dans ce projet, nous souhaitons évaluer l'efficacité de notre candidat vaccin à réduire le taux de contamination verticale endogène après une infection in utero de la mère. Cette expérience, réalisée chez la souris, doit nous permettre de mimer au mieux les situations rencontrées dans les élevages.

Les effectifs de souris inclus dans ce projet ont été validés afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, étant donné qu'aucune méthode de substitution n'est disponible. Les animaux seront suivis tout au long de l'expérimentation afin de réduire au maximum la souffrance animale engendrée dans ce protocole.

Pour mener à bien ce projet, le nombre d'animaux à inclure dans l'expérimentation est de 336 souris adultes femelles et mâles et de 1000 souriceaux environ.

1687- Les Apicomplexes sont des parasites responsables de maladies à fort impact sanitaire et économique en santé humaine (toxoplasmose, paludisme) mais également en santé vétérinaire (toxoplasmose, cryptosporidiose, néosporose).

Actuellement, nous disposons de 2 souches vaccinales ayant démontré une excellente protection contre la toxoplasmose et la néosporose. Nous développons depuis plusieurs années des procédés de conservation de ces souches (projets ayant reçus d'ores et déjà l'autorisation du comité d'éthique). Ces expérimentations nous ont permis de démontrer qu'il était possible d'obtenir des parasites lyophilisés vivants et infectieux. Des études d'optimisation afin d'améliorer l'efficacité vaccinale des parasites lyophilisés, ainsi que des études d'innocuité devront être réalisées chez l'animal afin de pouvoir déposer un dossier d'enregistrement pour chacune de nos souches.

Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons identifier une formulation et un procédé de lyophilisation qui permettent d'obtenir une efficacité et une innocuité optimales de nos souches associées à une stabilité satisfaisante dans le temps.

En l'absence de méthodes de substitution, le modèle murin reste indispensable. Le nombre d'animaux inclus dans ce projet est réduit au maximum. Les animaux sont suivis tout au long du projet et les conditions d'hébergements sont optimisées afin de réduire le stress des animaux.

Ainsi, pour cette étude, nos besoins en souris sont estimés à 2100 souris pour un projet d'une durée de 5 ans.

1688- Le cancer du poumon, dont on distingue deux formes: à petites cellules et non à petites cellules (le plus fréquent), est le cancer le plus meurtrier dans le monde. Son incidence est en constante augmentation (près de 40000 nouveaux cas en France en 2012). En l'an 2020, il correspondra à la cinquième cause de mortalité dans le monde, avant les cancers du sein, du colon et de la prostate réunis. Son pronostic est toujours largement conditionné par la possibilité d'en effectuer une exérèse chirurgicale, mais celle-ci n'est possible que lorsqu'il est encore peu étendu (1/3 des patients environ). Toutefois, même dans

ces cas, en association ou non avec une chimiothérapie et/ou une radiothérapie adjuvante, le pourcentage de guérison reste très faible, sans parler des formes étendues non opérables, en particulier avec extension métastatique, sur lesquelles la chimiothérapie a peu d'effet. Le pronostic global est donc très mauvais, la survie à 5 ans ne dépassant pas 15%.

Dans ce contexte, l'immunothérapie suscite un grand intérêt. Son objectif est d'amplifier la réponse du système immunitaire contre les cellules cancéreuses. Cette réponse existe souvent dans le cancer du poumon, avec l'apparition de lymphocytes (une classe de globules blancs) capables de tuer les cellules malignes, mais son efficacité est très faible. Ceci tient vraisemblablement au microenvironnement très particulier que crée la tumeur autour d'elle, ce qui altère l'activité de ces cellules immunitaires.

Les avancées récentes dans notre compréhension de la régulation des fonctions des cellules T ont permis l'émergence de nouvelles immunothérapies anti-tumorales. Ainsi, plusieurs thérapies fondées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux, tels que anti-CTLA-4 ou anti-PD1, ont montré un bénéfice clinique dans plusieurs cancers, y compris le cancer du poumon. Néanmoins, bien que ces traitements aient permis d'améliorer la survie de certains patients, le taux de réponse reste limité dû aux mécanismes développés par la tumeur pour inhiber les fonctions immunitaires. Nous avons identifié des facteurs du microenvironnement tumoral impliqués dans la régulation des activités des lymphocytes T cytotoxiques. Ce sont des molécules qui influencent de manière opposée l'activité des lymphocytes. En effet, alors que l'une améliore les capacités des lymphocytes à tuer les cellules tumorales, la deuxième, au contraire, inhibe ces fonctions.

Les objectifs de ce projet consisteront à :

- 1) Déterminer le rôle exact de ces molécules dans les fonctions effectrices des lymphocytes T.
- 2) Élucider leurs rôles dans la fonctionnalité des lymphocytes T et dans les thérapies anti-tumorales dans des expériences in vivo dans un modèle de souris.

Nous étudierons la croissance tumorale et l'infiltrat immunitaire des tumeurs.

Les expérimentations in-vivo seront réalisées toutes les 6 semaines pour nous permettre d'analyser les résultats et de modifier le protocole suivant les résultats précédents obtenu in-vivo et in-vitro afin de réduire le nombre d'expériences.

Ce type d'expérience ne peut se faire in vitro car la mécanistique est trop complexe pour reconstruire un microenvironnement adéquat pour le développement des tumeurs et étudier précisément l'interaction du système immunitaire avec la tumeur. Cependant une étude sera réalisée en parallèle sur des échantillons tumoraux humains afin de renforcer les résultats obtenus dans le modèle murin.

