



**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 (17)

1701- L'ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2 (AOA2) est une maladie génétique rare très invalidante dont les premiers symptômes apparaissent chez l'enfant et évoluent progressivement vers une perte de la capacité à marcher. La maladie résulte d'une atteinte neuronale au niveau du cervelet et au niveau des fibres sensibles et motrices périphériques (neuropathie axonale). Sur le plan génétique, la maladie est due à des mutations dans le gène SETX codant pour une protéine nucléaire appelée Sénataxine, qui est impliquée dans le métabolisme de l'ADN et de l'ARN. Récemment, l'Institut Clinique de la Souris (ICS) à Strasbourg a généré une souris avec une délétion constitutive du gène Setx dans le cadre du programme EUCOMM (European conditional mouse mutagenesis). Les analyses phénotypiques préliminaires effectuées par l'ICS montrent une atteinte légère du système nerveux, suggérant que le modèle pourrait reproduire l'atteinte observée chez l'Homme. Le but du projet est de récupérer ce modèle souris et d'utiliser l'expertise du laboratoire dans l'étude des ataxies récessives afin de le caractériser de façon exhaustive sur le plan comportemental et physiologique. Cette étude nous permettra de déterminer si le modèle souris reproduit les symptômes de l'AOA2 et de mieux comprendre les mécanismes physiologiques impliqués dans le développement de la maladie. À terme, l'étude de ces souris fournira les éléments nécessaires pour la mise en place et l'étude d'approches thérapeutiques pertinentes. Au total, le projet nécessite l'utilisation de 850 animaux pour les études et le maintien de la lignée. Ce nombre se justifie par le nombre des approches nécessaires pour caractériser le modèle et par la nécessité d'une puissance statistique suffisante afin de conclure sur les résultats obtenus. Néanmoins, le phénotype exact étant inconnu, le nombre de souris pourra être réévalué à la baisse en fonction des résultats obtenus et de la détermination des étapes clés de l'évolution de la maladie chez l'animal. Bien que les analyses préliminaires effectuées par l'ICS indiquent que le phénotype est léger et n'induit pas de mortalité accrue, nous porterons une attention particulière au bien-être des animaux tout au long du projet.

1702- Les objectifs de ce projet sont :

- Évaluer les capacités ostéoinductrices d'une céramique chargée avec un peptide implanté dans des défauts osseux générés au niveau des membres inférieurs de chèvres.

- Évaluer la colonisation d'un matériau en titane chargé en peptide implanté au niveau du rachis de chèvres

Les matériaux sont implantés chirurgicalement dans des défauts osseux de taille critique (2 sites osseux, épiphyse distale du fémur et épiphyse proximale du tibia) et entre les vertèbres (2 sites d'implantation) de chèvres femelles de race alpine âgées de 3 à 7 ans au moment de la chirurgie.

Trois points de cinétique seront évalués après implantation des matériaux : 4, 12 et 26 semaines après leur implantation.

En fin de protocole, une analyse micro scanner et histologique de l'ostéo-induction seront réalisées sur les explants. .

Un total de 30 chèvres a été déterminé selon le schéma suivant :

A chaque point de cinétique :

- 4 conditions seront testées au niveau des condyles et au niveau du rachis, à raison de 10 implantations par condition au niveau des condyles et 5 implantations par condition au niveau des rachis soit 40 sites d'implantation au niveau des condyles et 20 sites d'implantation au niveau des rachis

- Pour chaque chèvre, 4 sites d'implantation peuvent être réalisés au niveau des condyles et 2 sites d'implantation peuvent être réalisés au niveau des rachis soit $40/4 = 10$ et $20/2 = 10$

10 chèvres seront donc nécessaires

Trois points de cinétique seront évalués (4 semaines, 12 semaines et 26 semaines après implantation)

soit $10 \times 3 = 30$ chèvres au total seront nécessaires à l'étude

Cette étude sera menée dans le respect de la règle des 3R. Ces biomatériaux ont déjà été testés in vitro mais le passage chez l'animal reste indispensable afin de vérifier les interactions avec l'organisme (Remplacement). Le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'avoir des résultats statistiquement utilisables avec des tests statistiques non-paramétriques (Réduction). La douleur sera bloquée dès le début de l'anesthésie générale et une analgésie sera réalisée en postopératoire.

Les points limites ont été définis afin d'éviter toute souffrance inutile. Si les points limites sont atteints, les animaux concernés seront exclus du protocole et euthanasiés.

Les chèvres seront stabulées en groupe dans des locaux adaptés (Raffinement) permettant de maintenir les animaux dans un environnement adéquat et n'induisant pas de stress. Ils seront suivis au moins deux fois par semaine afin de détecter tout signe de détresse et/ou de douleur. Si tel est le cas un traitement analgésique sera appliqué.

1703- Le coronavirus de la dinde (TCoV) est avec le coronavirus de la bronchite infectieuse du poulet (IBV) l'un des deux coronavirus aviaires les plus importants en termes d'impact économique. La souche virale TCoV-080385d a été isolée en France en 2008 chez des dindes présentant des signes cliniques cohérents avec une maladie multifactorielle dénommée « complexe entéritique du dindonneau » (PEC), maladie qui regroupe plusieurs troubles intestinaux survenant chez la dinde avant sept semaines d'âge et en général au cours des trois premières semaines de vie. Le TCoV a été plus fréquemment détecté dans les lots de dindonneaux atteints de PEC que chez des lots témoins.

Notre projet a pour objectif de déterminer le taux de reproduction de ce virus (R_0) pour le dindonneau, ce qui correspond au nombre d'animaux nouvellement infectés, dans une population sensible, par un animal infectieux pendant toute sa période d'excrétion. L'estimation de ce paramètre constitue une étape importante dans l'étude des possibilités de dissémination du TCoV (futurs études : dynamique des populations de TCoV lors du passage d'oiseau à oiseau par contact direct).

En conditions expérimentales, le virus étudié induit seulement des infections asymptomatiques ou une entérite modérée et transitoire, ne s'accompagnant pas de mortalité ou de souffrance chez les animaux inoculés (inoculation du virus par voie orale). Du fait de l'absence de symptômes évidents, l'infection des animaux inoculés sera mise en évidence par un test moléculaire (qRT-PCR pour détection du génome viral) dans des écouvillons cloacaux. A J31 et lors de l'euthanasie des animaux à J45, une prise de sang sera réalisée.

La procédure expérimentale qui sera réalisée fera appel à l'étude de 32 dindonneaux suivis quotidiennement de 1 à 45 jours. Les expérimentations conduites seront faites dans le respect de la règle des 3R (ensemble de recommandations concernant les moyens à mettre en œuvre pour limiter l'utilisation des animaux : Remplacer, Réduire et Raffiner), en particulier, l'effectif retenu correspond au nombre d'animaux permettant la mise en œuvre du test statistique (modèle SIR) permettant d'estimer le taux de reproduction du virus.

1704- L'épilepsie du lobe temporaire 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, aucun traitement n'a montré une action anti-épileptogénique (réduire ou bloquer l'apparition secondaire de crises convulsives) 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 convulsive prolongée lors de la fièvre chez le nourrisson, une méningite, ou lors d'un traumatisme crânien.

Parmi ces nouvelles thérapeutiques, les drogues visant à réguler la voie de signalisation intracellulaire mTOR sont prometteuses. Il s'agit d'un ensemble de protéines qui régule la prolifération et la croissance des cellules cérébrales ainsi que la capacité des neurones à s'adapter aux agressions cérébrales. On dispose d'arguments cliniques chez des patients qui ont déjà été traités, et fondamentaux à travers de précédentes études animales pour penser que les inhibiteurs de cette voie pourraient avoir un effet neuroprotecteur et anti-épileptogène.

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) sera 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 un inhibiteur de la voie mTOR, 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 temporaire 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 sera 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 d'eau sera administrée durant les 3 premiers jours par nos manipulateurs.

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.

1705- L'objectif du projet est évaluer la capacité d'ostéogénèse de peptides mimétiques de facteur de croissance associés à un matériau, implantés dans des défauts osseux, chez le rat ostéoporotique. 9 conditions différentes seront testées à 2 points de cinétique. La finalité du projet est d'améliorer la qualité de vie des femmes ostéoporotiques qui développent des fragilités osseuses. Ces biomatériaux associés à un facteur de croissance ont déjà été testés in vitro et ont montré des résultats significatifs. Le passage chez l'animal reste toutefois indispensable afin de vérifier les interactions avec l'organisme (Remplacement selon la règle des 3R).

Les 9 conditions à tester sont les suivantes:

- Rat ostéoporotique avec défauts osseux non implantés
- Rat ostéoporotique avec défauts osseux implantés avec le peptide seul à la concentration 1
- Rat ostéoporotique avec défauts osseux implantés avec le peptide seul à la concentration 2
- Rat ostéoporotique avec défauts osseux implantés avec une céramique en gel standard
- Rat ostéoporotique avec défauts osseux implantés avec une céramique standard
- Rat ostéoporotique avec défauts osseux implantés avec une céramique chargée avec le peptide à la concentration 1
- Rat ostéoporotique avec défauts osseux implantés avec une céramique chargée avec le peptide à la concentration 2
- Rat ostéoporotique avec défauts osseux implantés avec une céramique en gel chargée avec le peptide à la concentration 1
- Rat ostéoporotique avec défauts osseux implantés avec une céramique en gel chargée avec le peptide à la concentration 2

Les matériaux sont implantés chirurgicalement dans des défauts osseux générés dans les condyles fémoraux de rats ostéoporotiques. Plus précisément, 95 rats femelles Sprague Dawley OFA âgés de 3 mois (12 semaines) à réception seront privés en œstrogène par ovariectomie bilatérale. Huit semaines après (i.e. lorsque la perte osseuse induite par la déprivation en œstrogène est établie), deux défauts osseux de taille critique (3 mm de diamètre) seront générés dans les condyles fémoraux des rats privés en œstrogène. Des céramiques chargées en peptide seront implantés dans les défauts. Afin d'évaluer la vitesse de néoformation osseuse autour des biomatériaux, les rats recevront une double injection de Calcéine fluorescente par voie intrapéritonéale avant leur euthanasie (4 et 14 jours avant l'euthanasie). Les animaux seront ensuite sacrifiés 3 semaines et 12 semaines après l'implantation. Les sites d'implantations seront alors prélevés et analysés au microscanner puis inclus en résine pour une analyse histopathologique des tissus et une analyse histomorphométrique de la reconstruction osseuse.

Un total de 95 rats a été déterminé selon le schéma suivant:

A chaque point de cinétique :

- 9 conditions seront à tester à raison de 10 implantations par condition soit 90 sites d'implantation
 - 2 sites d'implantation peuvent être réalisés par rat soit $90/2 = 45$ rats sont donc nécessaires
- Deux points de cinétique seront évalués (3 semaines et 12 semaines après implantation)
 $45 \times 2 = 90$ rats au total sont donc nécessaires.

Afin de palier tout accident péri-opératoire, des animaux supplémentaires seront inclus au protocole menant à 95 le nombre total d'animaux.

10 sites d'implantation par condition et par point de cinétique ont été déterminés afin d'obtenir des résultats qui soient statistiquement comparables et qui permettent d'apporter des conclusions fiables qui ne peuvent être remis en question ce qui nécessiterait la réalisation d'un nouveau protocole pour confirmer les résultats.

Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie gazeuse (mélange air/Isotrurane). L'ovariectomie bilatérale et la génération de défauts osseux entraînant de la souffrance, un protocole analgésique sera mis en place le jour de la chirurgie, en période per-opératoire et post-opératoire (une injection 30 minutes à 1h, avant l'acte chirurgical, puis 6-8h plus tard et le lendemain si nécessaire). Dans le cas où des signes de douleur seraient observés lors du suivi clinique, un traitement analgésique adapté sera administré aux animaux. Dans le cas où ces signes ne pourraient être évités par quelque traitement analgésique ou qu'ils seraient accompagnés d'une perte de poids sévère, l'animal sera automatiquement mis à mort.

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'avoir des résultats statistiquement utilisables avec des tests statistiques non-paramétriques (Réduction). La douleur sera bloquée dès le début de l'anesthésie générale et une analgésie sera réalisée en postopératoire. Les points limites ont été définis afin d'éviter toute souffrance inutile.

1706- L'objectif du projet est d'évaluer l'efficacité d'un peptides, qui a la capacité de modifier les cellules tumorales afin que ces dernières reprennent un phénotype physiologique, associé à une céramique en gel dans un modèle animal pré-clinique d'ostéosarcome. Les cellules OSRGa (ostéosarcome de rat) seront injectées en intramusculaire, au contact du tibia droit de 144 souris femelles Rj:NMRI-nu âgées de 3 à 4 semaines à réception. Le développement tumoral sera suivi 2 fois par semaine jusqu'à ce que les masses tumorales aient atteint un volume moyen de 1000 mm³ (vers J42). Dès lors, une injection de céramique en gel chargé en peptide sera réalisée directement au sein des tumeurs. Les animaux seront ensuite sacrifiés 3 jours et 4 semaines après l'injection des composés. Après euthanasie, les tumeurs seront prélevées et inclus en paraffine pour une analyse histopathologique des tissus tumoraux.

Avant l'injection des composés, les animaux seront répartis dans les groupes suivant:

- 20 animaux avec ostéosarcome non traités
- 20 animaux avec ostéosarcome traités avec PBS
- 20 animaux avec ostéosarcome traités avec la céramique en gel standard
- 20 animaux avec ostéosarcome traités avec le peptide seul à concentration faible
- 20 animaux avec ostéosarcome traités avec le peptide seul à concentration plus élevée
- 20 animaux avec ostéosarcome traités avec la céramique en gel chargée avec le peptide à concentration faible
- 20 animaux avec ostéosarcome traités avec la céramique en gel chargée avec le peptide à concentration plus élevée

20 animaux par groupe a été défini afin d'avoir 10 animaux par groupe et par point de cinétique. 10 animaux étant le nombre minimum pour obtenir des résultats qui soient statistiquement comparables et qui permettent d'apporter des conclusions fiables qui ne peuvent être remis en question ce qui nécessiterait la réalisation d'un nouveau protocole pour confirmer les résultats. Etant donné que la prolifération tumorale est variable et pour palier tout décès ou euthanasie prématurée au cours du protocole, des animaux supplémentaires seront injectés avec les cellules tumorales portant à 144 le nombre total de souris. Les injections seront réalisées sous anesthésie gazeuse (mélange air/Isoflurane). L'injection para-tibiale entraînant de la souffrance, un protocole analgésique sera mis en place le jour de la chirurgie, en période per-opératoire et post-opératoire (une injection 30 minutes à 1h, avant l'acte chirurgical, puis 6-8h plus tard et le lendemain si nécessaire). Dans le cas où des signes de douleur seraient observés lors du suivi clinique, un traitement analgésique adapté sera administré aux animaux. Dans le cas où ces signes ne pourraient être évité par quelque traitement analgésique ou qu'ils seraient accompagnés d'une perte de poids sévère, l'animal sera automatiquement mis à mort.

Cette étude sera menée dans le respect de la règle des 3R. Ces céramiques en gel associés à un peptide ont déjà été testées in vitro et ont montrés des résultats prometteurs mais le passage chez l'animal reste indispensable afin de vérifier les interactions avec l'organisme (Remplacement). Le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'avoir des résultats statistiquement utilisables avec des tests statistiques non-paramétriques (Réduction). La douleur sera bloquée dès le début de l'anesthésie générale et une analgésie sera réalisée en postopératoire. Les points limites ont été définis afin d'éviter toute souffrance inutile.

Les souris seront stabulées en groupe dans des locaux adaptés (Raffinement)

1707- L'objectif du projet est d'évaluer la capacité d'un biomatériau type DBM (matrice osseuse déminéralisée) à générer de l'os en combinaison avec une membrane de protection utilisée comme sous-muqueuse. Ainsi, l'association biomatériau/membrane sera évaluée dans un modèle de défaut crânien chez le rat, pendant 12 semaines. Un point de cinétique à 8 semaines sera également évalué. Plus précisément, les objectifs de l'étude seront d'évaluer les capacités d'ostéogénèse du matériau et l'apposition membranaire par imagerie et par analyses histologiques. Pour cela, un défaut crânien de taille critique (soit 5 mm) sera réalisé dans l'os pariétal de 30 rats mâles Wistar âgés de 2 mois à réception. Les rats Wistar sont classiquement utilisés en première intention pour l'étude de substitut osseux avant de réaliser les analyses sur des plus gros animaux (brebis ou chèvres) se rapprochant plus des lésions osseuses observées chez l'homme. Le nombre total d'animaux est de 30 rats qui seront répartis comme suit:

- 4 conditions différentes seront testées
- pour chaque condition, des animaux seront étudiés jusqu'à 12 semaines et 1 animal supplémentaire sera étudié jusqu'à 8 semaines
- des animaux sham opérés pour lesquels des défauts osseux seront générés sans être implantés

A l'issue des 8 semaines, 4 animaux seront sacrifiés et les sites d'implantation seront analysés au microscanner puis inclus en paraffine.

De même, à l'issue des 12 semaines, les animaux restant seront sacrifiés et les sites d'implantation seront également analysés au microscanner puis inclus en paraffine. Une analyse histomorphométrique sera réalisée sur les implants inclus en paraffine. Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie gazeuse (mélange air/Isoflurane). La génération de défauts osseux crâniens entraînant de la souffrance, un protocole analgésique sera mis en place le jour de la chirurgie, en période per-opératoire et post-opératoire (une injection 30 minutes à 1h, avant l'acte chirurgical, puis 6-8h plus tard et le lendemain si nécessaire). Dans le cas où des signes de douleur et d'atteintes nerveuses seraient observés lors du suivi clinique, un traitement analgésique adapté sera administré aux animaux. Dans le cas où ces signes ne pourraient être évité par quelque traitement analgésique ou qu'ils seraient accompagnés d'une perte de poids sévère, l'animal sera automatiquement mis à mort.

Cette étude sera menée dans le respect de la règle des 3R. Ces biomatériaux ont déjà été testés in vitro mais le passage chez l'animal reste indispensable afin de vérifier les interactions avec l'organisme (Remplacement). Le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'avoir des résultats exploitables, permettant de conclure de manière certaine, sans nécessité la réalisation d'une deuxième étude pour confirmer les résultats obtenus au cours du présent projet (Réduction). La douleur sera bloquée dès le début de l'anesthésie générale et une analgésie sera réalisée en postopératoire. Les points limites ont été définis afin d'éviter toute souffrance inutile. Si les points limites sont atteints, les animaux concernés seront exclus du protocole et euthanasiés.

Les rats seront stabulés en groupe dans des locaux adaptés (Raffinement) permettant de maintenir les animaux dans un environnement adéquat et n'induisant pas de stress. Ils seront suivis au moins deux fois par semaine afin de détecter tout signe de détresse et/ou de douleur. Si tel est le cas un traitement analgésique sera appliqué.

1708- Le but de cette étude est l'évaluation de la tolérance locale et de la douleur lors d'administrations répétées par voie intraveineuse d'une nouvelle micro-émulsion à base de propofol qui est une substance anesthésique à demi-vie très courte communément utilisée en médecine vétérinaire comme chez l'Homme.

6 chiens adultes sains recevront, durant 3 jours consécutifs, une injection d'un produit contrôle (sérum physiologique) dans la veine céphalique droite puis le même volume de la formule test à base de propofol dans la veine céphalique gauche. La douleur au site d'injection sera évaluée pendant les administrations et la tolérance locale sera suivie par des examens locaux répétés des sites d'injection. Un système de scores permettra de relever l'intensité de la douleur et des lésions au site d'injection.

Les administrations seront réalisées via un cathéter pour éviter toute administration péri-veineuse et le biais douloureux qui pourrait être amené par des administrations à l'aiguille. Le nombre d'animaux est réduit au minimum par la possibilité de comparer l'effet du produit test à celui du produit de référence sur le même animal. Ce type d'évaluation de tolérance locale dans l'espèce pour laquelle la nouvelle formulation est développée ne peut être remplacée par des essais chez un autre animal car le mode d'administration comme la sensibilité à la douleur sont très spécifiques de l'espèce. Enfin, les conséquences attendues pour les animaux impliqués dans cet essai sont minimales, en dehors d'une période d'anesthésie très brève.

L'œil a pour fonction de recevoir la lumière et de transformer l'énergie lumineuse contenue dans les photons en influx nerveux. Ces messages nerveux sont ensuite transmis jusqu'au cortex visuel et interprétés en images. La conversion de l'information lumineuse en information électrique est réalisée par le mécanisme de phototransduction. Ce mécanisme se déroule au sein de la rétine, dans les photorécepteurs rétiniens (les bâtonnets, très sensibles à la lumière et responsables de la vision nocturne et les cônes, responsables de la vision diurne et chromatique).

Les rétinites pigmentaires regroupent un ensemble de pathologies héréditaires de la rétine caractérisées par une dégénérescence des photorécepteurs bâtonnets puis cônes et une perte progressive de la vision nocturne puis diurne. Parmi ces mutations, celles touchant les gènes codant pour l'enzyme phosphodiesterase (PDE6) sont associées à une des formes les plus fréquentes de RP autosomique chez l'homme (8%). Actuellement, il n'existe aucun traitement efficace pour traiter les RP liées à un défaut en Pde6 β . Cette pathologie étant autosomique récessive, la thérapie génique d'addition, qui consiste en l'apport d'une copie supplémentaire du gène Pde6 β dans les rétines déficientes, semble être une approche thérapeutique intéressante.

Des travaux ont montré que certains vecteurs dérivés du virus adéno-associés (notamment l'AAV2/5 et AAV2/8) étaient capables de transduire de manière très efficace plusieurs types cellulaires du tissu rétinien et d'induire une expression stable sur le long-terme chez la souris, le rat, le chien et le primate à la suite d'une injection intraoculaire.

A ce jour, nous avons déjà testé un vecteur thérapeutique chez le chien Pde6 β -/-, chien Setter Irlandais rod-cone dysplasia 1, modèle canin naturel de rétinite pigmentaire liée à un défaut en Pde6 β . Nous avons montré que l'injection sous-rétinienne de ces vecteurs chez le chien Rcd1 restaure la fonction des photorécepteurs bâtonnets mais également protège la fonction des photorécepteurs cônes à long terme.

Dans le but de développer un essai clinique chez les patients Pde6 β -déficients et à la demande de l'ANSM, la toxicité du vecteur AAV2/5hRK.hpde6 β portant l'ADNc Pde6 β humain été évaluée chez le primate (expérimentation réalisée par le CERB/Baugy). En effet, la taille et l'anatomie de l'œil du macaque étant proches de celles de l'homme, il est ainsi possible de mieux évaluer les effets du transfert du gène pde6 β humain sous le contrôle du promoteur RK, spécifique des photorécepteurs rétiniens. Nous devons maintenant confirmer l'expression du transgène hpde6 β après injection chez le primate. Nous allons donc réaliser une injection sous rétiniennne avec le vecteur AAV2/5hRK.hpde6 β chez deux animaux. Le nombre d'animaux (n=2) utilisé dans ce projet est réduit à son minimum pour une interprétation fiable des résultats. L'injection sous-rétinienne est une intervention chirurgicale sous anesthésie générale et analgésie appropriée associée à une légère douleur et souffrance post-chirurgicales de l'animal (un traitement post-opératoire adéquat et un suivi clinique régulier sont mis en place immédiatement après la chirurgie. Les primates seront euthanasiés 45 jours après l'injection, et les rétines seront analysées par RT-PCR afin d'évaluer l'expression du transgène.

1709- Les maladies inflammatoires chroniques de la peau (dermatite) peuvent prendre des formes multiples (psoriasis, Eczéma, dermatite atopique, ...) avec des mécanismes physiopathologiques différents, dans lesquelles on retrouve généralement un infiltrat plus ou moins important en lymphocytes T dans la peau. Les réponses des lymphocytes T sont initiées par la reconnaissance de divers antigènes puis sont orientées et amplifiées par la sécrétion de messagers spécifiques, les cytokines. Le blocage de certaines cytokines a déjà démontré son potentiel clinique dans ces indications. Le projet ici consiste à évaluer le blocage combiné de deux cytokines en associant deux immunothérapies et à évaluer une nouvelle molécule d'immunothérapie bi-spécifique bloquant ces deux cytokines.

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 nouvelles stratégies d'immunothérapies très sélective manquent souvent de cross-réactivité avec les protéines du rongeur, rendant leur exploration préclinique impossible dans les modèles rongeurs conventionnels. Parmi les deux immunothérapies anti-cytokines évaluées dans ce projet, l'une d'entre elle ne cross-réagit pas avec le rongeur. A l'inverse, les cytokines sont de petites protéines qui ont très souvent la particularité de cross-réagir entre-espèces. Les deux cytokines humaines faisant l'objet du projet ont cette particularité de cross-réagir avec la souris. Ainsi, le projet ici consiste également à évaluer ces nouvelles stratégies anti-cytokines dans un modèle murin déjà décrit de dermatite induite par l'administration intra-dermique de la cytokine humaine.

Le nombre maximum d'animaux utilisés au cours de cette étude sera de 90. Dans un souci de respect de la règle des 3R, nous induirons la dermatite par injection de la cytokine humaine chez la souris afin d'éviter d'avoir recours à des espèces supérieures (ex : primates) pour lesquels l'immunothérapie cross-réagit. Afin de limiter le nombre d'animaux sans diminuer significativement la puissance statistique, chaque animal sera son propre contrôle en comparant une zone administré par la cytokine versus 1 zone administré avec le véhicule. 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.

1710- La production de volailles est une production d'animaux à croissance rapide ce qui implique des exigences nutritionnelles notamment d'un point de vue de l'apport protéique. Afin de s'affranchir de la dépendance protéique de la France vis à vis des pays producteurs de soja, il est nécessaire de mieux valoriser les sources de protéines locales dans l'alimentation des volailles. Cela implique de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la digestion des protéines, d'identifier des freins à une bonne valorisation des matières premières locales par les animaux et les leviers d'action potentiels. Le pH a un rôle fondamental dans la digestion des protéines car il est impliqué dans leur solubilisation puis leur hydrolyse par les protéases et joue un rôle majeur dans l'activation de ces dernières. Face à ce constat, il est nécessaire d'améliorer les connaissances sur : i) les mécanismes de digestion des protéines, ii) les interactions possibles entre pH du tube digestif et sources de protéines dans l'aliment et iii) de l'éventuel effet bénéfique de l'ajout d'une protéase exogène.

1711- L'objectif de cette étude est de tester l'effet du pH du tractus digestif (modifié par le niveau de calcium dans l'aliment), de deux sources de protéines dans l'aliment (Tourteau de soja vs. Tourteau de colza) et d'une protéase exogène sur la digestion des protéines chez le poulet de chair.