- Pour les protocoles expérimentaux d'infiltration des lymphocytes dans les tumeurs, le nombre de souris utilisées sera de 5 par groupe.

- Pour les protocoles expérimentaux de suivie de la croissance tumorale, 10 souris par groupe seront utilisées.

Le test statistique ANOVA ou t-test sera réalisé pour permettre de comparer les moyennes entre chaque groupe de souris. Ces tests nous permettront d'être statistiquement significatif malgré le nombre assez faible d'animaux utilisés par lot. Les expériences seront répétées de manière indépendante au maximum 3 fois. Lorsque la variation des valeurs de croissance tumorale parmi les souris d'un même groupe est faible, l'expérience ne sera réalisée que deux fois.

Nous estimons à 760, le nombre de souris permettant de réaliser ces expériences.

Les animaux recevant des injections directement dans les tissus bénéficieront d'un protocole antalgique au décours de ces injections (buprénorphine).

Notre programme vise à améliorer les immunothérapies anti-cancéreuses actuelles en optimisant le recrutement des globules blancs dans les tumeurs et en dopant leurs fonctions cytotoxiques afin d'éliminer toutes les cellules tumorales.

1689- L'embolisation est une technique de radiologie interventionnelle qui a pour but de boucher les vaisseaux sanguins qui constituent ou qui nourrissent une lésion, ou de boucher une lésion portée par un vaisseau.

La nature des lésions à emboliser est très variable : malformations vasculaires, lésions hémorragiques, tumeurs hypervasculaires.

Différents types d'agents occlusifs peuvent être utilisés : particules solides calibrées ou non, liquides qui se solidifient dans la lésion, solutions sclérosantes ou encore microspires. Le choix de l'agent d'embolisation est principalement déterminé par la nature de la lésion. Par exemple, les microspires ou coils, sont utilisés pour l'embolisation des anévrismes intracrâniens en neuroradiologie, et en périphérique pour l'embolisation de larges sections vasculaires dans le cas d'hémorragie, anévrisme, malformation artério-veineuse ou tumeur hypervasculaire.

Le projet soumis vise à la formation des radiologues aux techniques d'embolisation endovasculaire, afin de :

- connaître les différents types d'agents d'embolisation disponibles,
- connaître les indications anatomiques/cliniques de chaque type de produit,
- être capable d'utiliser dans différentes configurations vasculaires (diamètre, flux, compliance, territoire irrigué) les différents types d'agents.

La formation se déroule sur 1 journée. Elle est assurée par un radiologue ou neuroradiologue interventionnel expérimenté dans l'utilisation des agents d'embolisation pour 3 à 6 cliniciens français ou étrangers par session. Elle comporte une partie théorique présentant les différents types de dispositifs disponibles et leurs applications respectives et une partie pratique où les radiologues sont formés à l'utilisation des produits dans différentes situations vasculaires sur le modèle animal.

L'expérimentation se fera sur des moutons adultes, l'espèce présentant des similitudes satisfaisantes avec l'homme en termes de taille, d'anatomie et physiologie vasculaires.

La procédure est unique et réalisée sous anesthésie générale. Elle consiste à accéder puis à occlure les vaisseaux de différents territoires anatomiques avec différents types d'agents d'embolisation. L'animal n'est pas réveillé à la fin de la procédure. Le projet portera sur un nombre maximum de 50 animaux pour les 5 années de la demande d'autorisation de projet.

Principe des 3R :

- Remplacement : La procédure d'injection ainsi que le comportement de l'embolie après son injection sont liés au vaisseau et au flux sanguin et notamment au calibre, à la tortuosité, compliance, flux vasculaire. La formation à leur utilisation ne peut se faire sur banc in vitro et nécessite un modèle animal vivant.
- Réduction : Le nombre total d'animaux utilisés est estimé à 10 par année, sur la base d'un animal par session de formation et 10 sessions de formation par an. Le nombre de participants à la formation est classiquement de 5 médecins, permettant de former environ 50 médecins par an. Les animaux utilisés seront de préférence des animaux anciennement utilisés pour l'élevage et la reproduction et passés en réforme.
- Raffinement : La procédure unique est réalisée sous anesthésie générale, sans réveil de l'animal.

1690- La migraine est une pathologie qui a un fort impact sur la santé publique (12-15% de la population touchée). Les traitements proposés ont une efficacité limitée, surtout au stade chronique de la maladie. Le développement et l'évaluation des effets antalgiques de nouvelles molécules est indispensable pour l'amélioration des thérapeutiques. Il a été montré récemment chez le rongeur que des protéines extraites à partir de venin de serpent (mambalgines) avaient un fort potentiel antalgique (supérieur à la morphine et sans ses effets secondaires) en bloquant certains canaux senseurs de pH (ASIC).