Tout au long de l'expérimentation, l'application de la règle des 3R sera considérée:

Remplacer : Ce type d'analyse nécessite l'utilisation d'animaux puisqu'à l'heure actuelle, aucun modèle de digestion in vitro n'est capable de représenter la complexité des mécanismes de digestion. Par ailleurs, ces modèles utilisent des sécrétions pancréatiques de porcs qui sont mal adaptées à une étude sur volailles.

Réduire : Deux répétitions de cette même étude seront réalisées successivement. Un total de 316 animaux sont prévus pour l'étude. Le nombre assez important d'animaux utilisés se justifie par deux aspects. Le premier est la forte variabilité de pH, nécessitant un nombre conséquent d'animaux afin d'avoir un résultat représentatif. Le second est la quantité de contenu digestif qui est rapidement limitante chez des animaux de cette taille.

Raffiner : Les animaux seront élevés en cage individuelle afin de pouvoir enregistrer leur consommation d'aliment. Par ailleurs, malgré des niveaux Haut ou Bas de calcium dans l'aliment, une attention sera portée à rester dans une gamme acceptable. De même, le ratio calcium/phosphore sera équilibré. Ces précautions sont importantes afin de ne pas porter préjudice aux animaux (consommation, troubles digestifs). Les cages individuelles sont équipées de grilles permettant un contact visuel et olfactif avec les congénères, le sol des cages est adapté à la taille et au poids des animaux et les cages sont équipées de jouets suspendus à picorer. Pendant la première semaine, les animaux seront deux par cage afin de limiter l'isolement. Les pesées hebdomadaires se feront le matin, juste avant l'allumage de la lumière. Les animaux ne mangent pas ou peu pendant la période nocturne cela permet d'avoir des pesées homogènes (sans l'effet de la consommation) et d'éviter des mises à jeun répétées.

1712- Chez les patients recevant une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques (CD34+), une primo-infection à cytomégalovirus (CMV) peut être extrêmement dangereuse. Contrairement aux thérapies antivirales actuelles qui ne bloquent que les pools de virus répliatifs, je souhaite tester une nouvelle stratégie antivirale qui ciblera à la fois les pools de virus répliatifs et latents. Grâce aux nucléases à façon nous couperons le génome du CMV sans altérer le génome de la cellule qui le contient. Après avoir été validé in vitro, ce traitement antiviral sera validé dans une situation plus proche de la clinique. Hors, le CMV est un virus spécifique d'espèce, c'est à dire que le CMV humain ne peut pas infecter les cellules murines. Les souris humanisées offrent l'avantage d'analyser in vivo notre nouvelle thérapie puisqu'elles sont reconstituées par des cellules immunitaires humaines (donc sensible au CMV). Dans ce projet de recherche, nous prévoyons d'utiliser 240 animaux. Le nombre d'animaux inclus dans chaque groupe tient compte du fait que la prise de greffe des cellules CD34 varie en fonction du donneur. De plus, pour pouvoir comparer des groupes homogènes en terme de pourcentage de reconstitution par des cellules hématopoïétiques humaines il faut prévoir suffisamment d'animaux dans chaque groupe ainsi le nombre de souris prévu combine 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 afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher.

1713- Le présent projet vise à étudier les effets de stress prénatals sur le développement précoce des comportements et des capacités cognitives chez la poule domestique (*Gallus gallus domesticus*) avec les questions suivantes:

1- Le stress prénatal (SP) de l'embryon a-t-il des effets bénéfiques ou délétères sur les comportements adaptatifs des juvéniles ? 2- La nature du facteur de stress (naturel ou artificiel) appliqué à l'embryon modifie-t-elle ces effets du SP? 3- Le stress maternel induit-il chez les embryons l'émergence de phénotypes similaires à ceux observés lors de l'application d'un facteur de stress directement sur l'embryon ? Le cas échéant, par quels mécanismes ? Pour étudier l'impact de stress pendant la vie embryonnaire nous avons exposé les embryons d'oiseaux à l'audition de cris de détresse de congénères (stress qui se produit en condition artificielle d'incubation) ou à un léger stress de froid (stress qui se produit en conditions naturelles). Dans le

cadre de cet avenant, l'étude portera sur l'influence d'un stress maternel engendré par la présence de l'homme (passages devant les cages, main dans la cage, ouverture de la cage) chez des poules adultes. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés nous avons choisi nos effectifs en fonction de travaux antécédents. Nous estimons au total avoir besoin de 136 poussins et de 40 poules adultes pour répondre de manière fiable à la question concernant cet avenant. Pour ce qui est du raffinement, pour étudier les conséquences sur les jeunes, des tests comportementaux non invasifs (observation des animaux) seront utilisés. Aucune douleur ni aucun prélèvement ne seront engendrés. De plus, les animaux seront tous mis en vente en fin d'expérience par l'unité expérimentale. L'intérêt actuel des particuliers pour les poules pondeuses nous permettra de replacer l'intégralité des animaux (réhabilitation). Pour étudier le comportement animal, le modèle d'étude ne peut être remplacé par un autre modèle.

1714- L'insuffisance cardiaque (IC) constitue une cause majeure de morbidité et de mortalité dans les pays occidentaux. La mortalité survient en raison de la dysfonction ventriculaire et des arythmies conséquentes à la suractivation du système nerveux sympathique et au remodelage cardiaque pathologique. La voie Beta-adrénérique (B-AR) conduit à l'augmentation de l'AMPc qui joue un rôle clé dans la régulation de la fonction cardiaque. Mais son activation chronique entraîne des perturbations électrophysiologiques (arythmies) et participe à la progression vers l'IC. Les niveaux d'AMPc sont finement régulés par des enzymes qui le dégradent, les phosphodiésterases (PDEs). L'objectif général du projet est de tester l'hypothèse selon laquelle une augmentation de l'expression d'une phosphodiésterase de type 2 (PDE2A, une enzyme dégradant spécifiquement l'AMP cyclique) dans le coeur pourrait protéger contre la progression vers l'IC et prévenir les arythmies cardiaques. Un corollaire de cette hypothèse est que l'augmentation de l'activité des PDEs pourrait être une alternative prometteuse ou un complément aux traitements actuels de l'IC. L'utilisation d'animaux est indispensable pour évaluer cette hypothèse. Des souris normales et transgéniques qui surexpriment la PDE2A seront utilisées afin d'évaluer l'effet cardioprotecteur de l'augmentation de son activité. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont mis à mort en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin aussi de réduire le nombre d'animaux utilisés. Le recours à des animaux se justifie par la nécessité d'étudier la fonction cardiovasculaire dans un contexte physiologique et physiopathologique. Il se justifie par l'impossibilité d'obtenir des lignées de cellules cardiaques adultes, par le fait que les cellules cardiaques ne conservent pas un phénotype stable et ne survivent pas au delà de 48h de mise en culture primaire. Il se justifie également par l'impossibilité de simuler *ex vivo* la mise en place de l'insuffisance cardiaque qui est un processus complexe. Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). Une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude, et pour avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet. De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress. Le nombre total de souris utilisées sera de 380.

1715- L'immunothérapie épicutanée est une méthode d'administration des antigènes/allergènes au niveau de l'épiderme. Elle est actuellement en voie de développement pour les allergies à l'arachide et au lait et est explorée pour le traitement des allergies alimentaires et respiratoires et également pour de la vaccination. L'application fréquente d'un patch contenant l'allergène sur la peau permet d'agir directement sur le système immunitaire pour le rééquilibrer en induisant une tolérance. Certains antigènes/allergènes ne sont pas suffisamment immunogènes pour déclencher une réaction immunitaire appropriée. L'enjeu de ce projet est de trouver un ou plusieurs adjuvants capables de renforcer la réaction immunitaire de l'organisme. Le ou les adjuvants sélectionnés devront répondre à plusieurs critères : avoir un grade pharmaceutique (projection de l'utilisation chez l'homme), ne pas provoquer de réactions d'intolérance cutanée, induire une réponse permettant d'activer les cellules immunitaire de la peau.

Dans le cadre de ce projet, nous appliquerons la règle des 3R (Réduction, Raffinement et Remplacement). La stratégie pour réduire le nombre d'animaux utilisés est de réaliser un travail de bibliographie afin de sélectionner les adjuvants répondant aux critères décrits précédemment. Les souris seront hébergées dans des conditions d'hébergement standard. De plus, une gestion précise de l'anesthésie/analgésie est étudiée pour chaque procédure expérimentale en vue de minimiser la douleur et la détresse. Des points limites quantitatifs, spécifiques aux procédures, ont également été établis pour l'ensemble des procédures expérimentales (= raffinement). Toutes les expériences seront réalisées selon les règles de la Communauté européenne de soins aux animaux.

Nous allons travailler avec un antigène modèle, l'ovalbumine, très décrit dans la littérature et pour lequel nous avons développé les outils pour l'analyse de l'activation de la réponse immunitaire. Ce projet se divise en 3 grandes parties : 1/ Détermination de la dose minimale pour induire une activation minimale des cellules immunitaires de l'épiderme ; 2/ Criblage des adjuvants sélectionnés (maximum 12) ; 3/ Optimisation de la dose du ou des adjuvants retenus.

La dose optimale d'allergène permettant de mesurer l'efficacité des adjuvants sera déterminée. Dans un second temps, 1 procédure sera élaborée pour mesurer l'efficacité d'adjuvants sélectionnés. Suite à cette procédure, nous déterminerons le/les meilleurs adjuvants. Nous affinerons la dose idéale de ou des adjuvants. Nous projetons d'utiliser 316 souris BALB/c femelles de 5 semaines.

Ce projet permettra de sélectionner un ou plusieurs adjuvants permettant d'augmenter le pouvoir immunogène d'antigènes/allergènes délivrés par voie épicutanée.

1716- La Pasteurellose est une maladie endémique des élevages cynicoles : « il n'existe pas d'élevage de lapin sans Pasteurelles ! ». Ces bactéries sont responsables de pathologies variées chez l'adulte (abcès, problèmes respiratoires, avortements) mais provoquent surtout une mortalité des lapereaux après le sevrage. La mise au point d'un modèle d'infection expérimentale permettrait de tester l'efficacité de différents moyens de prévention (résistance génétique, vaccination). Un précédent projet a permis de valider l'injection sous cutanée comme voie d'inoculation la plus pertinente. Le test de 20 souches de *Pasteurella* a conduit à retenir deux souches candidates à la définition du modèle expérimental. Cependant la définition d'un modèle répétable et robuste de la pasteurellose du lapin nécessite de réaliser deux nouvelles études.

Une première expérimentation permettra d'affiner la dose de l'inoculum de la souche s'étant montrée la plus virulente afin d'obtenir un modèle quantitatif et conforme aux observations de terrain. La seconde permettra de mesurer la variabilité individuelle de la réponse du lapin à chacune des deux souches retenues et ainsi (1) de choisir la souche la plus pertinente pour l'étude de la résistance génétique à la Pasteurellose et (2) de définir à partir de la variabilité observée le nombre d'animaux nécessaire pour les futures études de résistance génétique dans un souci de réduction.

Quatre vingt lapins seront utilisés dans ce projet: 25 pour l'effet dose et 55 pour l'étude de variabilité individuelle.

Remplacement: l'étude de cette pathologie ne peut se faire sur l'espèce cible, il n'existe pas de méthode alternative
Raffinement: les animaux seront équipés de capteur de température permettant un relevé sans manipulation, le milieu sera enrichi en mettant à disposition des lapins des tasseaux de bois à ronger.

Réduction: les conditions expérimentales étant identiques les animaux témoins des deux études seront mutualisés afin d'en réduire le nombre

1717- Chez le mammifère adulte, une production continue de neurones existe tout au long de la vie qui se situe dans deux zones cérébrales, l'hippocampe et le bulbe olfactif. Cette neurogenèse est impliquée dans les mécanismes d'apprentissage et de mémoire. Récemment, la participation de cette neurogenèse a été observée dans le comportement maternel des ovins. Cependant les facteurs hormonaux de contrôle de la neurogenèse ne sont pas connus. L'objectif de ce projet est de tester l'hypothèse que l'ocytocine, une hormone libérée pendant la mise-bas et l'allaitement, régule la production de nouveaux neurones dans l'hippocampe et le bulbe olfactif. Cette expérience est entreprise chez la brebis puisque l'importance de la neurogenèse dans le comportement maternel a été mise en évidence dans cette espèce. Le projet est en adéquation avec les exigences de:

Remplacement: Cette étude ne peut s'entreprendre que chez l'animal entier dans la mesure où il est impossible de remplacer la complexité des régulations physiologiques observée chez l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

Réduction: 20 brebis seront requises ce qui constitue un nombre minimum compte-tenu des aléas expérimentaux pour tester statistiquement l'hypothèse. Elles seront réparties en 2 lots.

Raffinement: les animaux seront hébergés dans des conditions optimales d'alimentation (granulés, paille et foin de qualité, soins quotidiens), et de vie sociale (élevage en groupe) et nous habituerons les animaux à être manipulés pour éviter les réactions de stress.

1718- L'arthrose est une maladie articulaire qui touche environ 10 à 15% des personnes de plus de 60 ans, selon l'OMS. D'ici 2050, on estime que 130 millions de personnes dans le monde souffriront d'arthrose, et 40 millions d'entre elles seront fortement handicapées par la maladie. Bien qu'elle puisse aussi affecter les plus jeunes, sa prévalence augmente fortement avec l'âge (elle atteint environ 80 % des plus de 75 ans) et l'obésité, entraînant des symptômes de gravité variable. L'impact socio-économique de cette maladie est conséquent puisque des analyses ont montré que les coûts directs représentaient en France plus de 1,6 milliard d'euros en 2002, soit environ 1,7% des dépenses de l'assurance maladie.

Il s'agit d'une maladie articulaire dégénérative (non réversible) d'étiologie complexe. Elle se caractérise par la dégradation progressive du cartilage articulaire mais touche également l'ensemble des tissus de l'articulation et périarticulaires. Les symptômes cliniques occasionnés par la maladie sont la douleur chronique, la raideur, la déformation des articulations et le bruit articulaire. En plus de séquelles physiques, elle entraîne de lourdes séquelles psychologiques, une baisse de la qualité de vie et une mortalité accrue lors de co-morbidités cardio-vasculaires.

Il n'existe pas de schéma précis pour le traitement de l'arthrose. Le but du traitement est de réduire la douleur, d'améliorer la qualité de vie ainsi que la mobilité afin, si possible, de ralentir ou stabiliser la progression de la maladie afin de retarder l'arthroplastie, consistant en remplacement synthétique total ou partiel de l'articulation.

En l'absence de traitement structural efficace, les médicaments prescrits sont à visée antalgique avec notamment les anti-inflammatoires ou les AASAL (anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente). Parmi les AASAL, la viscosupplémentation est de plus en plus proposée pour les symptômes douloureux de l'arthrose. Elle consiste en une ou plusieurs injections intra-articulaires d'acide hyaluronique (AH), l'un des constituants naturels du liquide synovial.

La ligamentoplastie est un traitement orthopédique par greffe ligamentaire pratiqué en cas de rupture ou dysfonctionnement du ligament croisé antérieur (LCA). La rupture du LCA est l'affection ligamentaire la plus courante du genou, mais c'est aussi l'atteinte du genou nécessitant le plus couramment un traitement chirurgical. Sa prévalence est croissante car elles sont mieux diagnostiquées et également en raison de la pratique sportive qui se généralise (sports de pivot, ski...). Les ruptures totales de LCA ne cicatrisent pas spontanément, même par immobilisation du genou, contrairement aux ligaments collatéraux. Il est

donc souvent nécessaire (patient jeune, sportif, avec instabilité du genou) d'effectuer une ligamentoplastie pour limiter les dommages articulaires, irréversibles, dont fait partie l'arthrose. Cette intervention consiste à remplacer le ligament rompu par un transplant prélevé sur le genou du patient et ainsi rendre à l'articulation sa stabilité. L'objectif à terme est surtout d'éviter la survenue d'arthrose post-traumatique chez le patient souvent jeune et sportif.

Ce projet vise à étudier les effets de la viscosupplémentation et de la ligamentoplastie sur le développement et l'évolution de l'arthrose et plus particulièrement sur les propriétés biomécaniques des tissus de l'articulation qui restent jusqu'ici encore mal connus.

Afin d'évaluer l'efficacité de ces thérapies, il est tout d'abord nécessaire de comprendre l'effet de l'arthrose sur l'articulation. De nombreuses études portent sur la caractérisation d'un des différents tissus arthrosiques, mais peu proposent une étude complète pour corréler les propriétés biomécaniques, microstructurales et biochimiques des tissus (liquide synovial, ménisque, cartilage articulaire et os sous-chondral) à la dégradation liée à l'arthrose.

L'influence de l'arthrose sur les propriétés des tissus étant ainsi cartographiée, il sera possible d'étudier l'efficacité du traitement par injection intra-articulaire d'AH et de la ligamentoplastie sur ces mêmes tissus et ce en utilisant les mêmes groupes contrôles.

Cette évaluation ne peut se faire que chez l'animal, car elle nécessite une articulation entière arthrosique. Le modèle expérimental retenu est un modèle chirurgical par rupture du LCA chez le lapin, car il est adapté pour notre étude et bien décrit dans la littérature. Trente animaux seront utilisés, ce qui est le minimum indispensable pour une interprétation statistique des données et qui tient compte de la faible probabilité de perte d'un animal (morbidité et mortalité du modèle faible) et de la variabilité limitée des réponses (n=6 par groupe et 5 groupes).

L'intervention chirurgicale visant induire l'arthrose, la ligamentoplastie ainsi que les injections intra-articulaires, seront réalisées par un chirurgien vétérinaire et les animaux recevront systématiquement un traitement anti-douleur avant, pendant et après (2jours) l'opération. Des soins post-opératoires adaptés à l'espèce seront mis en place, deux fois par jour, afin d'assurer un rétablissement rapide.

Durant toute l'étude, les animaux seront hébergés dans des cages équipées d'une cachette et d'une tablette de repos. Ils auront à leur disposition des blocs de bois à ronger, ainsi que du foin et des rondins de luzerne compressée.

La mise à mort des animaux sera effectuée suivant les bonnes pratiques relatives à l'espèce (injection létale intraveineuse) et l'ensemble des tissus des articulations seront exploités.

1719- Le traitement par radiations ionisante des tumeurs (radiothérapie) se heurte aujourd'hui à une dose maximale qui peut être utilisée sur une zone de l'organisme sans abimer les autres organes et tissus. Le faisceau de radiation est employé sans discrimination sur la tumeur et sur les tissus sains qui se trouvent sur la même direction. Les nanoparticules (NP) de NBTXR3 testées dans ce projet sont des particules de très petites dimensions dont l'architecture est conçue pour augmenter la dose de radiothérapie à l'intérieur de la tumeur, sans augmenter les dommages sur les tissus sains. Ces nanoparticules génèrent des quantités très importantes d'électrons lors de leur exposition aux radiations ionisantes, amplifiant ainsi la dose d'énergie létale dans la tumeur. Elles se fixent préférentiellement au niveau de la tumeur lorsqu'elles sont injectées par voie artérielle. L'efficacité de la radiothérapie est ainsi démultipliée au sein de la tumeur tout en gardant une dose de radiation totale basse. NBTXR3 est fourni pour implantation par injection locale, au niveau intra-tumoral ou intra-artériel. Une très bonne tolérance de NBTXR3 a été démontrée chez le rat sain ou ayant subi une ablation partielle du foie, après injection par voie intraveineuse. Une étude de biodispersion a montré que les nanoparticules de NBTXR3 sont rapidement « capturées » par des cellules immunitaires au niveau du foie, de la rate et des ganglions, ce qui est attendu pour un objet de cette taille. Avant d'étudier NBTXR3 chez des patients avec un cancer du foie, NBTXR3 sera testé chez un gros animal afin de mimer son utilisation en clinique, prévue pour être une injection intra-artérielle unique dans l'artère hépatique ou dans les masses tumorales intrahépatiques. Les objectifs de cette étude sont donc d'explorer les effets potentiels de NBTXR3 sur l'artère hépatique (elles pourraient déterminer des lésions secondaires telle qu'un manque de sang oxygéné et une nécrose des tissus). Ces types de lésion sont connus avec la procédure d'injection artérielle de chimio-embolisation, un autre procédé visant la fixation sélective dans les tumeurs du foie des microbilles chargées de produit anti-tumoral. Aussi, l'objectif est d'analyser la structure des voies biliaires intrahépatiques (structure du foie la plus sensible au manque d'oxygène) et quantifier les nanoparticules au niveau du foie, de la rate et des poumons. Le principe des 3R a été respecté comme suit :

Remplacement : Il n'y a pas de possibilité d'étudier ces paramètres autrement que in vivo. Les premières expériences concernant ce produit ont été faites in vitro et sur le petit animal. L'injection intra-artérielle nécessite l'utilisation d'un gros animal avec la taille des artères proche de l'humain. Le modèle porcin a été choisi en raison de ses similarités anatomiques fortes avec l'Homme au niveau hépatique.

Raffinement : Les animaux recevront les soins équivalents à ceux reçus par les patients des services hospitaliers (antibiotiques, analgésiques, anti-inflammatoires, anesthésiques) afin de leur assurer un réveil et une vie post-opératoire les plus confortables possibles. Ces porcs seront suivis quotidiennement, manipulés dans le calme. Ils seront hébergés dans des cages individuelles. Des soins quotidiens seront effectués et un enrichissement à base de paille sera fait.

Réduction : Le nombre total d'animaux utilisés a été réduit au maximum. 10 porcs seront utilisés pour cette étude (un minimum de 3 porcs/groupe est indispensable pour éviter les biais d'une expérience unique). Trois groupes seront étudiés et un porc supplémentaire est prévu en cas de mortalité d'un animal expérimental ; l'étude ne nécessitera donc peut-être que 9 porcs). Le groupe contrôle a été limité à 3 individus car les injections intra-artérielles de sérum physiologique et de NBTXR3 seront réalisées sur les mêmes animaux (NBTXR3 dans la moitié droite du foie et sérum dans la moitié gauche du foie). Même

si techniquement cela demande une plus grande précision, on pourra ainsi faire en sorte que ces animaux soient leurs propres témoins.

Les connaissances ainsi obtenues permettront une sélection plus précise des patients en termes de population cible pouvant être traitée avec NBTXR3 couplé à la radiothérapie, pour la phase précoce de développement clinique dans les cancers du foie

1720- L'objectif du projet est d'évaluer l'effet de différents principes actifs sur la prolifération tumorale chez la souris immunocompétente ou immunodéficiente. 3 procédures font l'objet de la demande d'autorisation.

La première procédure consiste en l'induction d'un carcinome mammaire murin chez des souris immunocompétentes. Des cellules de carcinome mammaire de souris (4T1) sont injectées en orthotopique dans la glande mammaire de souris Balb-c femelles âgées de 4 semaines à réception. Ces animaux seront traités avec les principes actifs. Dans ces conditions l'incidence est de 100%.

La deuxième procédure consiste en l'induction d'un carcinome mammaire humain chez la souris immunodéficiente. Des cellules de carcinome mammaire hormonodépendantes humaines (MDA-MB-231) sont injectées dans la glande mammaire de souris NMRI nude femelles âgées de 4 semaines à réception. Ces animaux seront traités avec les principes actifs. Dans ces conditions l'incidence est de 100%.

La troisième procédure consiste en l'induction d'un carcinome mammaire humain hormonodépendant chez la souris immunodéficiente. Des cellules de carcinome mammaire hormonodépendantes humaines (MCF-7) sont injectées dans la glande mammaire de souris NMRI nude femelles âgées de 4 semaines à réception. Pour aider à la prise tumorale, une semaine avant l'injection des cellules, une pilule de 17 β -œstradiol (pilules de 0,72mg, libération du principe actif sur 60 jours), sera implantée en sous cutané au niveau des cervicales des souris afin de délivrer une quantité constante d'œstradiol dans l'organisme des animaux, tout au long du protocole. Dans ces conditions la prise tumorale est de 100%. Ces animaux seront traités avec les principes actifs.

Pour chacun des protocoles, 10 animaux développant des tumeurs par groupe seront étudiés afin d'obtenir des résultats qui soient statistiquement comparables et qui permettent d'apporter des conclusions fiables qui ne peuvent être remis en question ce qui nécessiterait la réalisation d'un nouveau protocole pour confirmer les résultats. En plus des groupes impliquant les traitements avec les principes actifs, un groupe non traité ou traité avec le véhicule et un groupe traité avec un produit de référence seront ajoutés aux protocoles. Il y aura au minimum 30 animaux par procédure.

Un total de 1500 animaux maximum sera susceptible d'être utilisé sur les 5 ans du projet.

Quelle que soit la procédure, les animaux sont suivis cliniquement tout au long du protocole et les volumes tumoraux sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse. Les traitements sont appliqués selon les schémas thérapeutiques spécifiques aux principes actifs étudiés. De même, le produit de référence utilisé sera choisi pour correspondre au mieux aux principes actifs étudiés et sera appliqué selon le schéma thérapeutique spécifique au produit de référence choisi. Des prélèvements sanguins peuvent être réalisés en cours des protocoles à raison d'un prélèvement par semaine au maximum afin de mesurer le taux de biomarqueurs osseux dans le sang et d'évaluer la toxicité systémique des différents principes actifs par une analyse NFS par exemple.

La durée des protocoles varie en fonction des procédures allant de 1 mois pour la 1^{ère} procédure à 3 mois pour les deux autres.

A la fin de la procédure, une analyse macroscopique de la tumeur sera réalisée et ces dernières seront prélevées pour une analyse histologique.

Les injections cellulaires, les implantations sous-cutanées et les prélèvements sanguins seront réalisées sous anesthésie gazeuse (mélange air/Isoflurane). Les injections cellulaires et les transplantations entraînant de la souffrance, un protocole analgésique sera mis en place le jour de la chirurgie, en période per-opératoire (une injection 30 minutes à 1h, avant l'acte chirurgical, puis 6-8h plus tard si nécessaire). Dans le cas où des signes de douleur seraient observés lors du suivi clinique, un traitement analgésique adapté sera administré aux animaux. Dans le cas où ces signes ne pourraient être évités par quelque traitement analgésique ou qu'ils seraient accompagnés d'une perte de poids sévère, l'animal sera automatiquement mis à mort.

Cette étude sera menée dans le respect de la règle des 3R. Les principes actifs sont généralement testés in vitro au préalable mais le passage chez l'animal reste indispensable afin de vérifier les interactions avec l'organisme (Remplacement). Le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'avoir des résultats exploitables, permettant de conclure de manière certaine, sans nécessité la réalisation d'une deuxième étude pour confirmer les résultats obtenus au cours du présent projet (Réduction). La douleur sera bloquée dès le début de l'anesthésie générale et une analgésie sera réalisée en postopératoire. Les points limites ont été définis afin d'éviter toute souffrance inutile. Si les points limites sont atteints, les animaux concernés seront exclus du protocole et euthanasiés.

Les animaux seront stabulés en groupe dans des locaux adaptés (Raffinement) permettant de maintenir les animaux dans un environnement adéquat et n'induisant pas de stress. Ils seront suivis au moins deux fois par semaine afin de détecter tout signe de détresse et/ou de douleur. Si tel est le cas un traitement analgésique sera appliqué.

1721- L'objectif du projet est d'évaluer l'effet de différents principes actifs sur la prolifération tumorale chez le rat ou la souris. 3 procédures font l'objet de la demande d'autorisation.

La première procédure consiste en l'induction d'un ostéosarcome chez le rat immunocompétent. Des cellules d'ostéosarcome de rat (OSRGa) sont injectées en paratibiale chez des rats Sprague Dawley OFA mâles âgés de 4 semaines à réception. Lorsque les tumeurs atteignent un volume moyen de 1000 mm³ des fragments de 10 mm³ sont prélevés et transplantés en paratibiale

chez de nouveaux rats Sprague Dawley OFA mâles âgés de 4 semaines à réception. Ces animaux seront traités avec les principes actifs. Pour aider à la prise tumorale, un traitement à la Ciclosporine A (10mg/kg) sera administré, par gavage, de J-1 à J8 après injection des cellules tumorales et transplantation des fragments tumoraux, une fois par jour avec une fenêtre thérapeutique le week-end. Dans ces conditions l'incidence est de 60%. Donc 1,5 fois plus d'animaux par groupe seront inclus au protocole pour avoir un nombre suffisant d'animaux avec des tumeurs.

La deuxième procédure consiste en l'induction d'un ostéosarcome chez la souris immunocompétente. Des cellules d'ostéosarcome de souris (POS-1) sont injectées en paratibiale chez des souris C3H mâles âgées de 4 semaines à réception. Ces animaux seront traités avec les principes actifs. Pour aider à la prise tumorale, un traitement à la Ciclosporine A (10mg/kg) sera administré, par gavage, de J-1 à J8 après injection des cellules tumorales, une fois par jour avec une fenêtre thérapeutique le week-end. Dans ces conditions l'incidence est de 60%. Donc 1,5 fois plus d'animaux par groupe seront inclus au protocole pour avoir un nombre suffisant d'animaux avec des tumeurs.

La troisième procédure consiste en l'induction d'un ostéosarcome chez la souris immunodéficiente. Des cellules d'ostéosarcome de rat (OSRGa) ou d'origine humaine (HOS1544) sont injectées en paratibiale chez des souris NRMI nude femelles âgées de 4 semaines à réception. Dans ces conditions la prise tumorale est de 100%. Ces animaux seront traités avec les principes actifs.

Pour chacun des protocoles, 10 animaux développant des tumeurs par groupe seront étudiés afin d'obtenir des résultats qui soient statistiquement comparables et qui permettent d'apporter des conclusions fiables qui ne peuvent être remis en question ce qui nécessiterait la réalisation d'un nouveau protocole pour confirmer les résultats. En plus des groupes impliquant les traitements avec les principes actifs, un groupe non traité outraité avec le véhicule et un groupe traité avec un produit de référence seront ajoutés aux protocoles. Il y aura au minimum 30 animaux par procédure (45 animaux pour les 2 premières procédures).

Quelle que soit la procédure, les animaux sont suivis cliniquement tout au long du protocole et les volumes tumoraux sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse. Les traitements sont appliqués selon les schémas thérapeutiques spécifiques aux principes actifs étudiés. De même, le produit de référence utilisé sera choisit pour correspondre au mieux aux principes actifs étudiés et sera appliqué selon le schéma thérapeutique spécifique au produit de référence choisit. Des prélèvements sanguins peuvent être réalisés en cours des protocoles à raison d'un prélèvement par semaine au maximum afin de mesurer le taux de biomarqueurs osseux dans le sang et d'évaluer la toxicité systémique des différents principes actifs par une analyse NFS par exemple. De même, des analyses radiographiques pour évaluer la dégradation osseuse et/ou la formation d'os ectopique peuvent être réalisées au cours du protocole.

La durée des protocoles varie en fonction des procédures allant de 1 mois pour la 3ème procédure à 3 mois pour la 1ère procédure.

A la fin de la procédure, une analyse macroscopique de la tumeur sera réalisée et ces dernières seront prélevées avec l'os adjacent pour une analyse en imagerie et histologique.

Sur 5 ans, 2575 animaux au maximum sont susceptibles d'être utilisés.

Les injections cellulaires, les transplantations, les prélèvements sanguins et les radiographies seront réalisées sous anesthésie gazeuse (mélange air/Isoflurane). Les injections cellulaires et les transplantations entraînant de la souffrance, un protocole analgésique sera mis en place le jour de la chirurgie, en période per-opératoire et post-opératoire (une injection 30 minutes à 1h, avant l'acte chirurgical, puis 6-8h plus tard et le lendemain si nécessaire). Dans le cas où des signes de douleur seraient observés lors du suivi clinique, un traitement analgésique adapté sera administré aux animaux. Dans le cas où ces signes ne pourraient être évité par quelque traitement analgésique ou qu'ils seraient accompagnés d'une perte de poids sévère, l'animal sera automatiquement mis à mort.

Cette étude sera menée dans le respect de la règle des 3R. Les principes actifs sont généralement testés in vitro au préalable mais le passage chez l'animal reste indispensable afin de vérifier les interactions avec l'organisme (Remplacement). Le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'avoir des résultats exploitables, permettant de conclure de manière certaine, sans nécessité la réalisation d'une deuxième étude pour confirmer les résultats obtenus au cours du présent projet (Réduction). La douleur sera bloquée dès le début de l'anesthésie générale et une analgésie sera réalisée en postopératoire. Les points limites ont été définis afin d'éviter toute souffrance inutile. Si les points limites sont atteints, les animaux concernés seront exclus du protocole et euthanasiés.

Les animaux seront stabulés en groupe dans des locaux adaptés (Raffinement) permettant de maintenir les animaux dans un environnement adéquat et n'induisant pas de stress. Ils seront suivis au moins deux fois par semaine afin de détecter tout signe de détresse et/ou de douleur. Si tel est le cas un traitement analgésique sera appliqué.

1722- L'objectif du projet est d'évaluer l'effet de différents principes actifs sur la prolifération tumorale chez la souris immunodéficiente.

Des cellules humaines de sarcomes d'Ewing (A673 ou TC-71) sont injectées en paratibiale chez des souris NRMI nude femelles âgées de 4 semaines à réception. Dans ces conditions la prise tumorale est de 100%. Ces animaux seront traités avec les principes actifs.

Pour chacun des protocoles, 10 animaux développant des tumeurs par groupe seront étudiés afin d'obtenir des résultats qui soient statistiquement comparables et qui permettent d'apporter des conclusions fiables qui ne peuvent être remis en question ce qui nécessiterait la réalisation d'un nouveau protocole pour confirmer les résultats. En plus des groupes impliquant les traitements avec les principes actifs, un groupe non traité ou traité avec le véhicule et un groupe traité avec un

produit de référence seront ajoutés au protocole. Il y aura au maximum 100 animaux par protocole. Sur la base de la réalisation d'un protocole par an, la présente saisine couvre un total de 500 animaux.

Les animaux sont suivis cliniquement tout au long du protocole et les volumes tumoraux sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse. Les traitements sont appliqués selon les schémas thérapeutiques spécifiques aux principes actifs étudiés. De même, le produit de référence utilisé sera choisi pour correspondre au mieux aux principes actifs étudiés et sera appliqué selon le schéma thérapeutique spécifique au produit de référence choisi. Des prélèvements sanguins peuvent être réalisés au cours des protocoles à raison d'un prélèvement par semaine au maximum afin de mesurer le taux de biomarqueurs osseux dans le sang et d'évaluer la toxicité systémique des différents principes actifs par une analyse NFS par exemple. De même, des analyses radiographiques pour évaluer la dégradation osseuse et/ou la formation d'os ectopique peuvent être réalisées au cours du protocole.

La durée du protocole est de 1 mois. A la fin de la procédure, une analyse macroscopique des tumeurs sera réalisée et ces dernières seront prélevées avec l'os adjacent pour une analyse en imagerie et histologique.

Les injections cellulaires, les prélèvements sanguins et les radiographies seront réalisées sous anesthésie gazeuse (mélange air/Isoflurane). Les injections cellulaires entraînant de la souffrance, un protocole analgésique sera mis en place le jour de la chirurgie, en période per-opératoire et post-opératoire (une injection 30 minutes à 1h, avant l'acte chirurgical, puis 6-8h plus tard et le lendemain si nécessaire). Dans le cas où des signes de douleur seraient observés lors du suivi clinique, un traitement analgésique adapté sera administré aux animaux. Dans le cas où ces signes ne pourraient être évités par quelque traitement analgésique ou qu'ils seraient accompagnés d'une perte de poids sévère, l'animal sera automatiquement mis à mort.

Cette étude sera menée dans le respect de la règle des 3R. Les principes actifs sont généralement testés in vitro au préalable mais le passage chez l'animal reste indispensable afin de vérifier les interactions avec l'organisme (Remplacement). Le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'avoir des résultats exploitables, permettant de conclure de manière certaine, sans nécessité la réalisation d'une deuxième étude pour confirmer les résultats obtenus au cours du présent projet (Réduction). La douleur sera bloquée dès le début de l'anesthésie générale et une analgésie sera réalisée en postopératoire. Les points limites ont été définis afin d'éviter toute souffrance inutile. Si les points limites sont atteints, les animaux concernés seront exclus du protocole et euthanasiés.

Les animaux seront stabulés en groupe dans des locaux adaptés (Raffinement) permettant de maintenir les animaux dans un environnement adéquat et n'induisant pas de stress. Ils seront suivis au moins deux fois par semaine afin de détecter tout signe de détresse et/ou de douleur. Si tel est le cas un traitement analgésique sera appliqué.

1723- La transplantation d'îlots pancréatiques constitue aujourd'hui une alternative à l'insulinothérapie chez le patient diabétique de type 1. Cependant, le manque de donneurs, ainsi que le recours aux immunosuppresseurs limitent le succès à long terme et le déploiement à grande échelle de cette thérapeutique. C'est pour dépasser ces limites que des dispositifs d'encapsulation, appelés pancréas bioartificiels, ont été mis au point. Parmi eux, notre dispositif permet d'encapsuler des cellules sécrétrices d'insuline, à l'aide de membranes sélectives qui sont imperméables aux molécules impliquées dans le rejet mais perméables au glucose, à l'insuline, à l'oxygène et aux nutriments. Ainsi, aucun traitement immunosuppresseur ne sera nécessaire et l'utilisation de différents types de cellules pourra être envisagée.

Des premiers tests de fonction du dispositif ont déjà été réalisés in vivo et ont conduit à des modifications de différents composants du dispositif : membranes, traitement de surface, traitement du support permettant la répartition des cellules dans le dispositif, système de raccordement. Ces différents changements dans la conception du dispositif permettent aujourd'hui de disposer de la version finale, destinée à être implantée chez le patient lors des futurs essais cliniques. La première étape consistera donc en des tests in vitro, de toxicité des différents composants avec des cultures d'îlots pancréatiques de rats, après un temps de contact de 48h dans le milieu de culture adapté. Cela permettra de vérifier que les différents composants n'affectent ni la viabilité des îlots de rat, ni leur capacité à sécréter de l'insuline en réponse à une stimulation au glucose. Si les résultats de ces tests in vitro sont positifs, il s'agira dans un second temps de déterminer la biofonctionnalité de MAILPAN®s implantés chez le rat diabétique, et remplis avec des îlots de rats ou des cellules à insuline d'origine humaine. Les résultats attendus de ce protocole devraient nous permettre de valider l'efficacité de la version finale du dispositif chez le petit animal, que ce soit avec une greffe allogénique (îlots de rats vers le rat) ou xenogénique (cellules d'origine humaine vers le rat). De plus, cela permettra de préparer au mieux les études sur le gros animal (porc ou primates) et ainsi limiter le nombre d'individus. Le choix d'isoler des îlots pancréatiques chez le rat est motivé par l'homogénéité des souches qui limitera la variabilité lors des tests de toxicité, ainsi que par le coût d'un isolement, bien plus faible que pour l'isolement d'îlots humains et porcins, également limités par le nombre d'organes disponibles. Pour les études de fonctionnalité, le même modèle a été choisi, permettant de réaliser des transplantations allogéniques. De plus, le rat a l'avantage d'avoir des caractéristiques physiologiques proches de l'Homme et de bien supporter les interventions chirurgicales. Ainsi, des dispositifs d'encapsulation seront implantés chez des rats mâles diabétiques pour une durée d'au moins un mois. Ce délai laisse à l'animal le temps de cicatriser et permet le développement de vaisseaux sanguins autour du dispositif. Une fois ce délai écoulé, des cellules sécrétrices d'insuline sont injectées dans le dispositif via des chambres implantables et des cathéters placés en sous-cutanée. Les cellules vont alors réguler de manière autonome et physiologique la glycémie de l'animal. Le dispositif implanté sera identique pour l'ensemble des groupes expérimentaux, mais différents types de cellules seront injectées : îlots pancréatiques de rat et trois types de cellules beta dérivées de cellules souches humaines. Afin d'obtenir une meilleure régulation de la glycémie avant l'injection des cellules dans le dispositif, des pompes délivrant de l'insuline en continu sont implantées sous la peau des rats diabétiques, puis enlevées après l'injection des cellules. Le principe de réduction est ici appliqué en utilisant un nombre minimum d'animaux qui reste suffisant pour l'obtention de résultats

statistiques. Pour chaque groupe expérimental, 15 rats diabétiques avec recevant notre dispositif rempli de cellules et 15 rats diabétiques recevant notre dispositif contenant du milieu seul seront utilisés pour chaque temps d'étude. Ces effectifs permettront d'obtenir suffisamment de données pour réaliser des analyses statistiques et valider l'étude. Au total, 360 rats diabétiques seront implantés, ce qui nécessite, au vu des 80% d'efficacité du modèle d'induction du diabète utilisé, l'emploi de 450 rats sains. L'obtention d'îlots pancréatiques de rat pour injection dans le dispositif implanté chez le rat diabétique nécessite l'utilisation de 6 pancréas pour un receveur soit un total de 270 animaux. Enfin, les tests de toxicité nécessiteront 15 rats par composant testé soit 60 animaux, portant le nombre total d'animaux nécessaires à 780. Le respect du principe de raffinement intervient en premier lieu au niveau des conditions d'hébergement : les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur, ainsi que de cages enrichies à l'aide de cylindres en PVC rouges. Nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de pré-anesthésie, d'anesthésie et de prise en charge post-opératoire.

1724- L'objectif de ce travail est de proposer le transfert de noyau (NT) ou clonage chez le Lapin comme un outil supplémentaire et complémentaire pour la restauration d'un génotype préalablement cryoconservé. A ce jour, seule la congélation des gamètes (ovocytes ou sperme) et des embryons est proposée pour la conservation et la restauration d'un génotype d'intérêt. La congélation des cellules d'un individu est très aisée et leur utilisation via le clonage pour restaurer un génotype d'intérêt est donc envisagée dans ce projet.

Avec le clonage, des cellules cultivées et cryopréservées, provenant de lapins présentant un intérêt agronomique ou biomédical, pourraient être ainsi utilisées comme cellules donneuses de noyaux en NT dans le but de conserver et de dupliquer ces individus.

L'efficacité de la technique de clonage reste généralement faible chez le Lapin. Dans cette espèce, le clonage à partir de cellules somatiques (= toutes les cellules non souches du corps à l'exclusion des cellules germinales et des cellules de l'embryon) n'a pas permis, pour l'instant, de donner naissance à des individus viables quand il est réalisé après culture et cryopréservation de telles cellules, une étape pourtant incontournable pour leur conservation.

Chez la souris, des travaux menés à partir de cellules souches pluripotentes ou multipotentes ont montré que l'efficacité du développement à terme des embryons clonés est meilleure qu'en utilisant des cellules somatiques. En se basant sur ce pré-requis, l'objectif de ce travail est donc de tester l'efficacité du clonage de différents types ou origines de cellules souches (cultivées et congelées) existantes et à venir chez le Lapin, afin de proposer cette technique dans la restauration de génotypes d'intérêt.

Ce projet portant sur le développement fœtal et post natal, il nous est donc impossible de remplacer l'animal par un modèle cellulaire ou in silico.

Le nombre d'animaux impliqués dans chaque expérimentation a été réduit au maximum grâce aux techniques de superovulation maîtrisées chez cette espèce. Les protocoles d'analgésie et d'anesthésie pour la chirurgie réimplantatoire sont validés par des vétérinaires et visent à réduire l'inconfort et le stress. Un suivi chirurgical et post-chirurgical permettra de mettre en place les traitements analgésiques, anti-inflammatoires et antibiotiques nécessaires. Nous ferons également appel à des techniques d'échographie qui nous permettront de suivre plus finement le développement gestationnel des fœtus clonés et de prévoir dans les meilleures conditions les naissances de clones. Les conditions d'hébergements seront enrichies par l'apport de foin (les animaux receveurs) et de balles en plastique, les cages seront équipées de mezzanine pour optimiser l'espace de vie.

Le nombre de lapin impliqués dans ce projet a été calculé de façon à en réduire au maximum le nombre tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences menées. Il est de 34 lapines maximum pour chaque série cellulaire testée. Il pourra être testé jusqu'à 12 types ou origines cellulaires au cours de ces 5 prochaines années. Ceci faisant un total maximum de 408 animaux sur 5 ans pour ce projet.

1725- L'objectif du projet est d'évaluer la biocompatibilité et l'efficacité de biomatériaux implantés in vivo chez le rat.

La biocompatibilité des biomatériaux sera évaluée selon la norme ISO 10993-6 "Evaluation biologique de dispositifs médicaux - essais concernant les effets locaux après implantation"

3 procédures font l'objet de la demande d'autorisation. La première procédure concerne l'évaluation de la biocompatibilité de biomatériaux implantés en sous-cutané chez le rat mâles Sprague-Dawley âgés de 6 à 7 semaines (250-300 g) au moment de la chirurgie. Les biomatériaux sont implantés de chaque côté de la ligne médiane dorsale ou de chaque côté du cou au dessus du sacrum ou dans les flancs de l'animal. Deux sites d'implantation supplémentaires peuvent être acceptés : au niveau des 2 pattes postérieures.

La deuxième procédure concerne l'évaluation de la biocompatibilité et/ou du potentiel ostéoinducteur de biomatériaux implantés en intra-musculaire chez le rat mâles Sprague-Dawley âgés de 6 à 7 semaines (250-300 g) au moment de la chirurgie. Les biomatériaux sont implantés de chaque côté de la colonne vertébrale dans les muscles glutéaux et/ou au niveau des pattes postérieures dans les quadriceps.

La troisième procédure concerne l'évaluation de la biocompatibilité et/ou du potentiel ostéoformateur de biomatériaux implantés en dans des défauts osseux condyliens induits chez le rat mâles Sprague-Dawley âgés de 11 à 12 semaines au moment de la chirurgie. Les biomatériaux sont implantés dans des défauts osseux de taille critique (3 mm de diamètre) générés au niveau des condyles fémoraux.

Pour chacune des procédures, 2 à 3 points de cinétique sont généralement évalués avec le sacrifice d'animaux à chacun des points de cinétique. Des prélèvements sanguins peuvent être réalisés en cours des protocoles à raison d'un prélèvement par

semaine au maximum afin de mesurer le taux de biomarqueurs osseux dans le sang et d'évaluer la toxicité systémique des différents principes actifs par une analyse NFS par exemple. De même, des analyses radiographiques pour localiser les biomatériaux et évaluer la reconstruction osseuse ou la formation d'os ectopique peuvent être réalisées au cours du protocole. Afin d'évaluer la vitesse de néoformation osseuse dans les membres inférieurs, les animaux recevront une double injection de Calcéine fluorescente par voie intrapéritonéale avant leur euthanasie (4 et 14 jours avant sacrifice). La durée des procédures est de 12 semaines quelle que soit la procédure afin d'atteindre une stabilité de la population cellulaire aux sites d'implantations. A la fin de la procédure, une analyse macroscopique du site d'implantation sera réalisée et ces derniers seront prélevés pour une analyse en imagerie et histologique.

Quelle que soit la procédure, 10 sites d'implantation par zone/par point de cinétique/par condition sera évalué selon les recommandations de la norme ISO 10993-6.

Au minimum 3 conditions seront testées:

- condition 1 = création de logettes sous-cutanées ou musculaires ou de défauts osseux sans implantation
- condition 2 = implantation du matériau d'essai
- condition 3 = implantation d'un matériau standard

Etant donné que 2 sites d'implantation par rat sont possibles et que 2 points de cinétiques minimum sont évalués, un total minimum de 30 rats est requis par procédure. Sur la base de la réalisation des 3 procédures par an sur 5 ans, 1200 animaux seront nécessaires.

1726- Les implantations, les prélèvements sanguins et les suivis radiographiques seront réalisés sous anesthésie gazeuse (mélange air/Isoflurane). Les implantations entraînant de la souffrance, un protocole analgésique sera mis en place le jour de la chirurgie, en période per-opératoire et post-opératoire (une injection 30 minutes à 1h, avant l'acte chirurgical, puis 6-8h plus tard et le lendemain si nécessaire). Dans le cas où des signes de douleur seraient observés lors du suivi clinique, un traitement analgésique adapté sera administré aux animaux. Dans le cas où ces signes ne pourraient être évités par quelque traitement analgésique ou qu'ils seraient accompagnés d'une perte de poids sévère, l'animal sera automatiquement mis à mort.

Cette étude sera menée dans le respect de la règle des 3R. Les biomatériaux sont généralement testés in vitro au préalable mais le passage chez l'animal reste indispensable afin de vérifier les interactions avec l'organisme (Remplacement). Le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'avoir des résultats exploitables, permettant de conclure de manière certaine, sans nécessité la réalisation d'une deuxième étude pour confirmer les résultats obtenus au cours du présent projet (Réduction). La douleur sera bloquée dès le début de l'anesthésie générale et une analgésie sera réalisée en postopératoire. Les points limites ont été définis afin d'éviter toute souffrance inutile. Si les points limites sont atteints, les animaux concernés seront exclus du protocole et euthanasiés.

Les rats seront stabulés en groupe dans des locaux adaptés (Raffinement) permettant de maintenir les animaux dans un environnement adéquat et n'induisant pas de stress. Ils seront suivis au moins deux fois par semaine afin de détecter tout signe de détresse et/ou de douleur. Si tel est le cas un traitement analgésique sera appliqué.

1727- L'objectif du projet est d'évaluer l'effet de différents principes actifs sur la perte osseuse induite par ovariectomie chez le rat ou la souris.

3 procédures font l'objet de la demande d'autorisation.

La première procédure concerne l'analyse des principes actifs chez des souris C56BL6 femelles âgées de 8 semaines à réception. Ces souris sont déjà ovariectomisées.

La deuxième procédure concerne l'analyse des principes actifs chez des rats Sprague Dawley femelles âgées de 16-18 semaines à réception.

La troisième procédure concerne l'analyse des principes actifs chez des rats Wistar femelles âgées de 23-26 semaines à réception. Les rats n'ayant pas eu de portées.

Pour chacun des protocoles, 10 animaux par groupe seront étudiés afin d'obtenir des résultats qui soient statistiquement comparables et qui permettent d'apporter des conclusions fiables qui ne peuvent être remis en question ce qui nécessiterait la réalisation d'un nouveau protocole pour confirmer les résultats.

En plus des groupes impliquant les traitements avec les principes actifs, un groupe sham non opéré, un groupe ovariectomie traité avec le véhicule et un groupe ovariectomie traité avec un produit de référence seront ajoutés aux protocoles. Les animaux « sham » sont des animaux pour lesquels la chirurgie est réalisée dans les mêmes conditions que les animaux ovariectomisés sauf que les ovaires sont maintenues.

Il y aura au maximum 500 animaux par protocole soit 500 souris pour le premier protocole, 500 rats âgés de 16-18 semaines pour le 2ème protocole et 500 rats âgés de 23-26 semaines pour le 3ème protocole.

Pour chacun des protocoles, les animaux subissent une ovariectomie bilatérale à J0 excepté pour la première procédure où les animaux sont réceptionnés déjà ovariectomisés. Dans ce cas le groupe sham est remplacé par des animaux sains de même souche, âge et sexe. Les animaux sont suivis cliniquement tout au long du protocole et les traitements sont appliqués selon les schémas thérapeutiques spécifiques aux principes actifs étudiés. Le produit de référence utilisé dans les protocoles est un bisphosphonate (Alendronate) qui est utilisé comme traitement chez les patientes ostéoporotiques. Il sera administré 2 fois par semaine par injection sous-cutanée.

Des prélèvements sanguins peuvent être réalisés en cours des protocoles à raison d'un prélèvement par semaine au maximum afin de mesurer le taux de biomarqueurs osseux dans le sang et d'évaluer la toxicité systémique des différents principes actifs par une analyse NFS par exemple.

Afin d'évaluer la vitesse de néoformation osseuse dans les membres inférieurs, les animaux recevront une double injection de Calcéine fluorescente par voie intrapéritonéale avant leur euthanasie (4 et 14 jours avant sacrifice).

La durée des procédures est de 1 mois pour la 1ère procédure, 4 mois pour la 2ème procédure et 4 mois pour la dernière procédure. A l'issue des protocoles animaux, ces derniers sont sacrifiés et les membres inférieurs sont prélevés pour une analyse en imagerie et en histologie. Les utérus seront également pesés afin de vérifier la déficience en oestrogène générée par l'ablation des ovaires.

Les ovariectomies et les prélèvements sanguins seront réalisées sous anesthésie gazeuse (mélange air/Isoflurane). L'ovariectomie entraînant de la souffrance, un protocole analgésique sera mis en place le jour de la chirurgie, en période per-opératoire et post-opératoire (une injection 30 minutes à 1h, avant l'acte chirurgical, puis 6-8h plus tard si nécessaire). Dans le cas où des signes de douleur seraient observés lors du suivi clinique, un traitement analgésique adapté sera administré aux animaux. Dans le cas où ces signes ne pourraient être évités par quelque traitement analgésique ou qu'ils seraient accompagnés d'une perte de poids sévère, l'animal sera automatiquement mis à mort.