L'objectif de ce projet est d'évaluer un bloqueur de ces canaux, chez le rat male, dans un modèle de chronicisation de la migraine par injections intrapéritonéales (i.p) répétées d'isosorbide dinitrate (ISDN), connu comme un donneur de monoxyde d'azote vasodilatateur et qui déclenche chez l'homme des crises de migraines. Une des signatures comportementales du passage au stade chronique de la migraine est l'hypersensibilité (à la douleur) mécanique cutanée appelée allodynie qui représente en plus de la douleur spontanée un symptôme très handicapant pour les malades. Nous proposons donc de tester les effets d'un bloqueur des canaux ASIC sur la réponse motrice nociceptive à la stimulation mécanique (retrait de la patte et de la face) de rats soumis à 1 (stade aigu) ou 5 injections répétées (stade chronique) de ISDN. Pour ce projet et afin de respecter la règle des 3R nous utiliserons un nombre limité de rats et de groupes tout en gardant significativité des résultats via une analyse statistique adaptée (analyse de variance suivi d'un test post-hoc paramétrique si distribution normale ou test non paramétrique dans le cas contraire. Le nombre de rats par groupe a été fixé à 10 en tenant compte du fait qu'en moyenne, d'après les études précédentes, 20 % des rats ne sont pas répondeurs à l'ISDN. Connaissant par les études antérieures, l'effet allodynique de l'injection systémique d'ISDN comparée à celle de serum physiologique, ce groupe témoin ne sera pas répété dans ce projet (3R). 4 groupes de rats seront utilisés dans 2 conditions : 2 groupes témoins (injection ISDN + injection de sérum physiologique) et 2 groupes tests (injection ISDN + injection bloqueur ASIC). Pour les 2 groupes témoins, 1 sera testé suite à une seule injection d'ISDN et l'autre suite à 4 injections d'ISDN répétées (1/jour). Pour les 2 groupes test, il en sera de même. Au total 40 animaux seront utilisés dans ce projet. Tous ces animaux seront mis à mort à la fin de la procédure par injection létale d'anesthésique. Le test de sensibilité mécanique respecte les règles éthiques édictées par l'international association for the study of pain puisqu'il permet l'échappement de l'animal vis à vis du stimulus qui présente d'autre part une durée très courte (douleur évoquée de faible intensité à modérée) : 3 sec par stimulation mécanique. L'étude centrée sur la sensibilité à la douleur ne nous permet pas d'utiliser des antalgiques qui pourraient constituer un biais significatif aux résultats attendus. Cependant toute observation de signes (points limites) tels que la prostration, paralysie, convulsions, perte de poids >15%, apathie... mettraient fin à l'expérimentation pour ces animaux par une mise à mort.

Par ce projet, nous entendons caractériser chez le rat si le bloqueur ASIC possède un pouvoir antalgique efficace dans la douleur (allodynie) migraineuse aussi bien au stade aigu que chronique.

1691- Actuellement, l'hébergement des porcelets en loges individuelles est impératif pour pouvoir mesurer la consommation individuelle d'aliment et calculer les performances dans le but de suivre les effets sur l'animal (prélèvements sanguins ou de tissus et organes après euthanasie) de l'utilisation de matières premières spécifiques, d'additifs ou de la qualité sanitaires des aliments. Des nouvelles technologies de mesure par le biais de capteurs apparaissent, y compris dans les élevages de porcs. Ces technologies, qu'il faudra adapter au porcelet, pourraient permettre de mesurer la consommation individuelle dans des logements collectifs. Dans le cadre de l'évolution des normes réglementaires d'hébergement des porcs en expérimentation à l'horizon 2017, nous souhaitons réaliser un essai nous permettant de comparer les performances de porcelets logés en groupe par rapport à des loges individuelles et cela dans un dispositif permettant de comparer deux présentations de l'aliment (farine vs. granulé). Ces premiers éléments nous permettront de faire des choix avant d'engager d'importants travaux de rénovation dans notre station. Dans ce type de protocole, l'utilisation de l'espèce d'élevage est indispensable, puisqu'il s'agit de la cible directe de la thématique. Une seule procédure expérimentale est nécessaire à ce projet : un hébergement en loge individuelle, mais pour la moitié des porcelets uniquement, soit 48 porcelets. Au total, 96 porcelets seront utilisés. L'objectif principal de l'essai est la prise en compte des 3R, et en particulier le raffinement des conditions d'hébergement. Le dispositif statistique a été élaboré par le service d'études méthodologiques et statistiques pour permettre de comparer les performances obtenues en loges individuelles (ancien dispositif) ou collectives (dispositif testé). Pendant l'essai, tous les animaux disposeront d'un objet d'enrichissement (chaîne et/ou ballon).

1692- De nos jours encore, le pronostic des patients atteints de tumeurs cérébrales primitives reste très péjoratif. La survie médiane des patients atteints de gliomes de haut grade varie de un à six ans. L'échec des traitements actuels s'explique d'une part par les difficultés à obtenir une exérèse chirurgicale complète de ces tumeurs hautement infiltrantes, et d'autre part du fait du faible taux de pénétration des drogues couramment utilisées non seulement dans la tumeur, mais également dans le tissu cérébral adjacent au sein duquel surviennent près de 80% des récurrences. Le gliome infiltrant du tronc cérébral (DIPG) est une tumeur qui atteint le jeune enfant. A la différence d'autres gliomes de haut grade de l'enfant, celle-ci est caractérisée par sa localisation dans le tronc cérébral, son profil infiltrant et elle est à ce jour incurable. Nous avons récemment des modèles de ces tumeurs dérivées de patients (PDX) chez la souris pour permettre de mimer le développement de cette maladie.

Cette faible pénétration est liée à l'existence de la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui tapisse la microvascularisation cérébrale et se compose de cellules endothéliales intimement liées entre elles par des jonctions serrées. Cette barrière physiologique empêche environ 98% des petites molécules et 100% des grosses molécules d'atteindre le parenchyme cérébral. Différentes techniques ont déjà été développées afin d'augmenter la perméabilité de la BHE. Parmi elles, les ultrasons pulsés en association avec un agent de contraste ultrasonore ont déjà prouvé leur capacité à ouvrir la BHE de manière transitoire (entre 6 et 8 heures), sans dommage induit sur le tissu cérébral.

L'objectif de ce projet est d'améliorer la biodisponibilité du panobinostat et du dasatinib dans le cerveau en ouvrant la barrière hémato-encéphalique pour améliorer la fenêtre thérapeutique. Pour cela nous allons réaliser une cinétique des molécules d'intérêt dans nos modèles puis vérifier que l'activité anti-tumorale de nos médicaments est supérieure quand la BHE est ouverte et n'entraîne pas de toxicité majeure. La méthode par ultrasons défocalisés qui sera employée pour ouvrir cette BHE est déjà décrite et publiée par l'équipe avec laquelle nous collaborons et nous ne détaillerons donc pas les mécanismes d'ouverture qui ne sont pas l'objet de ce travail. Néanmoins, nous adapterons réglages à nos modèles si nécessaire.

Pour réaliser cette étude, nous prévoyons d'utiliser au maximum 360 souris swiss nude. La cinétique des molécules de traitement sera évaluée chez l'animal sain et dans un modèle de DIPG à raison de 5 souris par point de cinétique. L'activité antitumorale sera évaluée chez l'animal malade à raison de 10 souris par groupe ce qui conduit à un nombre d'animaux total de 380 en incluant le nombre de souris greffées. L'ensemble des procédures sera réalisé dans le respect de la règle des 3R et du bien-être de l'animal. L'utilisation de l'animal est indispensable pour évaluer une cinétique de diffusion de médicaments dans le cerveau et est obligatoire d'un point de vue réglementaire pour suggérer une nouvelle indication. Nous avons réduit le nombre d'animaux au minimum pour valider nos résultats statistiquement. L'évaluation de l'efficacité sera déterminée à l'aide de courbes de survie (Kaplan Meier), avec application des points limites. Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie et une analgésie ou une mise à mort sera pratiquée dès l'apparition d'un point limite.

1693- La ventilation mécanique est l'un des outils principaux utilisée quotidiennement en réanimation ou au bloc opératoire. Elle permet de maintenir l'hématose à des niveaux compatibles avec la survie, en particulier au cours du Syndrome de Détresse Respiratoire Aigu (SDRA), dont la mortalité est encore actuellement de 30% environ. Cependant, le stress mécanique appliqué au parenchyme lié à l'utilisation de réglages ventilatoires inadaptés s'associe au développement d'une agression pulmonaire constituant les lésions induites par la ventilation mécanique (VILI – ventilator-induced lung injury), à l'origine d'une majoration de la morbi-mortalité de la défaillance respiratoire initiale.

Le bio-trauma pulmonaire ainsi déclenché entraîne le recrutement de cellules immunitaires par chimiotactisme telles que macrophages ou neutrophiles. L'agression pulmonaire induite par la ventilation mécanique est donc un enjeu majeur de la qualité des soins en réanimation et justifie le développement d'outil d'exploration dynamique de ses lésions.

Cette agression pulmonaire induite par la ventilation mécanique pourrait être réduite par la diminution du volume courant ou la ventilation en décubitus ventral.

La Tomographie par Emission de Positron (TEP) couplée au scanner est une technique d'imagerie fonctionnelle permettant l'évaluation dynamique de processus métaboliques actifs (inflammation, néoplasie, infection...). Les radio-isotopes actuellement disponibles comme le fluoro-désoxyglucose marqué au Fluor-18, bien que sensibles, sont peu spécifiques des mécanismes inflammatoires qui sont à l'origine de cette agression pulmonaire.

Le 11C-PK11195 est un radiomarqueur à demi-vie courte (20 minutes) utilisé comme ligand spécifique de la protéine de translocation retrouvée au sein des neutrophiles et macrophages, et dont la captation est augmentée dans les tissus sièges d'une réaction inflammatoire. Il n'a toutefois jamais été étudié dans le contexte du VILI.

Nos objectifs principaux sont :

1. D'évaluer la pertinence du 11C-PK11195 dans l'évaluation de l'agression pulmonaire d'origine inflammatoire induite par la ventilation mécanique sur poumon sain.
2. D'étudier la pertinence du 11C-PK11195 pour évaluer l'agression pulmonaire induite par la ventilation mécanique sur poumon préalablement agressé.
3. D'évaluer les effets du décubitus ventral sur l'inflammation pulmonaire régionale.

L'utilisation d'animaux vivants permet l'étude de la ventilation mécanique et la respiration en tant que phénomène physiologique et ne peut pas être remplacée par des méthodes in vitro.

25 porcs seront étudiés au total, modèle le plus proche de l'homme de par son anatomie et sa physiologie. Nous utiliserons 5 groupes de 5 animaux qui est le minimum pour démontrer des différences statistiques.

Les porcs sont hébergés individuellement dans un enclos d'une surface de 4,5m². Eau et nourriture ad libitum, des jouets sont mis à disposition. La livraison de l'animal s'effectue au minimum 4 jours avant l'expérimentation. Les animaux sont visités plusieurs fois par jour par le personnel de zootechnie.

1694- L'objectif de notre étude préclinique est d'obtenir un greffon osseux d'origine synthétique, vascularisé, de taille et de volume souhaité puis de le greffer secondairement au niveau d'une perte de substance osseuse.