Cette étude sera menée dans le respect de la règle des 3R. Les principes actifs sont en général testés *in vitro* au préalable mais le passage chez l'animal reste indispensable afin de vérifier les interactions avec l'organisme (Remplacement). Le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'avoir des résultats statistiquement utilisables avec des tests statistiques non-paramétriques (Réduction). La douleur sera bloquée dès le début de l'anesthésie générale et une analgésie sera réalisée en postopératoire. Les points limites ont été définis afin d'éviter toute souffrance inutile.

Les animaux seront stabilisés en groupe dans des locaux adaptés (Raffinement).

1728- L'objectif du projet est d'évaluer l'efficacité d'un peptide, qui a la capacité de modifier les cellules tumorales afin que ces dernières reprennent un phénotype physiologique, associé à une céramique en gel dans un modèle animal pré-clinique d'ostéosarcome. Le modèle d'ostéosarcome orthotopique OSRGa chez le rat a été choisi car il est caractérisé par le développement chez l'animal d'un ostéosarcome présentant de fortes similitudes avec la tumeur humaine. En effet, les cellules tumorales, qui se multiplient au contact de l'os, produisent de la matrice osseuse et induisent une augmentation du remodelage osseux.

Une injection para-osseuse de cellules OSRGa (ostéosarcome de rat) sera réalisée sur 22 rats mâles Sprague Dawley OFA âgés de 3 à 4 semaines à réception. Ces animaux seront suivis et le développement de masses tumorales sera évalué. Une fois que les tumeurs auront atteint une taille adéquate (environ 4000mm³), celles-ci seront prélevées et de petits fragments seront transplantés en paratibial sur 210 rats mâles Sprague Dawley OFA âgés de 3 à 4 semaines à réception. Ainsi, un total de 232 rats sera nécessaire. Pour aider à la prise tumorale, un traitement à la Ciclosporine A (10mg/kg) sera administré, par gavage, de J-1 à J8 après injection des cellules tumorales et transplantation des fragments tumoraux, une fois par jour avec une fenêtre thérapeutique le week-end. Lorsque les tumeurs auront atteints entre 600 et 6000 mm³, une injection de céramique en gel chargé en peptide sera réalisée directement au sein des tumeurs. La moitié des animaux sera ensuite sacrifiés 3 jours après l'injection des composés. Les animaux restant seront sacrifiés 4 semaines après l'injection des composés. Après euthanasie, les tumeurs de tous les animaux seront prélevées et incluses en paraffine pour une analyse histopathologique des tissus tumoraux.

Les animaux seront répartis comme suit:

- 20 animaux transplantés mais non traités
- 20 animaux transplantés et traités avec du PBS (véhicule du peptide)
- 20 animaux transplantés et traités avec la céramique en gel standard
- 20 animaux transplantés et traités avec le peptide seul à une concentration faible
- 20 animaux transplantés et traités avec le peptide seul à une concentration plus élevée
- 20 animaux transplantés et traités avec la céramique en gel chargée en peptide à la concentration faible
- 20 animaux transplantés et traités avec la céramique en gel chargée en peptide à la concentration plus élevée

Il faut donc un minimum de 140 rats. Etant donnée que la prise tumorale s'élève à 60%, 1,5 fois plus d'animaux seront transplantés, soit 210 rats. Seuls les animaux qui auront développés des tumeurs seront injectés avec les composés. Les autres animaux seront sacrifiés.

De plus, 20 animaux par groupe ont été choisis car, à chaque point de cinétique, il est nécessaire d'avoir 10 animaux par groupe afin d'obtenir des résultats qui soient statistiquement comparables et qui permettent d'apporter des conclusions fiables qui ne peuvent être remises en question ce qui nécessiterait la réalisation d'un nouveau protocole pour confirmer les résultats.

Les injections et les transplantations seront réalisées sous anesthésie gazeuse (mélange air/Isoflurane). L'injection et la transplantation para-osseuse entraînant de la souffrance, un protocole analgésique sera mis en place le jour de la chirurgie, en période per-opératoire et post-opératoire (une injection 30 minutes à 1h, avant l'acte chirurgical, puis 6-8h plus tard et le lendemain si nécessaire). Dans le cas où des signes de douleur seraient observés lors du suivi clinique, un traitement analgésique adapté sera administré aux animaux. Dans le cas où ces signes ne pourraient être évités par quelque traitement analgésique ou qu'ils seraient accompagnés d'une perte de poids sévère, l'animal sera automatiquement mis à mort.

Cette étude sera menée dans le respect de la règle des 3R. Ces céramiques en gel associées à des facteurs de croissance ont déjà été testées *in vitro* mais le passage chez l'animal reste indispensable afin de vérifier les interactions avec l'organisme (Remplacement). Le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'avoir des résultats exploitables, permettant de conclure de manière certaine, sans nécessité la réalisation d'une deuxième étude pour confirmer les résultats obtenus au cours du présent projet (Réduction). La douleur sera bloquée dès le début de l'anesthésie générale et une analgésie sera

réalisée en postopératoire. Les points limites ont été définis afin d'éviter toute souffrance inutile. Si les points limites sont atteints, les animaux concernés seront exclus du protocole et euthanasiés.

Les rats seront stabulés en groupe dans des locaux adaptés (Raffinement) permettant de maintenir les animaux dans un environnement adéquat et n'induisant pas de stress. Ils seront suivis au moins deux fois par semaine afin de détecter tout signe de détresse et/ou de douleur. Si tel est le cas un traitement analgésique sera appliqué.

1729- Depuis ces dernières décennies, on assiste à une augmentation des cas d'asthme allergique dans les pays industrialisés. Environ 300 millions d'individus seraient affectés. C'est une maladie inflammatoire chronique particulièrement invalidante conduisant à l'essoufflement du patient. Il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement curatif. Les traitements prescrits agissent sur la survenue des symptômes ou servent à limiter l'inflammation pour permettre un meilleur contrôle de la maladie. Les anti-inflammatoires disponibles actuellement ont des activités limitées et présentent de nombreux effets indésirables. Il apparaît donc nécessaire de mettre au point des traitements anti-inflammatoires efficaces et présentant moins d'effets secondaires.

Notre objectif est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire et antiasthmaticque de produits pharmacologiques en cours de développement, candidats-médicaments, dans des modèles d'inflammation des voies aériennes représentatifs de la maladie asthmaticque chez la souris (modèles d'asthme).

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

La réalisation de cette procédure par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Nous avons montré que la parfaite maîtrise des procédures expérimentales permet une mesure efficace de l'activité anti-asthmaticque de 10 candidats-médicaments par an sur une période de 5 ans dans les modèles d'asthme chez la souris, soit un total de 3120 souris.

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance de l'animal. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupe de 8, dans des cages de grande taille et enrichies de tubes en carton.

La douleur liée aux injections est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'administration des candidats-médicaments pour pallier à la survenue de tout signe de toxicité. Il sera procédé à la mise à mort des animaux si les signes d'une douleur trop élevée sont observés.

1730- L'obésité est souvent associée à une inflammation de bas niveau au niveau de nombreux tissus périphériques (foie, tissu adipeux) mais aussi centraux comme la muqueuse intestinale. Cette inflammation joue un rôle essentiel dans la mise en place des maladies métaboliques associées à l'obésité, telles que l'insulino-résistance, le diabète, la stéatose hépatique non alcoolique, etc. Un déséquilibre dans la composition du microbiote intestinal semble jouer un rôle clé dans le développement de ces maladies. Il existe un besoin urgent de comprendre les mécanismes inflammatoires dérégulés chez les sujets obèses et en particulier au niveau de l'intestin. Le but de ce projet est d'étudier les effets pro ou anti-inflammatoires de certaines protéines du système immunitaire inné de la muqueuse intestinale telles que des cytokines ou des peptides anti-microbiens. Ces protéines seront délivrées à des souris au niveau de la muqueuse intestinale par des bactéries lactiques recombinantes. A terme, ces études ouvrent de nouvelles pistes thérapeutiques visant à améliorer le statut métabolique et inflammatoire du tissu adipeux et par cette voie à réduire l'impact des comorbidités liées à l'obésité humaine. Les souris recevront les bactéries lactiques recombinantes par gavage quotidien, ceux-ci étant réalisés par des expérimentateurs entraînés à la contention et au gavage. Un suivi de la survenue éventuelle de diabète et d'obésité est effectué (prélèvements sanguins) sur toute la durée de l'expérience (22 semaines).

Les mécanismes étudiés reposent sur des interactions complexes non reproductibles par la culture d'organes séparés, impliquant de recourir à l'animal. Nous utiliserons 960 souris en 3 ans, espèce présentant les modèles les plus reconnus. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum possible sans nuire à la qualité statistique des données. Leur litière est changée régulièrement, l'eau et la nourriture sont disponibles à volonté, et la température et l'hygrométrie sont régulées. Pour favoriser leur bien-être, leur environnement est enrichi par l'ajout de cellulose à déchiqueter. En expérimentation, les animaux sont observés plusieurs fois par semaine. Pour limiter au maximum le stress et la douleur, des points limites sont clairement définis à l'avance. Tous les animaux sont euthanasiés en fin d'expérience.

1731- Les variations de l'environnement de l'embryon des mammifères affectent son développement et ont des effets à long terme sur l'adulte (notion de programmation développementale). Toutefois, in vivo il est difficile de connaître précisément la composition de l'environnement maternel ("fluide utérin") auquel est exposé le jeune embryon. La collecte de ce "fluide utérin" ainsi que du liquide embryonnaire ex vivo est peu précise et leur dégradation post mortem est de plus très rapide. Nous proposons dans ce projet une approche originale pour analyser les effets de l'environnement maternel sur le jeune embryon, en comparant la composition du milieu "fluide utérin" à celle de l'embryon dans des conditions de développement normal ou perturbé par l'administration à la mère d'un régime hypergras dont il a été montré qu'il affectait l'embryon. A cette fin nous utiliserons la technique de prélèvement par ponction micro-échoguidée de liquide embryonnaire et de fluide utérin, très récemment mise au point pour le modèle lapin.

24 lapines (12 lapines traitées et 12 lapines témoins) seront nécessaires pour ce projet, d'une part pour obtenir un nombre suffisant d'échantillons de liquide embryonnaire et de fluide utérin) et d'autre part pour tenir compte de la variation

individuelle entre les lapines. Les lapines seront alimentées avec le régime hypergras à partir de l'âge de 10 semaines. Les fluides seront collectés par ponction micro-échoguidée au 8ème jour de gestation. Un suivi quotidien des animaux au cours de tout le protocole permettra de détecter tout signe d'alerte de diminution du bien-être des animaux (perte d'appétit, apathie, posture anormale...). Le milieu de vie des lapines sera enrichi avec du foin, des blocs de foin ou des bâtonnets à mâcher et des balles en plastique.

1732- Environ 350 millions de personnes sont atteintes de dépression à l'échelle mondiale et près de la moitié n'ont pas accès à un traitement efficace (rapport OMS, 2012). La résistance aux traitements pharmacologiques classiques est un phénomène de plus en plus décrit dans la littérature. Par conséquent, le développement d'alternatives et l'amélioration de l'arsenal thérapeutique existant sont devenus des problématiques majeures pour les patients pharmaco-résistants. Ces dernières années, un progrès considérable a été accompli dans la stimulation électrique (stimulation cérébrale profonde) et superficielle (stimulation magnétique trans-crânienne) des zones cérébrales dysfonctionnelles chez les individus déprimés (comme le cortex préfrontal dorsolatéral ou le cortex cingulaire antérieur). Malgré sa précision, la stimulation cérébrale profonde reste une méthode lourde et invasive à laquelle peu de patients acceptent d'avoir recours et d'autre part, la stimulation magnétique, non-invasive, n'offre encore que de faibles discriminations spatiales et profondeurs de stimulation, limitant ainsi l'utilisation de ces deux techniques. Récemment, il a été démontré que la stimulation par ultrasons pouvait modifier l'activité électrique de certaines zones cérébrales ciblées, de façon précise et non-invasive. Cependant, cette nouvelle méthode n'a toujours pas été utilisée afin d'induire une réversion des états dépressifs.

L'objectif de cette étude sera alors 1) de démontrer la faisabilité de la stimulation cérébrale ultrasonore d'une région précise du cerveau impliquée dans la physiopathologie de la dépression (le cortex cingulaire antérieur) dans un modèle animal de dépression et 2) d'observer si cette stimulation permet de réverser de façon durable les symptômes de la dépression. Ce projet vise à développer une alternative thérapeutique aux patients pharmaco-résistants. Pour cette expérience, 128 souris réparties en 8 lots sont requises.

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

Raffinement : le stress traumatique appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen, en raison de sa brièveté, comparé à ce qui est pratiqué dans d'autres laboratoires.

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=16 sujets par groupe). Les souris seront uniquement mâles, afin d'éviter les variations comportementales provoquées par le cycle menstruel de la femelle et ainsi réduire le nombre total d'animaux. De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

1733- La transplantation représente un moyen thérapeutique efficace et parfois l'unique solution pour contrer le dysfonctionnement de certains organes ou pour traiter différentes pathologies (comme les cancers). Cependant le rejet de greffe n'est pas entièrement contrôlé par les immunosuppresseurs et représente aujourd'hui l'obstacle majeur en transplantation.

Au sein de l'unité INSERM UMR1064, nous étudions les mécanismes liés à la survie et au rejet de greffe à l'aide de modèles de greffes chez l'animal.

Suite à une transplantation, les antigènes du donneur vont être présentés aux cellules immunitaires du receveur. La réponse immune va alors produire des lymphocytes T mémoires spécifiques des antigènes du donneur. Si le receveur reçoit une deuxième greffe présentant les mêmes antigènes que ceux du premier donneur, la réponse immune engendrée va être plus forte due à la présence des lymphocytes T mémoires qui vont accélérer la réponse immunitaire et favoriser le rejet de greffe. En transplantation, il est courant que les personnes transplantées reçoivent plusieurs greffes. Le contrôle de la réponse immune médiée par les lymphocytes T est alors indispensable.

Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons étudier les mécanismes de rejet liés aux cellules T mémoires. Nous souhaitons plus précisément tester des cellules et molécules permettant de contrôler le rejet du aux cellules T mémoires. Pour cela, nous souhaitons dans un premier temps mettre en place un modèle de greffe chez le rat permettant d'obtenir un rejet de greffe accéléré dû à une augmentation des lymphocytes T mémoires. Pour cela, nous réaliserons une deuxième greffe(s) de peau chez le même rat. Les cellules de l'animal greffé seront alors isolées puis injectées à un deuxième animal qui recevra une greffe de cœur provenant du même donneur que la (ou les) greffe(s) de peau. Grâce à ce protocole, nous allons pouvoir obtenir un modèle d'étude de rejet de greffe dû aux cellules T mémoires. Dans un deuxième temps, nous testerons des protocoles expérimentaux (injections de molécules ou de cellules) dont l'efficacité à contrer un rejet de greffe sur des rats « naïfs » (c'est-à-dire ne possédant pas de cellules mémoires pour le greffon) a déjà été démontré. Ce projet nous permettra d'identifier les protocoles expérimentaux ayant une pertinence chez l'homme ou la présence de cellules mémoires est un obstacle au bon fonctionnement de certaines greffes.

La nature de ce projet ne permet pas de s'affranchir de l'utilisation d'animaux ; le même niveau d'information ne pouvant pas être apporté par des études in vitro ou in silico. La réalisation de greffes chez le rat est ainsi indispensable pour étudier l'impact des cellules T mémoires en transplantation et comprendre comment contrer ces cellules pour favoriser la survie du

greffon. De plus, l'évaluation de protocoles expérimentaux sur des rats possédant une réponse mémoire induite pas un greffon n'a pas été réalisée à ce jour en transplantation. Nous estimons que ce projet nécessitera environ 456 rats afin d'avoir une bonne appréciation de l'efficacité de protocoles expérimentaux d'injection de molécules ou de thérapie cellulaire sur la réponse mémoire en transplantation en utilisant des tests statistiques adaptés aux petits échantillonnages. Nous réaliserons en moyenne un groupe de greffe par mois. Nous pensons que les greffons cardiaques seront rejetés dans une fenêtre d'environ 10 jours en l'absence de traitement. Si nos traitements n'ont pas d'effet, nous le saurons donc avant le prochain groupe d'animaux greffés.

Les animaux sont hébergés au sein d'une animalerie, à raison de 4 rats par cage. Les procédures expérimentales susceptibles d'être douloureuses ou entraîner toute sorte de souffrance (greffes de peau et de cœur) seront réalisées sous anesthésie. Une surveillance quotidienne du greffon ainsi qu'un suivi clinique et comportemental des animaux (poils hérissés, dos voûté, agressivité...) sera réalisé.

1734- Ce projet de recherche vise à valider l'utilisation de marmousets (ouistitis) dans des expériences précliniques et de mettre en œuvre toutes les procédures nécessaires pour obtenir des résultats quantitatifs. Cette étude est basée sur les résultats d'une étude identique mais réalisée chez le rat, modèle de référence.

Ici, nous proposons de valider son utilisation dans le cadre des expériences précliniques dans des études cardiovasculaires sur le stress cardiaque en reproduisant les procédures menées chez l'homme. La contrainte est induite par injection d'un composé chimique qui permet le retour au repos du rythme cardiaque de l'animal, de la même façon que chez les humains. Les scanners TEP précliniques d'aujourd'hui sont validés pour les souris voire les rats pour certains, mais pas pour les ouistitis. En outre, les différences en termes de forme, de fréquence respiratoire (70-140 pour le rat, 20 à 50 pour le ouistiti) et de fréquence cardiaque (de 250 à 450 pour le rat et de 240 à 350 pour le ouistiti) illustrent la nécessité de développer des méthodes de correction dédiées aux ouistitis. Enfin, le ouistiti est physiologiquement plus proche de l'homme, et en fait un candidat idéal pour des études immunologiques et cardiaques, en particulier dans une approche translationnelle.

Cette procédure « PET Myocardial Perfusion Stress Test (PMPST) » évalue le flux sanguin à travers les artères coronaires vers le muscle cardiaque à l'aide d'un traceur radioactif. L'examen consiste à l'acquisition chez l'animal anesthésié d'une série d'acquisition d'images en TEP lors de la phase de repos, de stress induit par l'agent pharmacologique et lors du retour au repos post injection.

Ce projet consiste en une étude faisabilité et de développement d'outils d'imagerie chez cette espèce. Les données issues de cette expérience permettront de montrer les éventuelles limites du système et de mettre au point des algorithmes de reconstruction d'image adaptés à cette espèce par notre équipe.

Dans le but de respecter la règle des 3 R nous avons inclus le nombre minimum d'animaux nécessaires pour avoir des résultats significatifs (6 par groupe) et une grille de notation d'évaluation de la douleur sera utilisée afin d'évaluer les points limites et les conduites à prendre pour réduire les éventuels signes de souffrance animal.

1735- Aujourd'hui, le diabète est la complication de l'obésité la plus répandue dans le Monde. Face à leurs augmentations simultanées, les experts parlent d'une épidémie qualifiée de "diabésité". De nombreuses plantes sont considérées traditionnellement comme antidiabétiques, certaines sont à l'origine de la mise au point de médicaments, comme par exemple le biguanide metformine grâce au Galéga officinalis. Devant l'augmentation considérable du nombre de diabétiques dans les pays émergents en voie de développement (ex: Inde, Chine, Sud-est Asiatique, pourtour Méditerranéen), de nombreux chercheurs ont évalué l'action pharmacologique de ces plantes traditionnelles et donc leur intérêt en médecine quotidienne dans ces pays où les médicaments synthétiques sont malgré tout assez chers et où la tradition de médecine par les plantes est bien ancrée dans les mœurs. Au Maroc, une enquête dans un groupe de diabétique (type 2) révèle que 25% des patients n'utilisent que des plantes pour se soigner.

Dans les pays « industrialisés » où le traitement du diabète (insuline/médicaments) est un accès facile, il est apparu intéressant d'utiliser la phytothérapie, seule ou en complément, pour diminuer la dose de médicaments synthétiques, mais aussi parce que certains phytomédicaments semblent en même temps capables de lutter contre les complications du diabète (sclérose des vaisseaux sanguins, dépôt athéromateux, artérites et artériolites, hypertension, infections). L'objectif de cette présente étude est la validation in vivo des effets bénéfiques de la graine de Jojoba *Simmondsia chenensis*. Ce projet de validation in vivo s'appuie sur les résultats de recherche en amont (chimique, biologique). Les effets biologiques (efficacité/toxicité) in vitro ont été testés sur des modèles de stress cellulaires pour les différentes parties de la plante (fleur, graine, feuille) révélant ainsi le candidat « graine » pour la validation des effets in vivo. Un travail collaboratif a permis d'étudier les différents modes d'extraction des composés actifs de la graine afin de déterminer leurs propriétés chimiques anti-radicalaires et anti-oxydantes. De plus, nous disposons d'un modèle alimentaire de diabète de type 2 chez le rat (associant graisse et sucre, permettant de proposer un réel outil de validation des effets biologiques de la graine de Jojoba.

La règle des 3R, soit réduire, raffiner, remplacer est respecté. Nous utiliserons le nombre de rats minimum (84 rats mâles Wistar), mais nécessaires pour obtenir des résultats statistiques. La souffrance des animaux sera réduite au maximum. Les animaux seront hébergés à 5 par cage avec eau et nourriture ad libitum. Les cages seront enrichies à l'aide de cylindres rouges en PVC. Les rats seront placés en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie réglementaire. La règle des 3R, soit réduire, raffiner, remplacer sera respectée.

1736- Environ 350 millions de personnes sont atteintes de dépression à l'échelle mondiale et près de la moitié n'ont pas accès à un traitement efficace (selon le rapport de l'OMS en 2012). La résistance aux traitements pharmacologiques classiques

est un phénomène de plus en plus décrit dans la littérature. Par conséquent, le développement d'alternatives et l'amélioration de l'arsenal thérapeutique existant sont devenus des problématiques majeures pour les patients pharmaco-résistants. Chez l'Homme, le lithium est efficace dans le traitement de certaines formes de dépression, mais son efficacité n'a jamais été évaluée dans un modèle animal de dépression majeure.

L'objectif de cette étude sera alors d'évaluer les effets du lithium dans le modèle du stress chronique. Pour cette expérience, 64 souris réparties en 4 lots sont requises.

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

Raffinement : le stress chronique appliqué aux animaux peut être qualifié de léger (pas de privation d'eau ou de nourriture, pas de stimuli douloureux) comparé à ce qui est pratiqué dans d'autres laboratoires. Les conditions d'élevage des animaux non stressés sont 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 à la fois dans la réactivité au stress et dans la réponse au lithium (n=16 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

1737- La variole est une maladie infectieuse causée par un orthopoxvirus dont la mortalité peut dépasser les 30 à 50%. La vaccination par le virus vivant de la vaccine est à ce jour la seule méthode prophylactique efficace pour protéger contre la variole en cas de menace bioterroriste, le virus de la vaccine induisant une immunité croisée protectrice contre le virus de la variole. Grâce à une campagne de vaccination mondiale efficace, la variole a été déclarée officiellement éradiquée en 1980. Les personnes nées en France depuis 1984 ne sont plus vaccinées et le statut immun des personnes vaccinées depuis plus de 20 ans est incertain. La faible couverture vaccinale de la population actuelle, la stabilité du virus, sa contagiosité élevée font donc du virus de la variole l'un des agents majeurs du risque bioterroriste. Pour prendre en compte ce risque, des stocks de vaccins ont été constitués mais une vaccination massive et rapide de la population serait difficile à mettre en œuvre. L'obtention d'anticorps neutralisants recombinants qui pourraient être utilisés à titre prophylactique et/ou thérapeutique est une alternative prometteuse. L'objectif de ce projet est donc d'isoler *in vivo* un ou plusieurs anticorps neutralisant les orthopoxvirus afin de développer des anticorps recombinants.

Pour obtenir des anticorps neutralisants les orthopoxvirus, il est nécessaire d'immuniser des organismes vivants entiers avec le virus de la vaccine ou des antigènes recombinants non infectieux, la totalité de la réponse immunitaire ne pouvant pas être reproduite *in vitro*. Le Primate Non Humain (PNH) est le modèle le plus pertinent pour obtenir des clones d'anticorps neutralisants utilisables chez l'Homme le plus rapidement possible. En effet, la réponse immunitaire du PNH est très proche de celle de l'Homme, et les séquences de leurs anticorps sont très proches des séquences des anticorps humains.

Le projet prévoit d'utiliser 2 animaux nés et élevés en captivité dans des établissements reconnus. Le nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire pour optimiser la probabilité d'obtenir les anticorps recherchés. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administration des vaccins et prélèvement de sang et de moelle osseuse sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés). Des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Le cas échéant le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Avant immunisation, les animaux seront hébergés en paire et après immunisation, les animaux seront hébergés en modules individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

1738- La maladie de Pelizaeus-Merzbacher est une pathologie du système nerveux central, nommée leucodystrophie hypomyélinisante liée au chromosome X (prévalence 1/400 000). Elle débute typiquement dans l'enfance, la forme classique se manifestant au cours des 2 premiers mois de vie par un nystagmus (perturbation de la coordination des muscles de l'œil) et une hypotonie (diminution du tonus musculaire), une altération du développement moteur et un déficit intellectuel. La maladie évolue vers une quadriplégie spastique et une ataxie (manque de coordination fine des mouvements volontaires) conduisant à un état grabataire avec une espérance de vie raccourcie. Il existe des formes plus précoces et sévères (forme néonatale) ou plus modérées (léger retard de développement et moteur débutant à 2-3 ans, paraplégie spastique, ataxie). La maladie de Pelizaeus-Merzbacher est liée à des mutations du gène des protéolipides de la myéline (Plp1). Ces protéolipides constituent environ la moitié des protéines totales de la myéline. Dans le cerveau, la myéline, synthétisée par des cellules gliales, forme une gaine isolante autour de l'axone des neurones, assurant ainsi une conduction rapide de l'influx nerveux.

Dans la majorité des cas, la maladie de Pelizaeus-Merzbacher est provoquée par l'acquisition de copies supplémentaires du gène Plp1 (duplication). Dans une plus faible proportion des cas, le gène est muté et induit la production d'une protéine anormale. Il n'existe actuellement aucune thérapie s'attaquant aux causes de cette maladie. Seul un traitement symptomatique est disponible. Nous voulons donc développer une approche de thérapie génique visant à substituer ou moduler le gène pathologique.

Nous utilisons des rongeurs transgéniques modèles de la maladie, appelés PLOA, qui expriment des copies supplémentaires du gène Plp1. Ces animaux présentent des troubles neurologiques et des anomalies du système nerveux similaires à ceux qui

sont observés chez l'homme. Le but de ce projet est d'évaluer, chez le rongeur PLOA, l'effet d'un vecteur adéno-associé (AAV) exprimant un shARN anti Plp1, conçu pour diminuer l'expression du gène Plp1. Nous voulons tester l'efficacité et l'absence de toxicité de ce traitement délivré par voie intraveineuse ou intracérébrale. L'évaluation de l'effet thérapeutique et de l'innocuité du traitement se basera sur des critères cliniques, biologiques et histologiques. Il est donc impossible de remplacer l'animal par un modèle cellulaire.

Le nombre de rongeurs utilisé dans ce projet (168) a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement suffisantes et évaluer l'effet thérapeutique du traitement. Les animaux sont nés et ont été élevés dans des établissements agréés.

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

1739- La borréliose de Lyme est une zoonose bactérienne transmise à l'homme par piqûre de tiques.

En Europe il s'agit d'une tique dure du genre Ixodes et en particulier Ixodes ricinus. Le réservoir naturel de la maladie est représenté principalement par les petits rongeurs, les oiseaux et les grands mammifères sur lesquels les tiques prennent leur repas sanguin. Les agents responsables de cette infection sont des bactéries spirochètes du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato, regroupant vingt espèces à ce jour dont les plus répandues sont *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii* et *Borrelia garinii*. Les agents responsables de cette infection sont transmis à l'hôte au cours du repas sanguin de la tique qui est strictement hématophage. Son incidence en France a été estimée aux environs de 30 000 cas chaque année. Prévenir la maladie c'est d'abord améliorer sa connaissance et ainsi éviter non seulement les infections mais aussi éviter les complications tardives en cas de non diagnostic de la maladie. L'analyse de la transmission de cette maladie nécessite l'utilisation de tiques non infectées et infectées aux trois stades, larves, nymphes et adultes mâles et femelles. Pour mener à bien nos différents projets nous disposons au laboratoire d'une colonie de tiques (*Ixodes ricinus*) indemne de toute infection par *Borrelia*. Cette colonie nous permettra de développer une seconde colonie de tiques infectée par différentes espèces de *Borrelia*. Pour assurer la survie de notre colonie, il faut que nos tiques se gorgent sur animal vivant (souris et lapin au laboratoire). Cet aspect constitue notre projet de recherche principal et implique le maintien de cet élevage de tiques (*Ixodes ricinus*) au laboratoire.

Ce projet sera mené en conformité avec le principe des 3Rs.

Remplacement : le remplacement des animaux de laboratoire est possible mais compliqué. Il a été mis au point une technique de gorgement des tiques sur membranes, mais ces membranes sont issues d'animaux (gerbilles notamment). Ces membranes doivent être changées tous les jours au cours du repas sanguin afin d'éviter les contaminations bactériennes.

Raffinement : Les animaux sont maintenus en groupe jusqu'à leur utilisation. Ils sont gardés en cage individuelle où ils sont surveillés plusieurs fois par jour, ce qui nous permet d'observer leur état général et aussi de récupérer les tiques déjà gorgées. Les animaux sont nourris ad libitum à toutes les étapes de leur vie.

Les lapins sont hébergés dans des cages individuelles où ils restent en contact olfactif avec leur congénères donc lorsque l'on dépose des tiques sur eux leur hébergement ne change pas.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés pour le maintien de l'élevage de tiques est vraiment réduit au minimum.

Nous utiliserons environ 150 souris (C3H/HeN ou C57BL6) et 20 lapins New-Zealand pendant la durée de ce protocole.

1740- L'objectif de ce projet est de mettre en place l'utilisation d'extraits végétaux à activité antibactérienne sélective dans un modèle d'infection urinaire à bactérie multirésistante aux antibiotiques : *E coli* producteur de bêta lactamases à spectre étendu (BLSE) ou producteur de carbapénémases (EPC) Pour ce faire nous utiliserons un modèle d'infection urinaire à *Escherichia coli* chez la souris femelle C3H/He reproduisant la cystite de la femme. Cette infection est l'infection la plus fréquente et la plus consommatrice d'antibiotiques à travers le monde avec les infections trachéo bronchiques. La pression de sélection exercée par les antibiotiques utilisés dans ce cadre est donc particulièrement élevée et la résistance aux antibiotiques est de plus en plus fréquente sur les bactéries impliquées dans ces infections. L'utilisation d'extraits végétaux à activité antibactérienne sélective (activité plus importante sur les entérobactéries responsables d'infections urinaires que sur les anaérobies et la flore commensale) et dont le mode d'action est totalement indépendant de l'activité des antibiotiques classiques pourrait être une solution alternative et écologique à ce problème de santé publique. Au total, l'ensemble de ce projet concerne 590 souris, ce nombre correspondant aux règles préalablement établies des 3R:

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

-Réduire : le modèle choisi est destiné à limiter le nombre d'animaux : afin de justifier de la validité et la reproductibilité des résultats obtenue, et pour les analyses statistiques ultérieures, un minimum de 10 souris par lot est nécessaire (5 pour la mise au point du modèle)

-Raffiner : Le bien-être de l'animal est pris en compte de manière à lui éviter toute souffrance inutile (anesthésie : isoflurane et analgésie : paracétamol, ainsi que la détermination du score clinique)

1741- La formation initiale des vétérinaires, la formation professionnelle spécialisée des personnes qui appliquent ou conçoivent des procédures expérimentales en recherche animale et la formation spécialisée professionnelle des vétérinaires et médecins nécessitent l'apprentissage de gestes techniques invasifs pour l'animal. Il est du devoir de chacun d'éviter que toute personne qui réalise ces gestes pour la première fois, ne le fasse sur un patient malade, ou sur un animal qui est l'objet

d'une recherche scientifique, afin d'éviter douleurs inutiles et pertes de temps pour la science. Il est possible d'utiliser des méthodes virtuelles, faisant appel aux techniques modernes du multimédia. Cependant, pour la mise en œuvre pratique, et pour atteindre un niveau de performance suffisant, le recours à l'animal vivant, la plupart du temps anesthésié, peut être très utile. Nos programmes d'enseignement font donc appel aux espèces animales qui seront donc utilisées par la suite, que ce soit pour le soin aux animaux, en médecine vétérinaire, ou pour la réalisation de travaux de recherche animale. Nos programmes de formation à la chirurgie, ainsi qu'aux gestes d'administration ou de prélèvements invasifs contribuent aux principes de réduction et raffinement. En effet, pour réduire le nombre d'animaux utilisés en recherche, il convient que les praticiens réussissent les gestes techniques de la façon la plus adaptée et efficace. Pour raffiner les pratiques de recherche, une bonne maîtrise pratique réduit l'inconfort ressenti par l'animal.

Les animaux utilisés sont tous issus d'élevages spécialisés. Ils sont accueillis dans des locaux dont les conditions d'hygiène et d'accueil sont optimales. Ils sont hébergés en groupe sociaux, et des moyens d'enrichir leur milieu sont mis en œuvre : nids et cachettes pour les rongeurs, faux terriers pour les lapins, jouets et tables d'exercice pour les chiens.

En outre, un système de suivi des animaux est mis en place pour limiter leur utilisation et prendre en compte et soigner toute atteinte liée à un geste mal réalisé par un étudiant inexpérimenté.

Nous estimons que pour ces formations, nous utiliserons 8 porcs, 36 rats, 6 chiens, 8 lapins, 8 souris par an soit 66 par an. Un total de 330 animaux pour 5 ans, ce qui correspond au nombre maximum d'animaux permettant un enseignement efficace, respectueux des animaux qui limite leur sur-utilisation.

1742- Le concept d'élevage à haute valeur environnementale, en cohérence avec la vision agro-écologique de l'élevage, devrait favoriser l'émergence de pratiques limitant les intrants et faisant de plus en plus appel aux capacités d'adaptation des animaux. En ce qui concerne les relations entre l'animal et son environnement alimentaire, le processus d'apprentissage est le processus majeur permettant à l'animal d'adapter son régime à ses besoins, mais la question est de savoir s'il est suffisamment flexible pour permettre à l'animal de réaliser finement cet ajustement.

Un bon modèle pour étudier cette flexibilité est celui des petits ruminants parasités et des plantes et aliments riches en composés secondaires (notamment tannins condensés). Un nombre croissant d'études montrent que ces composés bioactifs peuvent avoir des effets très intéressants, notamment pour la nutrition et la santé animale. Les effets anthelminthiques sont particulièrement intéressants en élevage de petits ruminants où le parasitisme par les nématodes gastro-intestinaux représente une contrainte majeure des systèmes herbagers, d'autant plus que les éleveurs sont confrontés à des problèmes de résistance aux traitements chimiques de plus en plus importants.

Dans ce contexte, notre objectif sera de déterminer les flexibilités de sélection alimentaire des ovins pour des aliments plus ou moins riches en tannins et ceci en fonction de leur charge parasitaire et de son évolution. Si nos observations montrent des comportements d'automédication, nous pourrions alors proposer une alternative aux éleveurs, qui pourront choisir de fournir une alimentation riche en tannins aux animaux et ainsi éviter l'utilisation abusive de traitements chimiques.

40 agnelles de race Romane seront réparties en 4 lots de 10 individus. L'alimentation expérimentale sera composée de granulés de sainfoin. Le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) est un fourrage légumineux qui contient des tannins condensés et qui est facilement consommé par les moutons.

L'expérimentation sera divisée en 2 phases successives. Dans la 1ère phase, 2 groupes seront sains (libres de parasites : G1 et G2) et 2 groupes seront expérimentalement infestés (G3 et G4) avec un parasite (*Haemonchus contortus*), responsable de pertes de production importantes à l'échelle mondiale et auquel les animaux sont confrontés naturellement au pâturage (avec la précaution que la souche de parasite utilisée est sensible aux traitements chimiques et modérément virulente). Trente-cinq jours après l'infestation, les animaux de tous les groupes recevront pendant 21 jours le granulé riche en tannins afin qu'ils puissent en percevoir les effets. Lors de la seconde phase, la charge parasitaire sera changée dans deux des quatre groupes : G2 sera infesté et G3 déparasité. L'état parasitaire de G1 et G4 restera inchangé (groupes contrôles). Au total, quatre périodes de mesure des préférences alimentaires (de 4j, 4j, 4j, et 14j), entre l'aliment riche en tannins et celui pauvre en tannins, seront réalisées à des moments clés de l'expérimentation pour comparer les préférences selon l'état parasitaire des animaux et son évolution au cours du temps.

Pendant toute la durée de l'expérience, les agneaux seront pesés chaque semaine afin de vérifier leur croissance et de contrôler leur état de santé en relation avec leur charge parasitaire. Ils seront également suivis par des prises de sang régulières afin de contrôler les effets de l'infestation parasitaire. Tout au long de l'expérience, les animaux recevront en complément un apport de fourrage grossier de manière à fournir les fibres nécessaires au bon fonctionnement du rumen ainsi qu'une ration de céréales afin d'apporter tous les nutriments nécessaires à la croissance des animaux et à leur équilibre alimentaire.

Un test préliminaire sera également réalisé. Il a pour objectif de démontrer que les animaux sont capables de discriminer les granulés de sainfoin, condition indispensable à un choix alimentaire volontaire. Pour cela nous utiliserons un lot supplémentaire de 6 agnelles qui seront soumises à des choix alimentaires binaires entre le granulé de sainfoin riche en tannins et trois lots de sainfoin pauvres en tannins (soit 3 combinaisons), portant ainsi le nombre total d'animaux à 46. Ce test nous permettra de finaliser notre choix sur le lot de sainfoin pauvre en tannin à utiliser pour l'expérimentation principale.

Un suivi quotidien de l'état et du comportement général des animaux permettra d'ajuster les traitements pour la réussite du protocole et éventuellement de réduire la contrainte appliquée à un animal et de le retirer de l'expérimentation si les critères d'exclusion sont atteints.

Ce projet veille à respecter la règle des 3R. En matière de remplacement, les méthodes alternatives de type *in silico* ne permettent pas à l'heure actuelle d'étudier les comportements alimentaires des animaux en cas d'infestation parasitaire. C'est

pourquoi il est nécessaire de réaliser une expérimentation sur animaux. Toutefois, le nombre d'animaux utilisé a été réduit au minimum tout en restant suffisant pour des analyses statistiques fiables compte-tenu de la variabilité interindividuelle. Enfin, en ce qui concerne le raffinement des animaux, une attention particulière a été portée aux conditions d'hébergement des agnelles. Celles-ci seront maintenues en groupe en dehors des tests de choix afin de respecter leur comportement social. Le bâtiment d'hébergement dispose d'un éclairage naturel et une litière de copeaux de bois sera fournie aux animaux tout au long de l'expérience. Par ailleurs, les agnelles seront surveillées quotidiennement par du personnel qualifié pour leur état et leur comportement.

1743- Les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson sont associées à des pertes neuronales importantes, qui de façon chronique et répétée peuvent conduire à des phénomènes inflammatoires permanents. Cette composante inflammatoire participe au mécanisme de la mort neuronale et joue donc un rôle important dans le développement et le maintien de ces maladies neurodégénératives.

Ces phénomènes inflammatoires centraux peuvent être étudiés par le suivi de protéines impliquées dans ces processus inflammatoires grâce à une technique d'imagerie *in vivo* appelée la bioluminescence.

Pour cela des modèles d'animaux transgéniques ont été développés de manière à ce que certaines de leurs cellules produisent une enzyme, la luciférase, lors de processus inflammatoires. En présence de son substrat, la luciférine, une réaction chimique se produit, entre la luciférase et la luciférine, convertissant l'énergie chimique de cette réaction en photons, dont l'énergie lumineuse est détectable par une caméra LCD.

Grâce à cette technique, il est possible dans ce modèle de souris transgéniques, de suivre l'évolution de phénomènes inflammatoires de manière répétée dans le temps sans avoir recours au sacrifice de l'animal. Cette technologie d'imagerie permet ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisé et la souffrance qui aurait pu être engendrée par d'autres techniques invasives.

L'objectif de ce projet est de détecter et de suivre par une méthode non invasive d'imagerie par bioluminescence, l'évolution d'une inflammation du tissu cérébral.

Une première phase de mise au point (500 animaux) sera nécessaire pour déterminer l'apparition et l'évolution de l'inflammation du tissu cérébral.

Il faudra dans un second temps définir les conditions adéquates à la réalisation d'une activité de screening (agent pro-inflammatoire utilisé, injection unique ou répétée, durée et intensité de l'inflammation, quantification de l'inflammation par bioluminescence) pour in fine déterminer le nombre (estimé à 2500 animaux) et la constitution des groupes d'animaux lors des études de l'efficacité de molécules. Cette approche vise à éviter la multiplication des expérimentations et ainsi diminuer le nombre d'animaux utilisés.

Les études seront réalisées chez des animaux jeunes ainsi que chez des animaux âgés afin de suivre l'évolution de l'inflammation à différents âges.

Les injections intracérébrales d'agents pro-inflammatoire seront réalisées sous anesthésie et analgésie. Les cages des animaux seront enrichies de tubes de coton pour favoriser leur instinct de nidification.

De plus une surveillance accrue sera également assurée afin d'identifier tout signe de souffrance et de soustraire si besoin les animaux des études en cas d'atteinte des points limites définis.

L'utilisation de ces modèles transgéniques est nécessaire dans ce projet pour prendre en compte les différents mécanismes de régulations, dans le contexte d'un organisme entier, qui sont impliqués lors de l'apparition et l'évolution de l'inflammation du tissu cérébral et que l'on ne retrouve pas *in vitro* dans des modèles cellulaires.

L'objectif final de ce projet est d'étudier l'effet de molécules sur la modulation de l'inflammation du tissu cérébral afin d'identifier des mécanismes d'action et/ou des molécules pouvant diminuer voir stopper la neuro-inflammation caractéristique dans les maladies neurodégénératives.

On peut estimer sur toute la durée du projet (5 ans), une utilisation d'environ 3000 souris transgéniques.

1744- L'infection chronique par le virus de l'hépatite C (VHC) est une des causes principales de maladie hépatique et de carcinome hépatocellulaire (CHC) en Europe. Il est généralement supposé que le VHC contribue au développement du CHC de façon directe grâce à certaines protéines virales et de façon indirecte à travers des processus de signalisation cellulaires entraînant une inflammation chronique. Mais les mécanismes contribuant au développement du CHC ne sont pas bien connus. Certaines protéines appelées phosphatases régulent les voies de signalisation induites par d'autres protéines appelées kinases et sont associées dans le développement de diverses maladies et syndromes. L'expression de la tyrosine phosphatase delta (PTPRD ou PTPdelta) est significativement réduite dans des biopsies de patients chroniquement infectés par le VHC. De façon intéressante, l'expression réduite de PTPRD est associée au développement de cancers incluant les cancers tête/cou, les mélanomes, les cancers du poumon et les glioblastomes. L'expression de PTPRD est réduite dans les cellules du foie, les hépatocytes primaires, infectés par le VHC et cette expression réduite est associée au développement de CHC chez les patients. De plus, une expression élevée de PTPRD dans les tissus sains entourant les tumeurs est corrélée à une augmentation de la survie des patients atteints de CHC et à une diminution de la récurrence des tumeurs après résection chirurgicale. Ces données mettent en avant le rôle supposé de PTPRD comme suppresseur de tumeur dans le foie.

Afin d'évaluer l'impact de l'expression de PTPRD sur le développement du CHC nous souhaitons mettre à profit un modèle de souris KO n'exprimant pas PTPRD. Grâce à ce modèle, nous voudrions induire le développement de tumeurs par injection de diethylnitrosamine (DEN) afin d'étudier le développement des tumeurs hépatiques. Pour cette étude nous envisageons d'utiliser 480 animaux. Afin de remplacer et de réduire au maximum le nombre d'animaux requis une grande partie des

expériences ont été ou seront menées in vitro sur des lignées cellulaires ou des hépatocytes primaires humains et ex vivo sur des biopsies de patients atteints de CHC induits ou non par le VHC. 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, persistants au-delà de 48h suite à l'injection d'un analgésique.

1745- Chaque hiver, 460 000 nourrissons sont victimes d'une bronchiolite liée au virus respiratoire syncytial (VRS), caractérisée par une obstruction des poumons. Malheureusement, il n'existe aucun vaccin contre ce virus. Beaucoup d'adultes sont régulièrement réinfectés par le VRS. Ces personnes possèdent une immunité mémoire contre le virus, mais celle-ci est inefficace à long terme. Chez la femme enceinte, cette immunité mémoire permet de protéger le nourrisson contre les formes graves de l'infection car des anticorps protecteurs lui sont transmis par le placenta durant la grossesse puis par l'allaitement. Malheureusement, le niveau d'immunité préexistant chez les femmes en âge de procréer est hétérogène et généralement faible. Ainsi, un « rappel » de cette immunité préexistante à l'aide d'un vaccin serait une approche pertinente pour protéger le nourrisson.

Notre projet vise à élaborer un vaccin « rappel » contre le VRS pour la femme enceinte. Ce vaccin est un vaccin inerte, composé de protéines recombinantes qui seront administrées à l'aide de patchs épicutanés (sur peau intact, sans injection). L'évaluation de notre vaccin à l'aide de modèles animaux est indispensable, car la réponse immunitaire repose sur un ensemble de cellules de notre organisme et de leur capacité à circuler entre les organes lymphoïdes et les tissus infectés (ici le poumon). Chez la souris adulte, la vaccination épicutanée avec nos protéines protège efficacement contre le VRS. Afin d'évaluer l'efficacité de notre vaccin dans le contexte du transfert d'une immunité protectrice de la mère à l'enfant, nous utiliserons des souris gestantes comme modèle expérimental.

Afin de mettre au point notre modèle expérimental puis de tester l'efficacité du transfert de l'immunité maternelle aux souriceaux, ce projet durera 3 ans et comprendra 3 expérimentations sur 242 souris par an (au total 726 souris). Le nombre d'animaux dans une expérience répond à des besoins statistiques et à la nécessité d'inclure des groupes expérimentaux témoins non vaccinés.

Des souris femelles possédant une immunité mémoire contre le VRS seront accouplées. Les souris gestantes seront alors vaccinées par patch afin de réactiver leur immunité mémoire. Après leur naissance, Les souriceaux seront élevés avec leur mère jusqu'au sevrage à l'âge de 3 semaines. Une prise de sang sera alors réalisée pour rechercher les anticorps protecteurs transmis par la mère. Les souriceaux seront ensuite infectés par le VRS puis observés et pesés quotidiennement par le personnel de l'animalerie. Lors de l'autopsie, réalisée 5 jours après l'infection, les poumons seront prélevés pour y rechercher le virus et des anticorps protecteurs. Le vaccin est efficace si on ne retrouve pas de virus dans les poumons.

Le confort et le bien-être des animaux seront maximisés (période d'acclimatation, enrichissement du milieu, limitation du nombre d'animaux par cage, changement de litière régulier). Aussi, nous veillerons à limiter au maximum le stress et la souffrance générés par l'expérimentation. Ainsi, les animaux seront anesthésiés avant toute manipulation (pose de patchs, infection VRS). L'infection VRS engendre très peu de pathologie chez la souris. Si exceptionnellement cela était le cas, un animal souffrant présentant une perte de poids > 20% serait immédiatement euthanasié.

1746- Les arythmies ventriculaires cardiaques et la mort subite, leur conséquence la plus dramatique, sont un problème majeur de santé publique, notamment au cours de l'insuffisance cardiaque (IC) où elles représentent plus de la moitié des décès. Malheureusement, les traitements actuels sont encore limités soulignant des lacunes dans notre compréhension des mécanismes impliqués. Au cours des dernières années, l'implication de l'aldostérone dans la physiopathologie de l'IC a pris un nouvel essor suite à des essais cliniques, montrant les effets bénéfiques des antagonistes aux récepteurs des minéralocorticoïdes (RM) sur la survenue des arythmies associées à l'aldostérone. Cependant, le rôle physiologique et physiopathologique de l'aldostérone dans la fonction cardiaque reste encore obscur. Des études récentes montrent qu'une altération des canaux calciques voltage-indépendants, les canaux *Orai1*, jouerait un rôle primordial dans la genèse des troubles du rythme. Notre projet vise à mieux comprendre la physiopathologie de l'IC et les arythmies associées par la caractérisation d'une nouvelle voie de régulation des canaux *Orai1* via la signalisation aldostérone/RM. En effet, si le rôle de l'aldostérone dans les cellules rénales est largement décrit, son implication dans l'IC reste mal compris soulignant l'intérêt de l'analyse de son mécanisme d'action dans la fonction cardiaque afin de faire progresser les connaissances, ou encore d'offrir des outils pour tester de nouvelles approches thérapeutiques. Nous avons obtenu une souris transgénique présentant une invalidation de ces canaux *Orai1* spécifiquement dans le coeur qui va nous permettre d'étudier leur rôle dans la physiopathologie cardiaque, en condition normal ou après un stress pathologique.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour évaluer nos hypothèses car il est nécessaire d'étudier la fonction cardiovasculaire dans un contexte physiologique et physiopathologique, notamment au cours de l'IC, un processus complexe impossible à simuler in vitro.

Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont mis à mort en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin aussi de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux

ne subissent aucun stress. Le nombre total de souris utilisées sera de 250 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal.

1747- La réponse clinique à une infection grippale peut se manifester par des symptômes qui vont d'un état fébrile jusqu'à la pneumonie sévère. A ce jour, le rôle de l'inflammation dans les processus aboutissant à ces états pathologiques reste ambigu et il est délicat de définir le stade auquel l'inflammation passe d'un effet protecteur à un effet délétère pour le patient.

Le modèle d'infection grippale chez la souris reproduit très bien ces mécanismes inflammatoires et son emploi permet d'étudier en détail la réponse immunitaire développée en réponse à l'infection. En outre, il permet de tester des médicaments anti-viraux en développement afin de valider leurs effets contre le virus de la grippe. L'emploi du modèle souris pour étudier les mécanismes pathologiques liés à la grippe est pertinent car il permet de comprendre la dynamique de l'inflammation pulmonaire et de suivre l'afflux de cellules immunitaires au niveau des voies respiratoires. Il permet ainsi de caractériser finement des éléments clés de la réponse de l'hôte qui peuvent être de futures cibles thérapeutiques.

La souche de souris de référence étudiée est la lignée C57Bl/6. Elle sera comparée à des souris génétiquement modifiées pour des gènes de l'immunité : (TLR3 KO; MAVS KO; IL33 KO; ASC KO; NF-kB Luciferase). Ces animaux sont élevés spécialement pour notre étude de l'immunité anti-grippe, ils proviennent d'élevages reconnus et sont nés en captivité. Chaque expérience type repose sur l'étude de lots de 10 animaux. L'estimation annuelle de l'emploi de souris pour ce protocole est de 300 souris, ce qui représente un total de 1500 souris pour l'ensemble du projet qui dure 5 ans.

Afin de se conformer aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, un système d'étude in vitro sur cellules en culture été mis en place au laboratoire. Cette approche permet de s'affranchir de l'emploi d'animaux dans toutes les étapes de mise au point qui seront réalisées in vitro. Ainsi, seules les validations finales des grandes orientations du projet seront réalisées sur l'animal : étude des capacités respiratoires et caractérisation de l'immunité pulmonaire. Une attention particulière sera apportée à l'emploi d'un nombre minimal d'animaux tout en maintenant des effectifs compatibles avec l'analyse bio-statistique.

L'état de santé des animaux sera l'objet d'une attention particulière, les souris seront surveillées tout au long de l'expérience et l'état pathologique sera évalué grâce à des critères stricts basés sur la perte de poids, la température corporelle ainsi qu'à l'établissement d'un score clinique approprié à la mesure de la souffrance.

1748- Les vascularites sont des maladies inflammatoires des vaisseaux sanguins de l'organisme. Leurs symptômes varient en fonction du type et de la localisation des vaisseaux sanguins atteints. Les vascularites les plus graves sont celles qui affectent les organes vitaux comme les reins, le cœur et les poumons, car elles peuvent causer des dégâts irréversibles.

Des études récentes ont montré qu'une enzyme, la myéloperoxydase (MPO) est à l'origine des vascularites, et que limiter son action à l'aide d'un inhibiteur, le PF-1355 permet de traiter efficacement les vascularites in vivo dans plusieurs modèles.