Pour cela nous nous sommes intéressés au modèle de boucle vasculaire. Il s'agit d'une anastomose entre une artère et une veine pour former une boucle vasculaire qui permettra de vasculariser le greffon. Les études précliniques réalisées à ce jour sont nombreuses et sur de multiples modèles (rat, lapin, chien). Nous nous sommes intéressés au modèle de gros animal en choisissant celui de la brebis puisqu'il s'agit d'un très bon modèle animal de reconstruction et de remodelage osseux.

Remplacement : nous ne pouvons étudier cette technique de greffe ex vivo, les mécanismes physiologiques de cicatrisation osseuses sont complexes et impossibles à ce jour à reconstituer entièrement.

Réduction : Selon les recommandations internationales un minimum de 2 brebis par groupe est nécessaire pour permettre d'effectuer des tests statistiques. Nous avons prévu 5 animaux par groupe à cause de pertes prévues initialement du fait de la complexité de la chirurgie. Un total de 20 brebis a été inclus.

Raffinement : Notre étude prévoit une surveillance régulière de la consolidation osseuse et de la vascularisation du greffon à l'aide de différentes techniques d'imagerie non ou peu invasives et largement utilisées chez l'Homme. Nous avons regroupé ces manipulations de façon à limiter le nombre d'anesthésies générales effectuées par animal. Les animaux vont être surveillés quotidiennement. Les points limites ont été définis a priori : prostration, abattement et anorexie en cas de douleur traitée par injection de morphine et fièvre, abattement et polypnée en cas d'infection traitée par injection d'antibiotique.

Cette étude de faisabilité permettra de mettre au point un modèle de greffon osseux vascularisé pédiculé libre et de le greffer au niveau d'une perte de substance osseuse. L'intérêt de ces travaux est de proposer un greffon osseux sur mesure, sans sacrifice musculaire et avec une morbidité limitée.

1695- Le cancer du sein est aujourd'hui le cancer le plus fréquent chez la femme. Dans les pays développés, près d'une femme sur huit sera concernée au cours de sa vie, le risque augmentant avec l'âge. Certains cancers du sein (1 sur 5 environ) sont plus agressifs, car les cellules de la tumeur surexpriment à leur surface un certain type de récepteur, le récepteur HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2). Si ces récepteurs sont en nombre trop important, la croissance cellulaire est perturbée et l'évolution de la maladie est aggravée (rechutes plus rapides, survenue de métastases et résistance aux traitements conventionnels). Pourtant, détecté à un stade précoce, le cancer du sein fait partie des cancers ayant un bon pronostic. Une détection précoce permet d'une part de mieux soigner et d'augmenter les chances de guérison. Les améliorations dans ce domaine passent notamment par le progrès des imageries biomédicales et la possibilité d'en combiner au moins deux ; on parle alors d'imagerie bimodale. Dans ce contexte, les nanotechnologies constituent des plateformes particulièrement intéressantes pour l'élaboration d'agents de contrastes car elles sont constituées d'un ensemble d'ingrédients aux propriétés diverses, assemblés de manière rationnelle. Notre équipe travaille sur la conception et l'optimisation de nouveaux agents de contraste bimodaux qui se présentent à l'état nanoparticulaire que l'on nomme le plus souvent nanosondes (NS). De par leur structure originale, ces NS sont capables d'être détectées en imagerie par résonance magnétique (IRM) et en imagerie optique. Les données bibliographiques sur les nano-objets et leur utilisation en tant que nanosondes, montrent clairement que le progrès dépend également fortement de leur capacité à cibler plus spécifiquement les cellules cancéreuses. Pour répondre à cette problématique, nous greffons à la surface de nos NS, des fragments d'anticorps qui ciblent spécifiquement le récepteur HER2. Dans ce cas, le fragment de l'anticorps apportera le ciblage spécifique des cellules tumorales par reconnaissance ligand-récepteur.

L'objectif de ce projet est donc de valider chez la souris le concept original d'imagerie bimodale IRM/optique à partir de nouvelles générations de NS fonctionnalisées par des fragments d'anticorps. L'imagerie bimodale permettra d'améliorer la spécificité des images biomédicales et la pertinence de leur interprétation en combinant une méthode très résolutive (l'IRM) à une méthode très sensible (l'imagerie optique). Nous travaillerons sur un modèle de xéno-greffé de cancer mammaire à partir de cellules humaines qui surexpriment HER2 (lignée BT-474) et sur des souris athymiques (NMRI nude ou BALB/c nude). Les traitements réalisés se feront sur souris anesthésiée (tumorisation des animaux, imagerie). La règle des 3R sera scrupuleusement respectée.

Réduction : le nombre d'animaux nécessaire a été calculé pour être le plus faible possible; il est de 320 souris sur une période de 5 ans, ce qui représente 64 animaux/an.

Remplacement : L'utilisation des animaux se justifie par le fait que nous essayons d'imager et de cibler des tumeurs le plus précocement possible et nous avons absolument besoin de connaître le potentiel de ciblage et la sensibilité de nos agents de contraste in vivo. Il n'y a donc pas d'alternatives.

Raffinement : le modèle animal utilisé a été choisi en prenant en compte l'état actuel des connaissances sur le sujet. Le protocole expérimental a été pensé et étudié en conséquence. Le milieu des animaux pendant la durée de l'expérimentation sera enrichi avec du papier absorbant et des cabanes de cellulose. La biodistribution des NS sera réalisée par imagerie IRM et optique, sur des animaux anesthésiés, c'est à dire en employant des méthodes peu invasives. Les points limites sont bien définis dès le départ (cf 3.4.13). Les résultats obtenus après expérimentation seront analysés à l'aide de méthodes statistiques afin d'exploiter au mieux les résultats obtenus.