Récemment, nous avons montré que le CB-137, un nouveau composé, inhibe l'activité de la MPO avec une plus grande affinité que le PF-1355.

Notre projet vise à démontrer que cette plus haute affinité pourrait lui conférer une meilleure efficacité dans le traitement des vascularites que le PF-1355.

Cette hypothèse sera testée sur un modèle de vascularites in vivo tel qu'établi dans la littérature, puisqu'aucun modèle in vitro de ces pathologies n'existe.

Dans un premier temps, nous établirons, dans nos conditions expérimentales, le modèle de vascularites. Il faut ajouter que les différences de sexe peuvent influencer la manière dont un médicament est métabolisé et donc son efficacité. Bien qu'aucune différence liée au sexe n'ait été rapportée pour le modèle de vascularites et pour la molécule PF-1355, nous souhaitons déterminer s'il en est de même pour le CB-137. Nous allons donc tester le CB-137 dans le modèle de vascularites, à la fois chez les mâles et les femelles. Pour cette étude préliminaire, un total de 42 animaux sera nécessaire (groupe contrôle de 3 mâles et 3 femelles ; 4 groupes traitements de 9 animaux).

Une fois que le modèle est mis en place, le projet utilisera 100 à 164 animaux supplémentaires répartis sur deux génotypes (en fonction de si on observe un effet genre): des animaux sauvages (n=50 ou 82) et des animaux génétiquement modifiés déficients pour la MPO (souris MPO-/-, n=50 ou 82) afin de s'assurer de la spécificité de l'effet observé. Les animaux de chaque génotype seront divisés en 5 groupes expérimentaux (n=9 animaux/ groupes) + 1 groupe contrôle (n=5 animaux/groupe) prenant en compte la variabilité interindividuelle (variabilité de déclenchement des vascularites et variabilité de réponse au CB-137). Si aucun effet du sexe n'est observé 100 femelles seront donc utilisées. Si un effet genre est observé un total de 3 groupes expérimentaux (n= 9 animaux) et 1 groupe contrôle (n=5 animaux) de sexe mâles pour chaque génotype (sauvage ou MPO-/-) seront introduits en plus dans l'étude pour comparaison (164 animaux). Pendant toute la durée de l'expérience, pour limiter le stress, les animaux seront hébergés en cage collectives (n=5 congénères / cage) avec du matériel de nidation et des bâtons à ronger. Pour réduire la douleur, les vascularites seront induites sous anesthésie générale associée à une analgésie sans utilisation d'agents anti-inflammatoires (buprénorphine ou paracétamol).

Pour ce projet, un total de 206 animaux maximum sur 3 ans seront donc nécessaires.

1749- Ce modèle d'emphysème induit par l'élastase de porc est un modèle d'une des caractéristiques physiopathologiques d'une pathologie humaine très répandue, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). L'emphysème pulmonaire est caractérisé par la destruction des voies aériennes distales. Le modèle animal le plus répandu dans la littérature scientifique est l'emphysème induit par l'administration d'élastase (de porc majoritairement). Les élastases lysent l'élastine, composant majeur responsable de l'élasticité des poumons. Les élastases vont dégrader cette élastine au niveau alvéolaire

majoritairement provoquant la déstructuration du tissu alvéolaire et une déformation importante de l'architecture du tissu pulmonaire. Ces déstructurations causent une forte diminution de la superficie utilisée pour les échanges gazeux des alvéoles. Le grand intérêt de ce modèle d'emphysème chez la souris est de pouvoir étudier l'évolution de la déstructuration des poumons et de pouvoir étudier les médiateurs qui favorisent l'apparition de ces symptômes.

L'objectif est donc de valider ce modèle au laboratoire pour permettre de bien connaître ce modèle largement utilisé dans la littérature pour pouvoir répondre au mieux aux questions scientifiques concernant l'emphysème et proposer ce type de modèle dans l'institut

Remplacement :

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

Raffinement :

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

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés sera optimisé pour obtenir des résultats exploitables. De plus, les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter toute redondance dans l'étude des phénotypes engendrés par l'administration d'élastase. Ainsi, un maximum de 56 souris seront utilisées pendant ce projet.

1750- L'ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2 (AOA2) est une maladie génétique rare très invalidante dont les premiers symptômes apparaissent chez l'enfant et évoluent progressivement vers une perte de la capacité à marcher. La maladie résulte d'une atteinte neuronale au niveau du cervelet et au niveau des fibres sensitives et motrices périphériques (neuropathie axonale). Sur le plan génétique, la maladie est due à des mutations dans le gène SETX codant pour une protéine nucléaire appelée Sénataxine, qui est impliquée dans le métabolisme de l'ADN et de l'ARN. Récemment, notre institut a généré une souris avec une délétion constitutive du gène Setx dans le cadre d'un large programme de mutagenèse européen. Les analyses phénotypiques préliminaires effectuées montrent une atteinte légère du système nerveux, suggérant que le modèle pourrait reproduire l'atteinte observée chez l'Homme. Le but du projet est de récupérer ce modèle souris et d'utiliser l'expertise du laboratoire dans l'étude des ataxies récessives afin de le caractériser de façon exhaustive sur le plan comportemental et physiologique. Cette étude nous permettra de déterminer si le modèle souris reproduit les symptômes de l'AOA2 et de mieux comprendre les mécanismes physiologiques impliqués dans le développement de la maladie. A terme, l'étude de ces souris fournira les éléments nécessaires pour la mise en place et l'étude d'approches thérapeutiques pertinentes. Au total, le projet nécessite l'utilisation de 850 animaux pour les études et le maintien de la lignée. Ce nombre se justifie par le nombre des approches nécessaires pour caractériser le modèle et par la nécessité d'une puissance statistique suffisante afin de conclure sur les résultats obtenus. Néanmoins, le phénotype exact étant inconnu, le nombre de souris pourra être réévalué à la baisse en fonction des résultats obtenus et de la détermination des étapes clés de l'évolution de la maladie chez l'animal. Bien que les analyses préliminaires indiquent que le phénotype est léger et n'induit pas de mortalité accrue, nous porterons une attention particulière au bien-être des animaux tout au long du projet.

1751- Le but de cette étude est de mieux comprendre l'impact d'un mélange d'oligosaccharides prébiotiques apporté pendant la période périnatale sur le comportement de souris (femelles allaitantes et juvéniles).

Pour cela, des souris femelles seront exposées à divers types d'aliments une semaine avant l'accouplement : elles seront ensuite exposées à cet aliment pendant la gestation et l'allaitement. Nous évaluerons à la fois le comportement des mères pendant la période d'allaitement, le développement des petits et le comportement des petits une fois qu'ils ont atteint l'âge adulte.

Eléments de remplacement, réduction et raffinement mis en œuvre :

- Raffinement : L'enrichissement dans les cages d'hébergement sera systématique (Nestlets®).

- Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée.

- Réduction : Dans ce type d'étude, comme les animaux de chaque portée ne sont pas indépendants, les petits d'une même portée seront dédiés à des protocoles différents. Les animaux utilisés sont répartis comme suit :

- 32 femelles et 16 mâles pour la partie reproduction

- si chaque femelle a une portée on pourrait obtenir 32 petits mâles et 32 petites femelles pour la partie développement et comportement adulte.

Soit un total maximum de 112 souris.

NB : Cette souche de souris n'a pas de capacité de reproduction élevée et on peut espérer obtenir une quinzaine de portées viables.

1752- Les cancers du système digestif occupent une place prépondérante en nombre et en gravité. Une proportion importante des cancers digestifs non-intestinaux se développe à partir de lésions précancéreuses présentant des caractères de type intestinal. Les objectifs de ce projet de recherche sont 1- de caractériser ces lésions précancéreuses survenant dans un

modèle de souris transgéniques, 2- de les comparer aux lésions retrouvées chez l'homme et 3- d'étudier expérimentalement leur potentiel pathologique dans différents organes. La réalisation de ce projet utilisera un nombre réduit d'animaux transgéniques pour la caractérisation des lésions. Le nombre total d'animaux utilisés pour ce projet sera de 460. Ces études seront menées chez l'animal car elles nécessitent de prendre en compte la physiologie de l'animal. Les souris seront élevées dans des conditions sanitaires et de bien-être optimales.

1753- *Clostridium difficile* est une bactérie anaérobie stricte, première cause de diarrhée nosocomiale chez l'adulte dans les pays développés et en particulier en France (> 24000 cas par an, 14 % de formes compliquées marquée par 3 % de mortalité). La contamination se fait à partir des spores largement présentes dans l'environnement, notamment des services de soins hospitaliers. Les infections à *C. difficile* peuvent évoluer sur un mode épidémique (exemple de l'épidémie qui a touché tout le Nord de la France en 2006), et représentent un coût sanitaire important, en raison de l'augmentation des durées moyennes de séjours et du surcoût des soins associés. Malgré des traitements antibiotiques généralement efficaces, les récurrences des infections à *C. difficile* sont fréquentes (environ 20 %) et des résistances aux antibiotiques apparaissent.

C. difficile produit des toxines, principalement responsables des signes cliniques, ainsi que des facteurs, majoritairement d'origine protéique, qui interviennent dans l'établissement de l'infection, notamment dans l'étape de colonisation du tube digestif de l'hôte par la bactérie. Notre laboratoire s'est spécialisé dans l'étude de cette étape et travaille plus particulièrement sur le rôle des flagelles de cette bactérie dans l'induction et l'amplification de la réponse inflammatoire observée au cours de l'infection. Nous avons récemment démontré que ces flagelles sont capables d'induire une réponse inflammatoire sur des cellules épithéliales en culture. Cependant, ces résultats restent difficiles à extrapoler *in vivo*. L'utilisation d'un modèle animal déjà validé chez la souris constitue l'étape incontournable de notre étude. L'exigence de réduction, raffinement, et remplacement des animaux sera respectée avec d'une part une souffrance animale résultant d'une diarrhée modérée spontanément résolutive extrêmement réduite et une intervention minimale sur l'animal jusqu'au point final, et, d'autre part, la réduction au maximum du nombre d'animaux afin de conclure sur ces expériences sans avoir besoin de les renouveler. Ainsi, un minimum de 6 souris par groupe (n=6) est nécessaire pour obtenir suffisamment de puissance statistique soit 24 animaux sur l'ensemble des essais programmés.

Les résultats de cette étude permettront de mieux comprendre la physiopathologie de l'infection à *C. difficile* et de cibler les flagelles et la réponse inflammatoire dans la lutte contre cette infection.

1754- Le cancer est un problème de santé public majeur, touchant un individu sur trois au cours de son existence. Le vieillissement de la population et des modes de vie plus sédentarisés entraînent une augmentation de l'incidence de plusieurs pathologies cancéreuses, ainsi que des coûts supportés par la collectivité. Si des améliorations significatives ont été obtenues au cours des dernières décennies pour le traitement et la prise en charge des patients, le diagnostic du cancer reste une pathologie lourde avec un pronostic souvent très sombre. Les approches immunothérapeutiques s'appuyant sur des molécules immuno-modulatrices (anti-CTLA4 et anti-PD1) ont apporté des avancées récentes remarquables démontrant le potentiel du système immunitaire dans la lutte anti-tumorale. Le développement de vaccins thérapeutiques anti-tumoraux a soulevé un enthousiasme important au vu des excellents résultats obtenus en préclinique, mais a obtenu jusqu'à présent des résultats décevants dans les phases cliniques avancées. Ces études ont permis néanmoins de renforcer nos connaissances des mécanismes immunitaires impliqués dans la réponse et la tolérance lors du développement tumoral. Au-delà des améliorations des vaccins eux-mêmes, des adjuvants utilisés, les traitements les plus récents agissant par la modulation du système immunitaire ouvrent des perspectives de synergies importantes pour l'élaboration de traitements combinés avec une efficacité renforcée.

Notre partenaire est une société de biotechnologie émergente spécialisée dans le développement de vaccins pour des indications de santé publique insuffisamment prises en charge. La conception de ces vaccins permet de cibler un panel large de séquences antigéniques, avec une bonne couverture populationnelle en termes d'haplotypes HLA, et de stimuler les bras humoraux et cellulaires de l'immunité, permettant d'envisager les applications thérapeutiques au-delà du prophylactique.

La stratégie de développement d'un vaccin thérapeutique en oncologie s'appuie sur une démonstration de la pertinence de l'approche sur un modèle préclinique – preuve de concept.

Les expérimentations animales de ce projet serviront à mesurer les réactions immunitaires déclenchées par l'adjuvant, immunomodulateur de la réponse vaccinale.

Cette réponse sera étudiée au niveau systémique (sanguin) et local (ganglions lymphatiques) par analyse des populations cellulaires présentes.

Plusieurs protocoles seront ainsi effectués afin de déterminer quelles sont les réponses à plusieurs adjuvants déjà utilisés en clinique ou en cours de développement chez notre partenaire.

Afin de tester les différentes formulations, un maximum de 8 protocoles est prévu par année, pouvant se répéter sur les 5 années à venir.

Bien qu'il s'agisse de maxima et que nous souhaitons utiliser le moins d'animaux possible, cette étape est obligatoire pour s'assurer de l'efficacité et de l'innocuité de l'adjuvant développé.

Nous utiliserons 42 animaux par protocole, répartis en 7 groupes de 6 animaux. Le nombre total d'animaux pour ce projet peut atteindre 1680 animaux, tout en considérant qu'il s'agit d'un maximal et que tous les efforts seront faits afin de déterminer le plus rapidement possible et en utilisant le moins de protocoles possibles, l'adjuvant le mieux adapté au développement de formulations vaccinales.

Il convient donc de signaler que toutes les démarches possibles visant à réduire le nombre de protocoles seront effectuées afin de correspondre aux règles éthiques de réduction du nombre d'animaux utilisés à fin expérimentale. De plus, afin de satisfaire au Raffinement, Les animaux seront observés tous les jours. En cas de doute sur l'état des animaux, un suivi de poids quotidien sera mis en place en accord avec les responsables du bien-être animal et la vétérinaire de notre établissement. Ils seront euthanasiés en présence de critères de souffrance.

1755- Les récents succès de la thérapie génique sur l'adrénoleucodystrophie (une maladie neurologique héréditaire) et sur la β -thalassémie (une anémie héréditaire) ont intensifié l'intérêt pour cette stratégie thérapeutique. Lors du protocole de thérapie génique les cellules souches hématopoïétiques (cellules de la moelle osseuse à l'origine de toutes les cellules sanguines) ont été extraites du patient, modifiées in vitro en insérant une copie normale du gène défectueux, puis ré-administrées. Après quelques semaines, les cellules issues de ces cellules souches ont pu produire la protéine jusque-là déficiente dans le cerveau (adrénoleucodystrophie) ou dans le sang (β -thalassémie). Les progrès réalisés donnent de l'espoir à de nombreux patients, mais des améliorations semblent encore possibles tant sur le plan de la sécurité (utilisation de chimiothérapie d'intensité réduite, ciblage des vecteurs intégratifs au sein des cellules souches hématopoïétiques) que de l'efficacité (modification d'une large proportion de cellules souches, niveau d'expression adéquat du gène thérapeutique).

L'apport des études in-vitro est très limité, car on ne peut pas aujourd'hui faire un suivi à très long termes (plusieurs mois) des cellules modifiées in vitro. Un modèle pré-clinique, in vivo, a été développé pour tester de nouvelles approches, et pour perfectionner chaque étape de ces protocoles. Le primate non humain est particulièrement bien adapté, car la proximité phylogénique avec l'homme entraîne de nombreuses similitudes : les systèmes sanguins sont comparables et les cellules souches ont des caractéristiques semblables. Ainsi la transposition de ce modèle à l'homme sera aisée puisque que nous utiliserons exactement les mêmes procédures, les mêmes médicaments et les mêmes outils.

Notre objectif est de créer le modèle, c'est-à-dire mettre au point l'auto-greffe de cellules souches sanguines modifiées par transfert de gènes chez le primate non humain. Les cellules souches sanguines seront extraites du sang, puis modifiées in vitro, avant d'être réinjectées au même primate qui aura subi un conditionnement de manière à faciliter la prise de greffe. Ensuite nous étudierons à long terme le comportement des cellules modifiées et leur devenir dans le sang et la moelle osseuse du primate.

Ce projet s'inspirera largement de l'expérience acquise et des protocoles déjà établis en thérapie génique et cellulaire utilisant les cellules souches sanguines chez l'homme. Nous adapterons ces procédures à notre problématique. Plus largement, non seulement ces expériences nous permettront de constituer un modèle pré-clinique pour la thérapie génique, mais il pourra aussi être utilisé pour d'autres pathologies humaines touchant le système sanguin.

Cette étude prévoit le recours à 10 primates non humains pour les transplantations et 20 autres comme donneurs de sang, ainsi que 50 rongeurs dont les transplantations permettront de réduire le nombre de primates non humain en protocole. Les animaux sont nés et élevés en captivité dans des élevages reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité statistique des résultats. L'état de santé des animaux sera étroitement surveillé au quotidien tout au long de l'expérience. Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire et des critères d'arrêt sont prévus en cas d'effets inattendus.

1756- La borréliose de Lyme est une infection animale transmise à l'Homme par piqûre de tiques. Les agents responsables de cette infection sont des spirochètes du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato, transmises à l'hôte au cours du repas sanguin de l'arthropode. Dans la plupart des cas cette transmission induit au point de piqûre, une inflammation cutanée : l'érythème migrant. Après dissémination, les manifestations cliniques peuvent être de nature neurologique, articulaire ou dermatologique. Le but de cette étude est d'analyser l'inflammation cutanée initiale au point d'inoculation des bactéries. Pour cela, nous avons établi différents modèles expérimentaux d'infection chez des souris âgées de 4 semaines, utilisant l'inoculation des bactéries *Borrelia burgdorferi* à la seringue ou via des tiques infectées.

Cette étude nous permet aussi de mesurer l'effet immunosuppresseur de la salive de tique et souligne le rôle essentiel de la tique dans la transmission précoce de la maladie.

Ce projet sera mené en conformité avec le principe des 3Rs:

Remplacement : notre modèle est infectieux. Nous travaillons sur la peau au point d'inoculation et nous étudions le système immunitaire de l'hôte. Un modèle complet est donc nécessaire à cette étude.

Raffinement : Une attention particulière sera apportée aux animaux traités afin de limiter leur inconfort. Les animaux sont observés quotidiennement mais si un animal commence à avoir du mal à se déplacer un traitement avec du paracétamol sera mis en place de suite et l'animal sera observé plusieurs fois dans la journée. Si malgré le traitement il n'y a pas d'amélioration de son état alors l'animal sera euthanasié. Les animaux sont hébergés en groupe pendant l'expérience, ils sont nourris ad libitum et leurs cages contiennent des enrichissements permettant leur amusement.

Réduction : Le nombre prévu de souris pour le projet est réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Pour que les données soient publiables, il nous faut au moins 10 souris par point de la cinétique et au moins deux cohortes d'animaux. L'analyse statistique est un student T test.

Le nombre de souris utilisées au cours de cette étude est de 533 pour la souche de souris C3H/HeN sur 5 ans. Plusieurs espèces de *Borrelia* sont testées et plusieurs souches (4x pour *B. burgdorferi* sensu stricto). De plus, pour une souche de *B. burgdorferi* sensu stricto et une souche de *B. afzelii*, les bactéries sont inoculées soit à la seringue, soit via des tiques infectées (140 souris pour chaque espèces). Pour *B. burgdorferi* les autres souches ne seront faites qu'à la seringue (3x 70)

1757- La borréliose de Lyme est une zoonose transmise à l'Homme de façon accidentelle par piqûre de tiques. Les bactéries responsables de cette infection sont des spirochètes du complexe *Borrelia burgdorferi sensu lato*, transmises à l'hôte au cours du repas sanguin de la tique. La transmission de cette infection bactérienne se traduit d'abord par une inflammation cutanée au point d'inoculation, puis une dissémination vers les organes cibles : le cœur, l'articulation, le système nerveux, la peau à distance. L'analyse des mécanismes précoces de la transmission constitue notre principal projet de recherche.

Les souris sont inoculées au niveau de l'oreille afin que le suivi de l'inflammation soit plus visible en l'absence de poils. Pour mieux comprendre le mécanisme de l'inflammation, nous inoculerons en plus des bactéries entières soit certaines protéines de *Borrelia* dont OspC (lipoprotéine de la bactérie essentielle dans la transmission) soit un lipide synthétique, Pam3CSK4 (partie lipidique d'OspC).

Après 6H ou 24H d'inoculation les souris sont euthanasiées par surdose d'isoflurane et élongation cervicale puis les oreilles sont prélevées pour analyse.

Ce projet sera mené en conformité avec le principe des 3Rs:

Remplacement : notre modèle est infectieux nous ne pouvons pas travailler sur des organes isolés car il n'y aurait pas de dissémination dans les organes et il n'y aurait pas de contact du pathogène avec le système immunitaire de l'animal.

Raffinement : Une attention particulière sera apportée aux animaux traités afin de limiter leur inconfort. Ils seront observés plusieurs fois par jour et si l'inflammation de leur oreille devient trop importante alors ils seront euthanasiés. Les animaux restent hébergés en groupe, ils sont nourris ad libitum et leur cage contient des enrichissements pour leur amusement.

Réduction : Le nombre prévu de souris pour le projet est réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. L'analyse statistique est un student T test.

Nous utiliserons 40 souris / an sur cinq ans, total 200 souris.

1758- L'avènement et l'utilisation de la sélection génomique ont révolutionné l'élevage bovin. Afin d'alimenter ce progrès génétique, notre pays doit mettre en place de nouvelles stratégies visant à optimiser le renouvellement de nos troupeaux. D'un point de vue économique, il serait intéressant de réduire l'intervalle de génération chez le bovin. Cet intervalle générationnel se définit par l'âge de la mère à la première insémination (puberté = 15-18 mois) et le temps de gestation (9 mois, difficilement compressible). Notre équipe propose de développer une technique innovante afin de réduire le temps de génération en contournant l'âge de la puberté femelle. Nous envisageons de greffer des ovaires fœtaux bovins chez des souris dépourvus de système immunitaire afin d'obtenir des ovocytes prêts à féconder en quelques mois. Le développement de cette technique dans notre thématique serait un gain de temps considérable permettant de réduire de moitié l'intervalle de génération chez le bovin. Cette stratégie expérimentale est utilisée en thérapie humaine dans un contexte de préservation de la fertilité dans le cas de cancers. Elle nécessite néanmoins l'utilisation d'animaux dépourvus de système immunitaire pour permettre l'implantation et le développement du greffon. Ces modèles animaux sont essentiellement développés chez les rongeurs et nous avons choisi d'utiliser la souris pour sa taille réduite. Dans ce projet impliquant des greffes de tissus, il est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Les mécanismes étudiés mettent en jeu des interactions complexes au sein de l'hôte, qu'il est impossible de reproduire dans un modèle cellulaire ou de cultures d'organes.

Le protocole prévoit d'utiliser au maximum 62 souris immunodéficientes. Ces animaux proviennent d'élevages reconnus et sont nés en captivité. Lors de la conception du protocole expérimental, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

Des échelles cliniques journalières et l'application de critères d'arrêt permettent de veiller au bien-être des animaux. La technique de greffe se fera sous anesthésie générale et sera suivie d'une injection d'analgésique. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésique ont été définis et validés par un vétérinaire. Toutes les précautions sont prises pour utiliser les animaux dans des conditions telles que les souffrances éventuellement engendrées sont réduites au maximum. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésique ont été définis et validés par un vétérinaire. Les critères d'arrêt en cours d'expérimentation sont des signes de mal-être (prostration, état du pelage, arrêt de l'alimentation). En cas de signe de mal-être, l'animal est immédiatement euthanasié. En cas d'évènement indépendant du protocole (blessure, maladie, défaillance technique), après discussion avec le personnel de l'animalerie, la solution que nous adopterions dépendrait principalement de deux critères: le degré de souffrance de l'animal et la possibilité d'utiliser l'animal une fois guéri. Dans tous les cas de maladies, un animal malade ou un prélèvement d'un animal malade sera envoyé au contrôle sanitaire pour vérifier la nature de la maladie, et la possibilité de traitement. Si l'infection est connue, bénigne, et que le traitement est court, celui-ci sera privilégié, en concertation avec les personnels compétents de l'animalerie. En revanche, si la souffrance de l'animal est trop grande ou si l'animal une fois guéri ne peut plus être utilisé pour nos protocoles, il sera euthanasié.

1759- Les myopathies mitochondriales (MM) représentent un groupe de maladies génétiques rares. La caractéristique principale de cette famille de pathologie est un défaut du métabolisme énergétique dû à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire des mitochondries. Ce dysfonctionnement est lié à des anomalies génétiques qui affectent soit des gènes mitochondriaux soit des gènes nucléaires. Une faiblesse musculaire, une hypotonie et une intolérance à l'exercice font partie entre autres des manifestations cliniques de cette pathologie. Bien que plusieurs pistes thérapeutiques soient explorées, il n'existe à ce jour aucun traitement curatif.

Une étude récente réalisée sur un modèle murin reproduisant les caractéristiques de patients atteints de myopathies mitochondriales (i.e. modèle de souris Tfam KO), suggère que le développement de la maladie pourrait être lié à une accumulation excessive de calcium dans les mitochondries. De manière intéressante, une exposition aiguë des fibres

musculaires de souris Tfam KO à la ciclosporine A (CsA), un agent pharmacologique se fixant à la cyclophiline D, induit une diminution de l'accumulation de calcium mitochondrial initialement observée. Aussi, des données préliminaires montrent que la CsA semble augmenter la durée de vie des souris Tfam KO et améliorer leur fonction musculaire squelettique in vitro. Compte tenu de l'action de la CsA sur une seconde voie moléculaire, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique à la cyclophiline D (i.e. Debio 025) permettrait de mettre en évidence les mécanismes impliqués. Ces deux agents pharmacologiques (i.e. CsA & Debio 025) sont déjà couramment utilisés chez l'Homme afin d'éviter les rejets lors des greffes d'organes ou de traiter un certain nombre de pathologies (e.g. les maladies auto-immunes).

Dans l'ensemble, ces deux agents pharmacologiques constituent des stratégies potentielles pour le traitement des myopathies mitochondriales. L'efficacité d'une telle approche thérapeutique doit à présent être évaluée in vivo au niveau préclinique.

Le but de ce projet est de caractériser les effets de deux agents pharmacologiques (i.e. CsA et Debio 025), ayant pour fonction d'inhiber de manière plus ou moins sélective la cyclophiline D, chez le modèle de souris Tfam KO.