1696- Les réglementations internationales imposent qu'une évaluation de la toxicité des produits soit faite chez l'animal avant leur première administration chez l'homme et/ou leur mise sur le marché.

Deux types d'études peuvent être conduites :

- Etudes de Toxicologie Générale : Ces études, conduites le plus souvent dans deux espèces (rongeur et non rongeur), ont pour objectif d'identifier les potentiels effets indésirables observés suite à l'administration de ces produits afin de pouvoir définir la/les dose(s) à administrer chez l'homme et les mesures pour minimiser les effets toxiques.

- Etudes de Toxicologie de la Reproduction : Ces études, conduites le plus souvent dans deux espèces (rongeur et lagomorphe), permettent d'avoir une approche intégrée de la fonction de la reproduction, d'identifier les potentiels effets indésirables des produits chez l'animal afin d'éliminer les produits ayant une toxicité excessive et d'adapter le développement clinique en minimisant les risques pour les patients. Elles permettent également d'effectuer les recommandations d'utilisation chez l'Homme

Actuellement aucune méthode alternative n'est validée pour remplacer les études réglementaires effectuées sur l'animal de laboratoire en vue de l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM).

Le nombre d'animaux par groupe et le nombre de groupes sont définis par certaines lignes directrices internationales telles que celles d'ICH (« International Conference on Harmonisation ») et sur des bases scientifiques afin d'avoir un effectif minimum mais statistiquement exploitable pour pouvoir interpréter les éventuels effets adverses.

De plus, le contenu de ces études intègre les impératifs éthiques tels que les modalités d'administration et de prélèvement, l'hébergement et l'enrichissement du milieu spécifique pour chaque espèce étudiée.

Nombre maximum d'animaux utilisés par espèces animales sur 5 ans (hors fœtus)

Souris 61760

Rat 59450

Cobaye 950

Lapin 6020

Chien 1800

Primate non humain 1800

1697- Un faisceau d'arguments expérimentaux et épidémiologiques indique que le manque de sommeil, conséquence d'une pathologie du sommeil ou d'un comportement volontaire de restriction de sommeil, est un facteur de risque important de maladies métaboliques telles que l'obésité, le syndrome métabolique et le diabète de type 2. Une meilleure compréhension des effets des perturbations des états de vigilance sur le métabolisme est susceptible de permettre le développement de nouvelles voies thérapeutiques visant à lutter contre les maladies métaboliques, un problème majeur de santé publique.

Plusieurs souris Knock Out (KO) semblent pouvoir constituer des modèles originaux et pertinents. En effet, elles présentent toutes des états de vigilance altérés, et l'une d'entre elles a déjà été proposée comme modèle d'obésité puisqu'elle présente toutes les caractéristiques de celle-ci.

Afin d'évaluer si les perturbations des états de vigilance de ces différentes souris KO sont liées à des altérations métaboliques, nous évaluerons, pour ces souris KO des variables comportementales (activité, prise alimentaire), physiologiques (dépense énergétique, métabolisme glucidique, profils lipidiques, concentrations hormonales) et le suivi du poids. Seules les mesures de la dépense énergétique, de l'activité physique et de la prise alimentaire seront réalisées dans ce projet.

Dans le but d'avoir des résultats les plus fiables possibles, ce projet répond au maximum aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

1) Remplacement :

Les mammifères sont les seuls animaux possédant un cycle veille/sommeil/rêve semblable à celui de l'homme. L'utilisation des animaux est donc indispensable pour accéder aux mécanismes impliqués dans les effets délétères d'un sommeil court et/ou de mauvaise qualité sur le métabolisme.

2) Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre l'objectif du projet qui est de caractériser l'état métabolique de nos souris KO et de les comparer à celui de souris sauvages. Pour cela il est prévu de réaliser un certain nombre de mesures telles que l'activité spontanée, la prise alimentaire et la dépense énergétique.

Nous prévoyons d'utiliser au maximum 8 souris.

3) Raffinement

Ces travaux de recherche fondamentale nécessitent des observations sur des animaux non anesthésiés vivant dans de bonnes conditions psychophysiologiques.

Le stress ayant une influence directe sur les mesures réalisées, le bien-être des animaux est impérativement pris en compte à chaque étape de l'expérimentation. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

1698- Les méningiomes intracrâniens sont des tumeurs bénignes dérivantes de l'arachnoïde. Ils constituent les 13-26% des tumeurs intracrâniennes. Le risque de développer un méningiome est augmenté parmi les patients qui ont reçu un traitement à haute dose d'acétate de cyprotérone (100 mg/j) sur des périodes prolongées, ce médicament étant une progestérone synthétique avec une propriété anti-androgénique. La rapidité de la croissance des méningiomes parmi les patients traités par acétate de cyprotérone et la réduction rapide du volume de la lésion après l'arrêt de ce traitement, montrent que le médicament peut agir sur le cycle cellulaire des cellules tumorales. Si confirmée, cette conclusion pourrait avoir plusieurs implications : 1) Un bilan systématique des patients, notamment l'histoire hormonale, devrait être requis avant d'envisager un

traitement avec l'acétate de cyprotérone. 2) Un suivi avec des IRM devrait être considéré avant et tout au long de la prise du traitement.