1760- Les expérimentations seront réalisées à l'aide d'un dispositif expérimental permettant une exploration totalement non-invasive de la fonction musculaire (i.e. force, métabolisme, anatomie) chez les souris contrôles et transgéniques dans des conditions physiologiques in vivo. Ces expérimentations seront répétées sur les mêmes animaux permettant ainsi un suivi longitudinal in vivo. Ce dispositif permet ainsi de réduire de manière drastique le nombre d'animaux utilisés (i.e. en accord avec la règle des 3R).

Des souris contrôles et transgéniques seront testées avant (i.e. à l'âge de 12 semaines) puis 4 semaines après (i.e. à 16 semaines) l'administration d'un des deux agents pharmacologiques (i.e. CsA ou Debio 025 ; 120 µg/j par l'intermédiaire d'une mini pompe osmotique implantée sous la peau). Le traitement sera d'une durée de 4 semaines et couvrira la période pendant laquelle la MM évolue vers une forme sévère (i.e. à partir de l'âge de 12 semaines). Pour chaque agent pharmacologique, la taille de l'échantillon (i.e. 15 souris maximum) a été déterminée à l'aide d'une analyse statistique prévoyant une augmentation de 25% de la force maximale téτανique chez les souris transgéniques traitées. Au total, dans cette étude 60 souris seront testées (deux lots de souris : traitées vs. non traitées, et deux groupes/lot : contrôles vs. transgéniques).

Ce projet de recherche innovant s'inscrit clairement dans un cadre translationnel depuis un travail de recherche fondamentale vers un transfert clinique. Grâce à l'analyse comparative des effets de deux agents pharmacologiques inhibiteurs de la cyclophiline D, ce projet de recherche devrait également fournir des informations clés sur les aspects métaboliques et fonctionnels d'une thérapie potentielle permettant une amélioration la fonction musculaire in vivo.

1761- Le mélanome est le plus grave des cancers de la peau avec une incidence qui double environ tous les 10 ans. Les mélanomes sont des tumeurs malignes développées aux dépens des mélanocytes, des cellules de l'épiderme impliquées dans la photoprotection. Le traitement repose sur l'exérèse précoce de la tumeur primaire. Ce traitement est efficace sur les mélanomes localisés et de faible épaisseur. Cependant, les mélanomes évoluent généralement vers des formes métastatiques résistantes à la radiothérapie et aux chimiothérapies classiques. Ainsi, le pronostic du mélanome à un stade métastatique reste extrêmement mauvais puisque le taux de survie à 5 ans ne dépasse pas 10-15%. Très récemment, de nouvelles thérapies ciblant l'oncogène BRAFV600E (une mutation retrouvée chez 50% des patients) ont vu le jour. Le composé le plus avancé est le Vémurafénib qui a montré une amélioration de la survie globale et de la survie sans progression de la maladie pour environ la moitié des patients porteurs de la mutation. Toutefois, l'émergence rapide de résistances acquises parfois très agressives limite son utilisation en clinique en monothérapie. Il apparaît donc urgent de proposer de nouvelles alternatives thérapeutiques aux patients souffrant de cette pathologie.

Nous avons découvert que le récepteur du morphogène Hedgehog (Patched), qui est surexprimé dans de nombreux cancers agressifs à récives et métastases et plus particulièrement dans les mélanomes, possède une activité d'efflux de drogues et confère aux cellules qui l'expriment la capacité à résister à de multiples drogues (MDR) dont certains agents chimiothérapeutiques comme la doxorubicine. Cette étude a permis de désigner Patched comme une nouvelle cible thérapeutique pour améliorer l'efficacité des chimiothérapies sur les cancers qui surexpriment Patched. Nous avons développé des tests de criblage de banques de molécules chimiques qui ont permis d'identifier une dizaine de composés capables d'inhiber l'activité d'efflux de doxorubicine de Patched. Deux de ces composés augmentent fortement la cytotoxicité de cet agent chimiothérapeutique avec des IC50 de 1 à 5 µM sur plusieurs lignées de mélanomes métastatiques. Ces composés sont des médicaments bénéficiant déjà d'AMM et prescrits pour différentes pathologies.

Notre projet consiste d'abord à tester l'efficacité anticancéreuse de ces composés in vivo dans un modèle de xéno-greffes sous-cutanées de mélanome, puis sur le développement de métastases pulmonaires dans la souris nude. Pour ce faire, nous traiterons les souris avec nos molécules d'intérêt en combinaison avec différentes chimiothérapies anticancéreuses afin de démontrer l'efficacité de ces combinaisons in vivo. A terme, nos résultats pourraient permettre d'améliorer les traitements actuels ou de proposer de nouvelles alternatives thérapeutiques pour le mélanome. Un effort de remplacement et de réduction du nombre d'animaux a été fait en réalisant au préalable cette étude in vitro, et en utilisant quand cela était possible des groupes contrôles communs à plusieurs expériences. De plus, nous utiliserons des techniques d'imagerie non invasive pour suivre l'évolution de la tumeur, afin de prendre en compte et soulager au plus tôt toute douleur manifestée par les animaux. Pour ce projet, nous utiliserons 660 souris.

1762- L'ataxie de Friedreich (AF) est la forme la plus répandue des ataxies héréditaires (1/40000), elle se manifeste par une diminution progressive de la coordination motrice et des troubles de l'équilibre associés à une cardiomyopathie hypertrophique. Les tissus les plus affectés sont le système nerveux ainsi que le muscle cardiaque. La pathologie débute au niveau des ganglions dorso rachidiens (DRG) où se situent les gros neurones sensitifs qui dégèrent chez les patients

évoluant en une dégénérescence des faisceaux spino-cérébelleux, qui partent du DRG et remontent vers le cerveau. Les patients développent de plus une atrophie d'un moyau cérébelleux profond. Le gène responsable de la pathologie code pour la frataxine, une protéine mitochondriale impliquée dans la biosynthèse des protéines à centre fer-soufre. A ce jour, aucun traitement n'est disponible pour l'AF. Nous avons généré dans le laboratoire des modèles murins de la pathologie qui reproduisent notamment les symptômes neurologiques associés à l'AF. Ces souris constituent un bon modèle pour tester des approches thérapeutiques de la pathologie mais le modèle reste néanmoins imparfait car les souris ont une atteinte cérébelleuse qui n'est pas retrouvée chez les patients et développent de plus une atteinte très tardive de la pathologie. L'objectif de ce projet est de développer un nouveau modèle de souris et de le caractériser afin d'évaluer s'il constitue un meilleur modèle pour l'atteinte sensitive de la pathologie.

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

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

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

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

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

1763- La saisonnalité de la reproduction chez les Vertébrés représente une adaptation cruciale aux importantes variations annuelles de l'environnement (durée du jour, température, ressources alimentaires) et permet de grouper les naissances au printemps, lorsque les conditions de croissance et de survie sont favorables.

L'hormone T4 (thyroxine) produite par la glande thyroïde joue un rôle majeur dans la saisonnalité de la reproduction chez les oiseaux et les moutons. Chez le mouton, l'ablation de la glande thyroïde (thyroïdectomie) empêche l'arrêt de la saison de reproduction au printemps.

Ce projet a pour but d'approfondir considérablement notre compréhension de la suite d'évènements par lesquels les hormones thyroïdiennes sont produites et agissent dans le cerveau pour contrôler le rythme saisonnier de reproduction chez la brebis de race Ile-de-France. Le projet examinera précisément où et quand certains gènes-clé impliqués dans ce processus sont activés ou réprimés dans une petite région du cerveau, l'hypothalamus. L'évaluation précise du rôle des hormones thyroïdiennes sera possible grâce à la mise en œuvre d'une approche chirurgicale de thyroïdectomie.

Remplacement : La reproduction saisonnée est par essence un mécanisme physiologique intégré extrêmement complexe qui ne peut être étudié que par une approche in vivo. Bien que les hamsters soient couramment employés dans ce domaine de recherche, leur petite taille exclut des prélèvements sanguins réguliers (bi-hebdomadaires pour ce projet), indispensables pour évaluer l'état reproducteur des animaux.

Les mécanismes généraux de la reproduction saisonnée étant conservés chez les Vertébrés, la portée des résultats ira bien au-delà du modèle ovin. Une meilleure compréhension des mécanismes de la reproduction saisonnée pourrait déboucher sur un meilleur contrôle de la conduite des élevages ovins : l'objectif final est d'optimiser le désaisonnement des animaux pour permettre l'étalement des naissances dans l'année et donc assurer une meilleure compétitivité des éleveurs ovins français dans un contexte très concurrentiel.

Réduction : Puisqu'il s'agit d'un phénomène saisonnier, il est indispensable de l'étudier à différents moments de l'année (notamment lorsque les animaux sont sexuellement actifs ou au repos sexuel), et donc de répéter l'approche, ce qui justifie le nombre de 56 brebis. Chacune des 3 expériences comprend un seul (Exp.1 et Exp.2) ou deux (Exp.3) groupes contrôle et un groupe thyroïdectomisé avec chacun 8 animaux, nombre suffisant pour obtenir des résultats statistiques valides à l'issue du projet.

Raffinement : La chirurgie, effectuée par un vétérinaire, nécessitera une mise au point préalable (évolution clinique des animaux après la chirurgie et traitements, mise au point des dosages hormonaux); un groupe supplémentaire de 8 animaux est prévu à cet effet (nombre total d'animaux pour ce projet = 56). Ce modèle étant supposé invalidant, nous prévoyons un hébergement en cases spacieuses où les animaux seront avec des congénères, avec foin et paille de qualité à volonté; la durée des procédures a été limitée à son strict minimum. La surveillance sera bi-quotidienne.

Le nombre total d'animaux pour ce projet est donc maintenant de $56 + 8 = 64$ brebis.

1764- L'alimentation et l'obésité sont considérées comme des facteurs de risque importants pour le développement du cancer. À cet égard, de nombreuses études ont suggéré un rôle important pour plusieurs nutriments alimentaires dans la progression et le développement de cancer du sein. En dépit de ces données, très peu de chercheurs ont examiné le rôle spécifique du cholestérol et des phytostérols dans l'initiation et la progression du cancer du sein. Pour identifier le rôle des régulateurs tumoraux, nous avons besoin d'utiliser des systèmes animaux dans lesquels l'ensemble des paramètres qui sont modifiés lors du développement du cancer sont présents.

Fait intéressant, les phytostérols et le métabolisme du cholestérol sont liés, mais leurs fonctions respectives dans la régulation du métabolisme cellulaire et comme composant structural des biomembranes sont très différentes. Des études antérieures ont suggéré que les phytostérols pouvaient réduire la formation de tumeurs. Toutefois, une distinction claire entre le rôle du cholestérol alimentaire et le rôle des phytostérols alimentaires dans le cancer du sein n'a pas été évaluée et il est essentiel d'identifier de nouvelles cibles et de nouveaux traitements basés sur le métabolisme des stérols. Dans ce projet, nous allons examiner le rôle du cholestérol et des phytostérols dans la régulation et la progression du cancer en utilisant deux modèles de souris utilisés pour étudier le développement de la tumeur mammaire. L'un des modèles permet d'améliorer l'absorption intestinale de phytostérols alimentaires. Nous allons également examiner et tester une nouvelle méthode de délivrance ciblée des stérols par des lipoprotéines de haute densité reconstituées (rHDL) et tester son effet sur le développement de tumeurs dans un modèle de xénogreffe de cancer du sein. 1310 souris seront utilisées dans ce projet. Ce nombre représente le nombre minimum d'animaux requis pour observer des différences significatives entre les différents groupes expérimentaux. Le développement des tumeurs sera limité et les animaux portant des tumeurs seront particulièrement suivis afin d'éviter toute souffrance. Dans tous les cas, les animaux portant des tumeurs seront particulièrement suivis. Lorsque nécessaire, les souris seront placées sous anesthésie générale pour réduire la douleur.

1765- Les problèmes sanitaires posés par les infections d'origine bactérienne ainsi que les phénomènes de résistance posés par les thérapies antibiotiques actuelles justifient la recherche fondamentale des mécanismes de colonisation et/ou d'infection de l'hôte par les bactéries commensales opportunistes ou pathogènes. La compréhension de ces mécanismes permettra d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques antibiotiques. De nombreux travaux *in vitro* et *in vivo* dans des modèles d'infection chez la souris et le rat ont montré le lien entre la capacité de nombreuses bactéries à acquérir l'hème de l'hôte et leur pouvoir colonisateur et infectieux.

Des bactéries telles que *Streptococcus agalactiae* et *Enterococcus faecalis* sont commensales chez l'homme où elles font partie de la flore intestinale, vaginale et cutanée. Elles peuvent néanmoins devenir pathogènes et être responsables d'infections nosocomiales chez les personnes immunodéprimées. De nombreux facteurs de virulence qui conditionnent la pathogénicité de ces bactéries ont été mis en évidence. Ces facteurs permettent à ces bactéries opportunistes, de coloniser et d'infecter l'hôte. Parmi ces facteurs, la capacité de ces bactéries à capter et utiliser l'hème (présent dans le tube digestif mais majoritairement associé à l'hémoglobine du sang de l'hôte) pour leurs besoins nutritionnels et métaboliques semble déterminante mais reste à démontrer formellement.

L'étape de colonisation de l'hôte est déterminante et conditionne le succès de l'infection bactérienne. Notre projet vise à mettre en évidence l'importance de l'hème dans la colonisation intestinale de modèles de bactéries opportunistes par une approche expérimentale originale. Nous utilisons des bactéries génétiquement modifiées qui émettent de la luminescence soit de manière constitutive soit lorsqu'elles rencontrent de l'hème dans leur environnement (bactéries senseur d'hème). Cette approche permet de suivre le comportement de nos bactéries modèles dans les souris vivantes et en temps réel grâce à un appareil qui permet la détection de la luminescence (Xenogen, In Vivo Imaging system, IVIS). Cette étude a fait l'objet d'un premier projet nommé "Acquisition de l'hème et impact sur les capacités colonisatrices et infectieuses de bactéries commensales et opportunistes GRAM positive dans un modèle d'infection chez la souris C3H et Swiss CD1 par gavage et injection intraveineuse". Ce premier projet nous a permis de mettre au point les conditions expérimentales de cette étude originale et de démontrer la faisabilité de notre approche. Nous avons obtenu des premiers résultats en particulier avec la bactérie *Streptococcus agalactiae*.

Notre but dans ce second projet est d'étudier l'impact de l'hème *in vivo* en utilisant cet outil génétique dans un modèle de colonisation intestinale. Les souris ayant reçu une dose de bactérie par gavage seront observées de manière non-invasive dans un appareil capable de localiser et de quantifier la luminescence en temps réel (Xenogen IVIS 200 imaging system). Les animaux colonisés seront euthanasiés à la fin de l'expérimentation et leurs organes prélevés pour analyse de la luminescence et détermination de la bactériémie.

La stratégie expérimentale du projet respecte la règle « 3R : remplacement, réduction, raffinement » de Russel & Burch.

Le raffinement est respecté par un suivi du bien-être des animaux deux fois par jour, l'utilisation d'une grille d'échelle faciale pour évaluer si il y a souffrance et si tel est le cas le degré de sévérité. De plus, le système de visualisation est un appareil non invasif limitant la souffrance ainsi que l'angoisse de l'animal.

La réduction du nombre d'animaux est possible grâce à des conditions expérimentales déjà mises au point lors d'un précédent projet mais aussi grâce à un système d'anesthésie permettant plusieurs visualisations d'un même animal. Le nombre d'animaux est ainsi minimisé à 240.

1766- 1. Objectif scientifique du projet: Dans un précédent projet, nous avons montré que la présence d'un mélange de 4 polluants (Dioxine TCDD, DEHP, Bisphénol A, PCB153) dans une alimentation riche en gras proposée tout au long de la vie,

provoquait dans la descendance de 1ère génération des désordres métaboliques différents selon le sexe et l'âge, chez la souris. En particulier, les descendants femelles âgées de 12 semaines nourries en présence des polluants (à doses égales ou inférieures à la DJA, Dose Journalière admissible pour l'Homme) montrent une diminution de la tolérance au glucose par rapport à des souris nourries en absence de polluants ainsi qu'une altération de la voie œstrogénique dans le foie. L'objectif du projet est d'explorer l'hypothèse d'une contribution du microbiote intestinal à l'interface entre les polluants de l'environnement et la réponse métabolique. Dans ce contexte, le projet vise d'une part à définir comment le microbiote intestinal est altéré en réponse au cocktail de polluants, et d'autre part si la supplémentation en souches lactobacilles qualifiées dans des études préliminaires permet de tamponner les désordres métaboliques liés aux polluants dans le modèle rongeur;

2- Retombées attendues: Ce projet permettra d'établir une corrélation entre une modification du microbiote et les altérations métaboliques observées dans le modèle rongeur en réponse aux polluants. De plus, l'analyse de la communauté microbienne pourrait constituer une signature de l'exposition aux polluants. Il s'agit d'une démarche interventionniste qui vise à tamponner les anomalies métaboliques induites par une exposition chronique à un mélange faiblement dosé de polluants.

3- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement: Dans le cadre de cette étude expérimentale, nous essayons de limiter au maximum et dans la mesure du possible, le nombre d'animaux utilisés. En effet, pour ce projet le modèle animal est indispensable mais dans le respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux expérimentés est ajusté de sorte à avoir un nombre d'échantillons permettant l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Pour réduire au maximum une éventuelle souffrance des animaux, ceux-ci sont observés régulièrement (comportement, aspect général...) pour déterminer le plus rapidement possible un état anormal nécessitant d'interrompre le protocole.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet: Pour obtenir des résultats exploitables statistiquement, nous tablons sur un nombre de 10 souris par groupe défini. Sachant que nous étudions les descendants de 1ère génération des deux sexes, répartis sur 6 groupes, le nombre d'animaux sera d'environ 234 animaux (parents et 1ère génération) pour une souche de probiotique utilisée. Considérant que nous testerons au moins un autre probiotique, nous utiliserons de l'ordre de 468 animaux répartis sur les 5 ans.

1767- Le facteur « temps » revêt une importance cruciale dans le domaine de l'innovation chirurgicale, notamment pour le développement de nouveaux outils et de nouvelles techniques. La première phase de développement implique toujours, en 2015, l'utilisation de simulateurs et ou de modèles de culture biologique. Néanmoins, avant le passage à l'homme il est indispensable de valider ces outils et/ou ces procédures sur des animaux vivants.

L'expérimentation sur le modèle animal, spécialement le grand modèle animal (cochon), pour des questions de taille des instruments, est une phase obligatoire, à un moment ou un autre, pour la validation de nouveaux instruments. La nouvelle directive régissant l'expérimentation animale (2010/63/EU), est venue combler plusieurs vides dans la législation et fournit aux expérimentateurs des outils forts pour effectuer des recherches dans le plein respect des principes éthiques. De surcroît, ce contrôle a permis une amélioration de la qualité de la recherche, obligeant les chercheurs à des analyses beaucoup plus approfondies avant de débiter les expérimentations et visant à choisir le bon modèle, la bonne taille de l'échantillon etc.

Il existe un délai incompressible entre le dépôt d'un projet de recherche (pouvant regrouper jusqu'à 10 procédures différentes), l'analyse du projet et l'évaluation par le Comité d'Éthique, la transmission du dossier au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et l'acceptation définitive du protocole. Ce délai apparaît dans certains cas rédhibitoire à certains moments cruciaux du développement de certains projets, techniques et outils chirurgicaux. En effet, ce délai est à mettre en regard de la durée de protection offerte par les différents outils de protection de la propriété intellectuelle, enveloppe Soleau, preuve d'un concept, brevet. Ce domaine est enfin excessivement compétitif et attendre des mois pour une preuve du concept peut signifier perdre la possibilité de valoriser le fruit de la recherche avec une potentielle perte de propriété intellectuelle, ou perte d'un contrat avec un partenaire industriel international, ou de l'ouverture d'une start-up, avec perte de potentiels nouveaux emplois.

La démarche expérimentale suit un protocole conventionnel et classique qui inclut :

- Une validation méthodologique de la procédure envisagée pour tester le procédé chirurgical ou le produit à évaluer in vitro ;
- Recherche et évaluation des méthodologies existantes non-animales et validation par ces méthodes (culture cellulaire, tissus animaux, simulateur, réalité virtuelle, simulation informatique) ;
- Le procédé, d'une façon générale, (technique chirurgicale ou matériel chirurgical) sera ensuite évalué sur l'animal.
- Cette étude doit se dérouler sur animal vivant pour en évaluer la faisabilité et la sécurité, les répercussions physiologiques, les réactions tissulaires in-vivo sur les différents organes concernés (nerfs, vaisseaux, tissus musculaires, tissus conjonctifs, peau, tissus digestifs (tube digestif, foie, pancréas, rate, rein ...)). L'ensemble de ces études sont effectuées sous anesthésie générale avec absence de réveil de l'animal.
- Réalisées au sein de l'Institut de Recherche Contre les Cancers de l'Appareil Digestif (IRCAD), de nombreuses études bénéficient des animaux utilisés dans le cadre de l'enseignement délivré à l'Institut de Recherche Contre les Cancers de l'Appareil Digestif. Ce centre reconnu au niveau international forme environ 4.000 chirurgiens par an venants de plus de 100 pays différents.
- Les procédures utilisées sont validées par le Comité d'Éthique. De façon à préserver et à réutiliser au maximum les animaux, la plupart de ces études sont effectuées lors des cours ou d'un enseignement. Ceci respecte le principe de réduction du nombre d'animaux, base de la validation éthique de ces protocoles de recherche. Dans certains cas de figure, cette procédure de réutilisation n'est pas envisageable compte tenu des paramètres à évaluer et / ou de la nécessité d'effectuer le geste chez un animal sans procédures préalables. Le présent projet a pour objectif de répondre à cette demande en établissant un protocole

de recherche standardisé destiné spécifiquement à l'évaluation de nouveaux procédés avant la mise en œuvre de procédures d'évaluations avancées permettant d'obtenir in-fine les autorisations d'évaluations des procédés sur l'homme. Classiquement, un nouveau procédé est évalué sur 12 animaux (éventuellement divisés en 2 groupes de 6), quantité nécessaire et suffisante pour supprimer l'aléa lié au hasard du succès ou de l'échec d'un procédé.

Un nombre maximal de 120 cochons (30 cochons/an) sera utilisé si les conditions définies dans le protocole ETICA sont remplis.

- Enfin, ces essais de procédés peuvent être considérés comme des « phases 1 » et sont effectués uniquement au cours de procédures sans réveil.

De cette façon, les critères d'accès au protocole ETICA suivent un parcours précisément défini. Toute sortie de ce cadre, même nécessaire au développement industriel complémentaire, imposera le dépôt d'un projet complet soumis dans son intégralité au Comité d'Ethique et au Ministère. D'une façon générale, tous les procédés inclus dans le projet ETICA seront soumis à une séance spécifique du Comité d'Ethique. Cette séance est virtuelle et il a été proposé que cette réunion soit prévue de façon systématique chaque premier mercredi du mois, tout au long de l'année de façon à permettre un suivi simplifié de ces procédures.

Ce protocole de recherche est répétitif.

1768- L'objectif de l'étude est de tester la pertinence d'une stratégie thérapeutique reposant sur les propriétés neuro-protectrices d'une molécule dans le traitement de la maladie de Parkinson.

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative chronique caractérisée principalement par l'apparition progressive de troubles moteurs suivie de troubles cognitifs. Il s'agit de la deuxième maladie neurodégénérative, après la maladie d'Alzheimer, et de la deuxième cause de handicap chez les personnes âgées. Compte tenu du vieillissement général de la population, le traitement de la maladie de Parkinson constitue un enjeu socio-économique et de santé publique majeure. Le projet a pour but d'aboutir à un outil thérapeutique pour le traitement de la maladie.

Pour cela, nous travaillons sur une molécule dont le rôle « pro-survie » a été montré dans plusieurs types de cancer, par notre équipe, et qui est également impliquée dans le développement du cerveau. Les données de la littérature scientifique, suggèrent que cette molécule pourrait jouer un rôle dans la fonction et la survie des neurones principalement affectés dans la maladie de Parkinson. Nous souhaitons donc savoir si l'injection de cette molécule (ou d'un mimétique de celle-ci) dans le cerveau permettrait de ralentir, arrêter voire inverser la dégénérescence de ces neurones. Cette étude permettrait non seulement d'aboutir à un outil thérapeutique pour le traitement de la maladie, mais aussi, d'apporter des connaissances nouvelles sur la fonction biologique de cette molécule dans le cerveau adulte, en particulier dans le maintien, la fonction ou la survie de certains neurones.

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

Remplacement : Ce projet fait suite à des études préalablement menées in vitro, sur des cellules en culture, et in vivo, sur un modèle de rat très utilisé pour l'étude de la maladie de Parkinson (étude pilote menée par des collaborateurs), qui ont fournies des résultats très encourageants. Le modèle rongeur que l'on souhaite utiliser pour l'étude est extrêmement référencé dans la littérature scientifique.

Réduction : Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, nous avons établi un nombre minimum d'animaux par groupe de traitement en nous appuyant sur la littérature scientifique et sur un test de puissance statistique.

Raffinement : Tout acte qui sera effectué sur l'animal aura été pensé dans le souci du respect du bien-être de l'animal et de la gestion de la douleur. Un plan de surveillance adapté sera mis en place à l'aide d'une grille d'évaluation permettant de « scorer » l'état général de l'animal en définissant un point limite, de manière à éviter toute douleur, souffrance, angoisse qui ne sauraient être prises en charge et arrêtées. Le projet bénéficie du fait que le modèle animal et le protocole expérimental choisis pour l'étude sont bien décrits dans la littérature scientifique.

Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Au total, ce projet nécessitera l'utilisation au maximum de (675 animaux : 360 rats et 315 souris).