Il n'existe pas de modèle connu de méningiomes, ce qui fait supposer un chiffre très faible de prise de greffe. C'est pour cela que le but de notre projet sera de tester l'effet de l'acétate de cyprotérone sur la prise de greffe des cellules injectées ou des spécimens de méningiomes issus de patients greffés en sous-dural et en sous-cutané sur souris nude. Les tumeurs greffées seront issues de la base du crâne des patients, plutôt que du cortex (pour être comparable à l'Homme).

Pour cela, les souris seront donc traitées en intrapéritonéale (IP) à l'acétate de cyprotérone à haute dose (0,8mg/j) tous les jours pendant 2 semaines avant la greffe. Les souris contrôles recevront du PSB en IP.

Aussi, nous voudrions maintenir les modèles créés (ceux dont la greffe aura été un succès) car ils seraient très intéressants pour tester de nouveaux médicaments en lien avec les patients.

Nous envisageons donc d'utiliser au maximum 1046 souris nudes pendant la durée du projet.

Le passage à l'animal reste nécessaire car il permet de voir l'effet d'un traitement dans un système intégré et de cette façon, pouvoir recréer les conditions les plus similaires possibles à la condition humaine.

Pour leur bien-être et pour qu'il n'y ait pas de facteur pouvant engendrer de l'angoisse ou un stress, il est nécessaire que les souris ne soient pas isolées mais en contact avec d'autres souris. Aussi, elles auront des fibres de peupliers leur permettant de construire un nid.

Concernant la stratégie d'observation, une visite en fin de journée et les 2 jours suivants l'intervention (injection des cellules ou greffe de spécimens de méningiomes) seront réalisées par l'expérimentateur. Cette visite aura pour but de vérifier l'état général des animaux.

Les points limites sont les suivants : comportement anormal (yeux fermés, dos voûté, isolement), perte de poids >20%, apparence physique anormale (automutilation, plaies), taille de la tumeur (un diamètre de 1cm en sous-dural et 2cm en sous-cutané), gêne pour se déplacer. Les méningiomes étant des tumeurs bénignes à croissance très lente, ces points seront surveillés une fois par semaine et consignés dans un cahier de suivi par l'expérimentateur et l'animalier pour permettre de limiter au minimum la douleur de l'animal. Si un des points limites est atteint, l'expérimentateur sera informé et une décision sera prise dans la journée. Ils seront mis à mort dans les 24h.

Il est important de noter que la tumeur greffée en sous-dural ne touchera pas le cerveau. Elle se développera sous la peau.

Plus précisément, le volume des tumeurs en sous-cutané et en sous-dural seront mesurés. Dès que ce dernier aura atteint le volume de 1cm en sous dural et un diamètre de 2cm en sous-cutané, les animaux pourront être mis à mort afin de récupérer la tumeur, la passer à d'autres souris et conserver le reste de la tumeur pour analyses et conservation du modèle.

Les tailles de 1cm en sous dural et un diamètre de 2cm en sous-cutané seront considérées comme point limite.

De plus, si la tumeur devient handicapante pour l'animal (s'il a du mal à se nourrir et à se déplacer), ils seront mis à mort, peu importe la taille de la tumeur.

Aussi, si la tumeur semble induire des troubles neurologiques (modification du comportement, perte d'équilibre, ...) ils seront mis à mort, peu importe la taille de la tumeur.

1699- Les greffes osseuses et substituts osseux sont utilisés en chirurgie osseuse réparatrice en Orthopédie, Odontologie et Chirurgie maxillo-faciale. Ils sont utilisés pour réparer des défauts osseux qui résultent de diverses pathologies (cancers, kystes, traumatismes, fentes palatines et/ou infections...). L'autogreffe reste la technique de choix mais la nécessité d'un deuxième site opératoire et d'une quantité importante pour la réparation des défauts volumineux rend nécessaire l'utilisation d'un substitut osseux (greffe d'origine humaine, d'origine animale ou un biomatériau). Avec le développement de l'implantologie et des techniques chirurgicales peu invasives, il y a un intérêt croissant pour la recherche de substituts ostéoformateurs résorbables et injectables.

Les greffons osseux (sous forme de poudre et/ou blocs) sont issus de têtes fémorales humaines. L'étude proposée vise à évaluer le potentiel ostéoformateur de nouvelles formulations injectables de substituts osseux à base de poudre d'os spongieux. L'efficacité de ces formulations (réparation osseuse et cinétique de résorption du substitut) sera évaluée et comparée après implantation sur des défauts osseux créés sur le crâne de rats. Les résultats de cette étude in vivo permettront : (i) d'évaluer l'efficacité des différentes formulations proposées du produit à réparer les défauts osseux (ii) de définir la formulation optimale avant l'utilisation chez l'homme et (iii) de mettre en place un protocole de recherche clinique. Pour cette étude, 96 rats de type WISTAR seront nécessaires.

Optimisation du nombre d'animaux :

REPLACEMENT: Compte tenu de la complexité du processus de cicatrisation osseuse faisant intervenir plusieurs systèmes (vasculaire, nerveux, etc.), il est difficile d'étudier la réponse tissulaire et le potentiel ostéoformateur d'un substitut osseux par un modèle "in vitro" ou "in silico", d'où la nécessité d'une étude chez l'animal.

REDUCTION: Afin de réduire le nombre d'animaux il sera réalisé (i) un minimum d'échantillons (6 par groupe) qui permet, compte tenu des écarts constatés pour les différents paramètres de la réparation osseuse étudiés, d'avoir un test significatif (ii) 3 défauts osseux par animal (1 défaut de 6 mm et 2 défauts de 4 mm de diamètre) réalisables d'après notre expertise en parallèle de défauts de taille critique (8 mm de diamètre) (iii) un suivi de la cicatrisation sur le même animal à l'aide d'un micro scanner in vivo, ce qui permet une étude longitudinale et ainsi de pouvoir utiliser 1 seul groupe de rats pour les différents temps d'analyse.

RAFFINEMENT: Afin d'obtenir le plus d'informations pertinentes à moindre coût en terme de "mal être" animal (i) le modèle animal et le protocole expérimental ont été choisis en prenant en compte l'état actuel des connaissances et notre expertise (ii) les différentes étapes du protocole ont été planifiées afin de prévenir toutes perturbations susceptibles de limiter la validité de

l'expérience (iii) la gestion de l'inconfort et de la douleur des animaux est assurée par des soins et une médication appropriés à chacune des étapes : en préopératoire par injection sous cutanée de buprénorphine (0,1 mg/kg) 20 min avant l'induction et par anesthésie gazeuse à l'isoflurane, en peropératoire par injection intrapéritonéale de médétomidine (8 mg/kg) et en postopératoire par injection sous cutanée, au réveil de l'animal, de buprénorphine (0,1 mg/kg). Si l'animal manifeste de signes de douleurs (pas de déplacement, anorexie...) les injections sont réitérées toutes les 8h, jusqu'à disparition des signes de douleurs.

1700- L'épilepsie du lobe temporelle concerne 250000 enfants en France et constitue la forme d'épilepsie la plus fréquente et la plus résistante au traitement anti-épileptique chez l'enfant. Elle est souvent associée à une restructuration cérébrale, faisant suite à un épisode initial de crise d'épilepsie prolongée (état de mal épileptique). Le processus de réarrangement favorise alors l'apparition de crises convulsives, plusieurs mois ou années plus tard. Il est donc nécessaire de bloquer ce processus pour lutter contre l'évolution de cette maladie.

A ce jour, aucune stratégie thérapeutique n'a montré une action anti-épileptogénique (réduire ou bloquer l'apparition secondaire de crises épileptiques) et/ou neuroprotectrice. Néanmoins, les nouvelles thérapeutiques envisagées ont non seulement pour objectif d'empêcher les crises d'épilepsie, mais également d'empêcher la survenue d'une épilepsie chronique après une agression cérébrale initiale dans l'enfance. Cette agression initiale peut être une crise épileptique prolongée lors de la fièvre chez le nourrisson, une méningite, ou lors d'un traumatisme crânien.

L'hypothèse testée dans l'étude que nous proposons est l'administration précoce lors d'un état de mal d'une nouvelle molécule, le perampanel. Cette molécule pourrait protéger les structures habituellement lésées, et modifiera et/ou évitera l'épileptogénèse chronique. Dans le cadre de la recherche sur les stratégies thérapeutiques innovantes, la détermination du potentiel neuroprotecteur de cette nouvelle classe thérapeutique permettrait d'envisager un traitement préventif d'une épilepsie chronique lors de la prise en charge des états de mal, en particulier chez l'enfant.

Nous proposons de réaliser une étude expérimentale chez le rat de la souche Sprague Dawley au nombre de 30 animaux.

- L'état de mal (première crise épileptique) est induit par un agent pro-convulsivant: la pilocarpine.
- En comparant les caractéristiques de l'épilepsie après cette agression chez des animaux traités ou non par le perampanel, nous pourrions en déterminer l'effet anti-épileptogène et neuroprotecteur.
- La comparaison des caractéristiques anatomiques des cerveaux des animaux en imagerie par résonance magnétique (IRM) et la comparaison des dommages sur les tissus cérébraux notamment grâce à des imageries réalisées au moyen de marqueurs radioactifs (TEP) permettront de mieux comprendre les mécanismes de la neuroprotection.

(1) Nous disposons d'un modèle validé d'épilepsie pharmacorésistante après un état de mal induit par un agent pro-convulsivant: la pilocarpine et qui reproduit les caractéristiques cliniques principales de l'épilepsie temporelle chez l'Homme (Raffinement).

(2) En comparant les caractéristiques de l'épilepsie après cette agression chez des animaux traités ou non par le perampanel, nous pourrions en déterminer l'effet anti-épileptogène et neuroprotecteur. Cette comparaison sera réalisée grâce à des techniques d'imagerie permettant d'effectuer des études longitudinales utilisant un nombre réduit d'animaux (Réduction).

(3) L'analyse objective des caractéristiques métaboliques des cerveaux ne peut être réalisée que sur un modèle animal reproduisant les mêmes caractéristiques que chez l'Homme afin d'être au plus près du patient (Remplacement).

Cette étude sera menée selon les bonnes pratiques de laboratoire pour limiter le nombre d'animaux utilisés et limiter leur souffrance. Une surveillance quotidienne et soutenue des animaux est mise en place. Leur poids sera mesuré tous les jours, jusqu'à la disparition des symptômes cliniques de l'état de mal épileptique. Une consommation de glucides lents et

Points limites : Un contrôle de l'absence de signe de douleur, de stress et d'anxiété, d'une cachexie, d'un arrêt de prise d'aliment/de boisson, piloérection associée à une perte de poids dépassant 20% en 48h et d'une immobilité sera effectué quotidiennement tout au long de l'étude. Les animaux ne répondant pas à ces critères, les animaux présentant des crises d'épilepsie récurrentes toutes les 2 heures, et/ou les animaux dont la perte de poids dépasse 20% en 48h, seront exclus de l'étude et une prise en charge en conformité avec les recommandations éthiques sera effectuée.