1769- Les maladies rares (MR) affectent 3 millions de français avec une expression hétérogène, en raison des 9.000 pathologies impliquées dont 80% sont d'origine génétique. Les MR sont le plus souvent des maladies graves, chroniques et invalidantes, générant des handicaps parfois très sévères et un impact familial et sociétal majeur. En raison de ces enjeux, les MR furent retenues comme une des cinq grandes priorités de la loi relative à la politique de santé publique du 9 août 2004. La recherche permet, par une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les MR, d'espérer une amélioration de la prise en charge des malades. Le caractère prioritaire de cette recherche a été redéfini dans le Plan National MR2 (2011-2014) qui a pour objectif de promouvoir la recherche sur les MR, notamment dans le cadre des Centres de Référence labellisés. Très récemment, le plan national d'enseignement et de recherche (article 11) a défini les thèmes prioritaires de recherche en s'appuyant sur le plan européen "Horizon 2020" qui consacre l'article PHC-14 à la thérapie des maladies rares comme une priorité. En accord avec ce plan de santé cohérent au niveau régional, national et européen, le présent projet s'intéresse à une maladie rare, le Syndrome de Costello, dont les mécanismes demeurent incompris et pour lequel aucune option thérapeutique n'est disponible. Décrit pour la première fois en 1971, le syndrome de Costello, ou syndrome facio-cutané-squelettique (CFC), est une maladie rare qui se révèle dans les premiers mois de la vie et se caractérise par un retard de croissance postnatal, des traits épais, un déficit intellectuel et des anomalies cutanées, musculaires et cardiaques. Notre projet vise à élucider les mécanismes biologiques responsables de ce syndrome causé par une mutation (G12S) dans le gène HRAS. D'autres mutations dans ce gène sont la cause de maladies rares (« rasopathies »

incluant le syndrome Leopard, Noonan et CFC) ainsi que de nombreux cancer (HRASV12), si bien que l'étude du syndrome de Costello proposée ici dans le cadre des maladies rares pourrait aussi permettre de mieux comprendre certains aspects liés à l'oncogenèse. Notre institut a réalisé la création d'un modèle murin de cette maladie, que nous proposons d'explorer sur le plan des mécanismes moléculaires, bioénergétiques et physiologiques. Vue l'aspect multi-organique de ce syndrome, l'étude doit se réaliser chez un modèle animal, aucune méthode in vitro n'étant à l'heure actuelle accessible.

Une première étude phénotypique a déjà été réalisée sur le modèle murin HRAS-G12S, en évaluant notamment les fonctions du système nerveux central, cardiaques et métaboliques. Cette étude avait montré que ces souris présentaient une activité locomotrice réduite, une diminution de la force musculaire et une coordination motrice altérée, une tendance à une amélioration de la mémoire de travail et une hypertension artérielle associée à une tachycardie

Ce syndrome polysyndromique, recouvrant un certain nombre des symptômes décrits dans la clinique humaine, mérite ainsi d'être approfondi par l'utilisation de tests de phénotypage complémentaires afin de mieux cerner les mécanismes physiopathologiques du syndrome de Costello dans le modèle murin HRAS-G12S, et plus particulièrement sur le plan de la fonction cardiaque, notamment par la mesure de la pression artérielle non-invasive et par télémétrie, un électrocardiogramme et une échocardiographie. Cette étude sera réalisée sur 8 souris par sexe et par genotype (soit un total de 48 animaux), effectif réduit et optimisé pour obtenir des résultats statistiquement représentatifs. A ces 48 souris s'ajoutent les 190 animaux par an nécessaires au maintien de cette lignée. Le projet dans sa totalité nécessitera donc un maximum de 618 animaux.

Enfin, afin de respecter au mieux le bien-être de ces animaux, toute procédure stressante ou invasive sera réalisée sous anesthésie. De plus, les animaux seront suivis de près et des points limites seront mis en place afin de réduire au minimum toute souffrance, répondant ainsi à la règle du raffinement.

1770- Les objectifs de la vaccination sont de protéger un individu contre le développement d'une maladie et de ses symptômes, mais aussi de protéger les groupes de population en évitant la propagation de l'infection. Cependant, les maladies infectieuses restent responsables d'un décès sur quatre dans le monde expliquant l'importance de poursuivre l'éducation des populations et la découverte de nouveaux vaccins.

Le but de ce projet est de valoriser l'utilisation de petites particules présentant des protéines de surface d'agents pathogènes ou l'ADN codant ces protéines comme antigène. Cette étude permettra de contribuer au développement de traitements innovants.

A l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode alternative pour permettre de montrer leur efficacité antigénique, l'utilisation d'animaux est donc indispensable. Une surveillance régulière des animaux sera effectuée au cours de ce protocole. Afin de limiter le nombre d'animaux, un premier screening des nanovecteurs et la caractérisation des VLPs sera réalisé in vitro.

Pour cette étude, nous envisageons d'utiliser 108 souris sur 5 ans, à raison de 40 souris par cohorte (4 groupes de protéines d'intérêts).

1771- Les cellules Natural Killer (NK) sont des cellules sanguines du système immunitaire qui exercent une activité anti-tumorale et anti-virale. Elles peuvent aussi être associées à des réponses délétères comme des allergies ou des maladies autoimmunes telles que la maladie de Crohn, la Sclérose en plaques ou encore divers formes sévères de dermatites. Dans ce cas, des composés empêchant ces cellules NK de circuler pourraient être bénéfiques dans ce genre de maladie, en les empêchant d'accomplir leurs actions pathologiques.

Récemment, une société américaine en étroite collaboration avec notre équipe a produit de nouveaux composés ciblant un récepteur sur les cellules NK qui permettraient d'empêcher la circulation de celles-ci.

La réglementation ne permet pas de tester directement une molécule chez l'Homme sans avoir recours au préalable à l'animal. C'est pourquoi, nous avons besoin de tester l'efficacité de ces nouveaux composés chez la souris.

Nous avons précédemment montré l'efficacité de ces molécules dans des modèles in vitro. Cependant, il reste à confirmer ces résultats in vivo car les modèles de migration cellulaire que nous utilisons in vitro ne reproduisent que très imparfaitement la situation in vivo. La preuve de l'efficacité de ces composés permettrait ensuite de les utiliser dans des modèles d'allergie ou d'autoimmunité, ce qui ouvrirait potentiellement la porte à de nouveaux traitements pour ces maladies.

Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, raffiner et Remplacer). Le nombre de souris a été calculé afin que les résultats aient une valeur statistique malgré les variations entre les animaux. Le nombre d'animaux est donc estimé à environ 324 souris sur 2 ans. Tout au long du projet, nous veillerons à ce que les conditions d'élevage, d'hébergement et de soins soient les plus adaptées et à diminuer au maximum la souffrance et l'anxiété de l'animal. Des analyses in vitro seront réalisées en parallèle afin de compléter les résultats obtenus.

1772- L'endocardite infectieuse (EI) est une complication gravissime retrouvée dans 10% des cas de bactériémie à *Staphylococcus aureus*. L'implication de facteurs bactériens dans la survenue de l'EI est encore inconnue. Connaître les facteurs bactériens responsables de la localisation au cœur de l'infection à *S. aureus* au cours d'une bactériémie est un enjeu majeur pour la prédiction de l'endocardite et la prise en charge des patients.

Notre équipe de recherche est donc impliquée dans un programme visant à déterminer les facteurs bactériens de *S. aureus* responsables de l'endocardite. Pour cela nous disposons d'une collection de souches issues de patients présentant soit une bactériémie non compliquée, soit une endocardite. Nous avons montré que les souches d'endocardite et les souches de bactériémies étaient génétiquement différentes et qu'il était possible d'utiliser des marqueurs génétiques pour discriminer les souches responsables d'endocardite.

Le but de ce protocole expérimental est de prouver que l'étude des facteurs génétiques permettant de discriminer les souches responsables d'EI des souches responsables de bactériémies simples a bien une réalité in vivo. Ainsi nous cherchons à démontrer que les souches que nous avons identifiées sur la bases de leurs marqueurs génétiques comme responsables d'endocardite, ont une tendance plus importante à se localiser et se fixer au coeur que les souches responsables de bactériémies. Par ailleurs, nous cherchons à étudier l'expression des gènes bactériens soit à partir de prélèvement sanguin, soit à partir de tissu cardiaque afin d'identifier les facteurs bactériens importants impliqués dans la colonisation du tissu cardiaque.

Pour chaque expérience, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en ayant le maximum de chance d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. L'utilisation d'animaux est essentielle pour la réalisation du présent projet et la souris reste un modèle adapté aux types de recherche envisagées. 148 souris seront utilisés pour ce projet. Lors des procédures expérimentales, des points limites adaptés sont définis.

1773- Les plaquettes sanguines jouent un rôle essentiel pour arrêter les hémorragies. La transfusion de concentrés plaquettaires est le seul traitement actuellement disponible dans certains cas de déficiences plaquettaires aigües ou chroniques, en particulier lors des chimiothérapies anticancéreuses. Comprendre comment les plaquettes sont détruites puis reformées suite à une chimiothérapie est clé pour le suivi des patients sous traitement anti-cancéreux afin d'éviter les risques hémorragiques qui entraînent de graves complications.

Dans ce projet, nous nous intéressons au rôle de certains récepteurs des plaquettes dans la récupération sanguine après traitement chimiothérapeutique. Ce projet fait appel à l'utilisation de souris qui seront étudiées à l'état de base et après traitement au 5-fluorouracile, utilisé chez l'homme dans les cancers, notamment les cancers colorectaux.

Respect de la règle des 3R: pour le projet scientifique global, certaines expériences utilisant la souris ne peuvent être remplacées par des études in vitro, d'une part car ces essais doivent être menés dans un organisme entier afin d'accéder à la complexité des mécanismes, et d'autre part car la souris est la seule espèce pour laquelle on dispose de modèles dépourvus de ces récepteurs.

Nos souris d'intérêt se développent et survivent normalement, et n'ont aucun phénotype dommageable. Le traitement 5-FU entraîne une diminution transitoire des cellules sanguines et notamment une anémie transitoire. De ce fait, on ajoute du coton cardé dans la cage des souris traitées pour favoriser le maintien de leur température. Dans tous les cas, les cages sont enrichies en jouets et coton à déchiqueter pour qu'elles y fassent leur nid, et lorsqu'il y a redistribution des animaux dans d'autres cages cela est fait quelques jours avant le traitement pour minimiser le stress. Le nombre d'animaux utilisé est réduit par la mesure de plusieurs paramètres chez une même souris. Le projet fait appel à 160 souris par lignée (80 souris modifiées génétiquement et 80 souris contrôles). Nous étudions 5 lignées différentes dans ce projet, soit 800 souris au total.

1774- Dans le cadre d'une collaboration avec un partenaire académique, nous projetons d'étudier la fonction d'un récepteur dans le comportement de souris par deux approches.

Une première approche étudiera l'effet de la délétion de ce récepteur, tandis que la seconde approche visera à déterminer l'impact d'une exposition à un polluant atmosphérique durant la gestation sur le comportement des animaux.

Le récepteur d'intérêt de cette étude est en effet connu pour son action dans la détection des polluants extérieurs. Néanmoins, il s'est avéré que sa délétion au sein d'invertébrés entraîne des modifications comportementales variées (locomotion, appétit...). De plus, ce récepteur a été récemment retrouvé dans le système nerveux central et s'avère impliqué dans le contrôle moteur de l'œil.

Cette étude vise donc à mettre en évidence l'implication de ce récepteur dans la réponse comportementale (phase 1), ainsi que l'effet de sa stimulation par des polluants sur la réponse comportementale (phase 2).

Dans la phase 1, nous utiliserons deux cohortes composées de 24 animaux chacune, 12 animaux contrôles et 12 animaux n'exprimant plus le récepteur. Ces deux cohortes seront utilisées afin d'étudier de multiples comportements, notamment exploratoire, anxieux, cognitif. Ces études fourniront un ensemble de données sur l'impact de la délétion du récepteur d'intérêt.

Dans la seconde phase, des souris exposées durant leur gestation et leur lactation à un polluant atmosphérique seront utilisées dans les mêmes tests comportementaux afin de mettre en évidence une éventuelle modification du comportement liée à l'activation de ce récepteur. Deux cohortes de 24 souris seront utilisées, comportant chacune 12 animaux contrôles et 12 animaux exposés durant leur développement au polluant. Ce projet utilisera donc 96 animaux pour la partie expérimentale. Par ailleurs, six souris seront nécessaires pour l'analyse sanitaire de chacune des cohortes, portant le total de souris nécessaires pour ce projet à 120 souris.

Les 12 animaux par groupe seront utilisés afin d'obtenir une puissance statistique suffisante à l'étude tout en satisfaisant aux exigences de réduction et de raffinement liés aux principes éthiques.

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

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

1775- Le cancer du sein est un enjeu majeur de santé publique, puisqu'il représente le cancer le plus fréquent chez la femme dans les pays occidentaux. Malgré l'augmentation du taux de survie due à l'amélioration de la prévention et des traitements, la

formation de métastases au cours de cette pathologie reste particulièrement problématique car elle représente la cause principale de mortalité chez les patientes.

Lors du cancer, les cellules tumorales vont se détacher de la tumeur primaire afin d'envahir les autres organes et d'être à l'origine des tumeurs secondaires, appelées les métastases. La formation des métastases est un processus en multi étapes : elle fait intervenir l'invasion des cellules tumorales, la dissémination dans la circulation sanguine ou lymphatique, l'adhésion à la paroi des vaisseaux sanguins, l'extravasation et la formation de nodules métastatiques et finalement la croissance des tumeurs secondaires. Le poumon (avec les os, le foie et le cerveau) est le site le plus courant de colonisation par les cellules tumorales mammaires pour la formation de métastases. L'interaction des cellules tumorales avec les plaquettes sanguines est décrite comme une étape cruciale dans la formation des micro-embolus permettant l'arrêt de ces cellules dans la circulation sanguine et leur adhésion à la paroi vasculaire, leur extravasation favorisant les métastases.

L'objectif de ce projet est d'évaluer le rôle de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ plaquettaire sur l'incidence et les mécanismes moléculaires des métastases pulmonaires chez l'animal (souris, *Mus musculus*) afin de les comprendre chez l'homme.

Remplacer

Il est impossible de remplacer les animaux par d'autres moyens dans l'étude de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ plaquettaire sur les métastases. Cette étude nécessite la conduite des travaux de recherche dans des conditions *in vivo*.

Réduire

Le nombre d'animaux utilisés pour chaque condition est fixé à 8, un nombre suffisant pour appliquer à l'étude un test d'analyse de variance ANOVA. Les résultats obtenus de l'analyse par ce test statistique permettront de ne pas répéter l'expérimentation, par conséquent réduire le nombre d'animaux utilisés et aussi les différents facteurs (douleur, souffrance ...) auxquels pourront être soumis les animaux (les souris).

Raffiner

Le modèle animal est choisi dans le but de reproduire, le plus fidèlement possible, la pathologie étudiée et d'en tirer le maximum d'informations. Les conditions du travail seront raffinées afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés aux procédures expérimentales. Ce projet va permettre de déterminer les mécanismes moléculaires de la formation des métastases et de proposer les cibles thérapeutiques chez les patientes atteintes d'un cancer du sein.

La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation de 96 souris.

1776- La formation de métastases cérébrales affecte 10 à 15% des patientes atteintes de cancer du sein métastatique. La progression tumorale peut s'étendre sur plusieurs années, l'apparition de métastases pouvant survenir de nombreuses années après ablation chirurgicale de la tumeur primaire. Durant cette période, les cellules cancéreuses vont acquérir des propriétés spécifiques leur permettant d'envahir différents organes. Cette capacité correspond à un tropisme métastatique organe spécifique. Dans le cas des métastases cérébrales, les cellules cancéreuses doivent acquérir des propriétés les rendant capables de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) localisée au niveau des cellules endothéliales qui forment les capillaires cérébraux. En effet au niveau cérébral, les cellules endothéliales présentent des caractéristiques structurales et métaboliques particulières (présence de jonctions serrées, expression de pompes d'efflux...) leur conférant une perméabilité restrictive nécessaire au maintien de l'homéostasie cérébrale. Malgré la perméabilité restrictive de l'endothélium cérébral, certaines cellules cancéreuses franchissent la BHE. La première étape de transmigration des cellules cancéreuses vers le parenchyme cérébral est l'adhésion de ces cellules à l'endothélium de la BHE. L'objectif de ce projet est donc de comprendre les interactions entre les cellules tumorales de cancer du sein et l'endothélium de la BHE à l'origine de la formation des métastases cérébrales. Cette étude sera réalisée à l'aide d'un modèle de BHE *in vitro* mis au point au laboratoire ; La modélisation de la BHE permettant de nous affranchir de la complexité tissulaire à ce niveau. Le modèle cellulaire repose sur la coculture de cellules endothéliales cérébrales (siège de la de la BHE) de souris femelles adultes (âgées de 4 semaines) ensemencées sur filtres et de cellules gliales de souriceaux (permettant la différenciation de la BHE) ensemencées sur fond de boîte.

Dans nos études nous ne pouvons pas utiliser les lignées de cellules endothéliales transformées car celles-ci ne présentent pas toutes les caractéristiques de la barrière hémato-encéphalique *in vivo*. En particulier, les cellules issues de lignées transformées ne présentent pas d'inhibition de contact et donc pas de perméabilité restrictive, principale propriété de la barrière hémato-encéphalique. De même, ainsi que nous l'avons démontré précédemment, l'utilisation de lignées cellulaires de cellules gliales ne permet pas d'obtenir une bonne différenciation des cellules endothéliales. Cependant la modélisation permet de diminuer le nombre d'animaux utilisés pour une expérience. L'ensemble de ces expériences nécessitera 193 souris âgées de 4 semaines et 5 portées de 5 souriceaux, soit 5 femelles gestantes; finalement 223 souris C57 BL/6 en tout. De façon à réduire l'angoisse, les souriceaux soustraits à leur mère tous au même moment sont maintenus ensemble à la chaleur le plus longtemps possible. Les animaux sont euthanasiés dans des locaux différents des locaux d'hébergement.

1777- Chez les mammifères, la vitamine B12 permet la transformation de l'homocystéine en méthionine. Pour permettre cette réaction, la vitamine B12 alimentaire est transportée jusqu'aux cellules grâce à la protéine CD320. Un défaut d'apport en vitamine B12 peut avoir deux conséquences directes : 1- Une augmentation de l'homocystéine (un facteur de risque associé à des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives) 2- Une diminution de la méthionine, indispensable aux processus de régulation de l'expression des gènes. Nous souhaitons utiliser un modèle de souris transgénique déficiente pour le gène CD320 dans le but d'étudier les mécanismes physiopathologiques en lien avec une déficience en vitamine B12 (maladies génétiques, déséquilibres nutritionnels). Les animaux seront étudiés à quatre stades de la maturation cérébrale, à savoir 6, 12, 18 et 24 mois. En particulier, l'étude portera sur l'évolution du degré de myélinisation de cellules nerveuses issues

d'échantillons de différentes composantes du système nerveux central. Une étude comportementale sera menée dans les différents groupes d'animaux à l'aide de tests spécifiques : -Mesure de la coordination locomotrice grâce au test de « déplacement sur échelle horizontale » -Evaluation de la performance d'apprentissage grâce au test « labyrinthe aquatique multi-T » A chaque fin de session des tests comportementaux (4 sessions), les animaux seront euthanasiés et des prélèvements seront effectués (cerveau, moelle épinière, nerfs sciatique, sang). Ces tests permettront de corréliser les données biochimiques aux troubles neurologiques qui pourraient découler de cette déficience. La production des souris mutantes CD320 dans un laboratoire partenaire aux USA a été approuvée par le AALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) et leur élevage sera assuré selon les recommandations en vigueur. Aucun de nos tests n'est censé générer de douleur, néanmoins, il arrive que certains animaux soient plus agressifs que d'autres. Ces animaux sont isolés de leurs congénères et si des blessures apparaissent les plaies sont désinfectées à l'aide de chlorhexidine et les animaux sont traités avec des analgésiques (paracétamol mélangé à du lait concentré). Etant donné qu'il n'existe aucune alternative d'approche in vitro (remplacement), notre étude portera sur 144 souris : 18 par génotype (« sauvage » et « mutant ») et par tranche d'âge (x4). Ainsi, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum (réduction) permettant l'interprétation scientifique des résultats par des tests statistiques appropriés (raffinement). En effet, la variabilité inter-individus lors des tests comportementaux nous impose d'augmenter l'effectif jusqu'au minimum 10 animaux par groupe. Les animaux seront élevés dans une animalerie agréée et dans les conditions de stabulation respectant la réglementation en vigueur.

1778- La maîtrise des fonctions de reproduction et les biotechnologies associées sont une composante essentielle des filières d'élevage en termes de productivité, de rentabilité et d'amélioration de la gestion des systèmes de production et de la durabilité de l'espace rural. Elles sont aussi des opportunités d'approcher et d'améliorer la compréhension de certains mécanismes physiologiques fondamentaux à la base de la reproduction sexuée et les pathologies associées chez les mammifères.

En élevage porcin, près d'un demi-siècle d'efforts en recherche a été entrepris pour synchroniser l'œstrus et l'ovulation chez les truies dans le but ultime de pouvoir procéder à des inséminations animales (IA) à un temps fixe. Cet objectif repose sur la base de 1) la réduction de la charge de travail, qui passe notamment par l'observation et la détection des chaleurs, 2) l'amélioration de l'organisation et la réduction du nombre d'IA, à l'origine d'une diminution du nombre d'interventions sur les animaux, mais également une amélioration de la fertilité, 3) la réduction des quantités de semence et de leur coût, favorisant ainsi une plus large diffusion des reproducteurs et, 4) une amélioration de la gestion du système d'élevage qui concerne tous les élevages porcins. A ce jour et malgré l'évolution des techniques, il n'est toujours pas possible de programmer l'insémination des truies à un temps fixe compte tenu des variabilités du moment de retour en chaleur après la mise-bas et de la durée des chaleurs observées entre animaux (dépendants de la parité, du poids, de la race, ...). La présente demande d'autorisation de projet expérimental concerne l'étude et la maîtrise de ce moment de l'ovulation chez la truie après mise bas et les conséquences de cette synchronisation sur le moment de l'insémination artificielle en élevage. Une attention toute particulière a été apportée au respect du principe des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner) tout au long de la conception de l'étude. Ainsi, ce projet concerne 21 cochettes de race Meishan. Le modèle animal ne peut pas être évité puisqu'il n'existe pas de méthode alternative pouvant mimer la physiologie complexe retrouvée dans l'espèce cible. L'effectif d'animaux nécessaire (3 lots de 7 cochettes) a été adapté à la nature et l'objectif de la procédure expérimentale et du nombre minimum nécessaire pour mettre en évidence les différences attendues de façon significatives. Ces animaux feront l'objet d'une ovariectomie afin de cibler l'effet de la synchronisation sur la sécrétion d'hormone hypophysaire. A la suite d'une injection intra-musculaire de molécules synchronisantes, une procédure de prises de sang sériées après la pose de cathéters sera réalisée en vue de cette analyse hormonale. Le nombre de prélèvements est établi de sorte à optimiser et maximiser les informations obtenues par animal testé. Ainsi, en plus de l'analyse relative à l'hormone hypophysaire, il sera possible d'accéder à la biodisponibilité et à la pharmacocinétique des molécules administrées. Les animaux seront euthanasiés en fin de projet. La notion de raffinement, de point limite et de prise en charge de la douleur a fait l'objet d'une concertation appropriée pour chaque procédure.

1779- Les maladies du système nerveux (Parkinson, Alzheimer, Huntington...) sont une préoccupation croissante en santé publique. De nouveaux outils diagnostiques associés à de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires pour améliorer la prise en charge des patients. Les modèles animaux sont des outils précieux et pertinents dans le développement de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques. La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative héréditaire caractérisée par des troubles projet a pour objectif de réaliser un essai préclinique chez le rongeur et le primate non-humain afin de mettre en place un essai clinique de thérapie génique de phase I à l'hôpital Henri Mondor. Il s'inscrit dans une démarche translationnelle. Il aura pour but d'évaluer la sécurité et l'efficacité d'un lot de vecteur viral 'médicament' produit par le Généthon et il inclura une recherche de dose chez le rongeur puis chez le primate non-humain et finalement une mesure d'efficacité dans un modèle primate de la MH. Ces études précliniques sont requises pour élaborer un dossier réglementaire à fournir aux autorités compétentes avant le démarrage de l'essai clinique (chez l'Homme). Les études chez le rongeur permettent de déterminer l'efficacité biologique du vecteur viral et son éventuelle toxicité. L'administration du vecteur se faisant par voie intracérébrale, les études chez le primate sont requises afin de déterminer le protocole neurochirurgical le plus pertinent chez le patient. De plus, le modèle primate se justifie par la possibilité d'évaluer les fonctions motrices dans une espèce proche de l'homme. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages reconnus et sont nés et élevés en captivité. Leur nombre a été réduit au maximum (136 rongeurs et 13 primates non-humain) afin d'obtenir des données suffisantes pour évaluer l'effet du traitement à des doses différentes. L'évaluation fonctionnelle

sera menée en utilisant des techniques indolores et non-invasives telles que l'imagerie IRM ainsi que l'étude du comportement moteur. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures moteurs, psychiatriques et des déficits cognitifs. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement efficace permettant de ralentir la maladie. La maladie touche environ 1 personne sur 10000 en France ce qui représente environ 6000 malades. Ces chirurgicales ont été définies et validés par une équipe vétérinaire. Des échelles cliniques journalières et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des animaux.

1780- Ce projet a pour objectif l'évaluation de la toxicité spécifique des vaccins, des immunosuppresseurs et de leurs composants destinés à l'Homme, selon les normes d'innocuité et de sécurité réglementaires. Ces tests incluent les évaluations de stabilité des vaccins requises par la réglementation ainsi que la formation / qualification du personnel à ces tests requise par les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). Les tests de toxicité spécifiques consistent à administrer plusieurs produits à des animaux, les héberger pendant la période nécessaire à la vérification de l'absence d'effet indésirable, par exemple lié à une toxine mal inactivée ou à une réversion de l'anatoxine en toxine. Ceci permet le contrôle de la détoxification suffisante du produit testé. Ce projet représente l'ensemble des essais menés systématiquement sur chaque lot de produits fabriqués. Les espèces employées sont la souris, le cobaye et le rat. Dans le cas où les animaux présenteraient une dégradation de l'état général, des lésions ou des symptômes nécessitant l'euthanasie, celle-ci sera effectuée selon la méthode réglementaire recommandée. La prise en charge d'un animal ayant des signes cliniques de maladie est réalisée sous la responsabilité d'un vétérinaire. Le degré de sévérité est considéré comme modéré, pouvant aller jusqu'à sévère pour une faible proportion de rats. Il est considéré comme léger pour les cobayes et de léger à sévère pour les souris. L'ensemble des 10 procédures de ce projet peut nécessiter l'utilisation de 32 500 souris, 5 800 cobayes et 1 064 rats au maximum sur une période de 5 ans (estimation basée sur le niveau actuel de contrôle de vaccin). Les bénéfices attendus sont d'une part de contribuer à la libération des lots de produits fiables et conformes aux spécifications et aux textes de référence en vigueur pour chaque procédure et d'autre part, d'assurer le niveau de formation / qualification du personnel conformément aux BPF. En fin de test, l'ensemble des animaux utilisés est euthanasié selon les méthodes recommandées par la réglementation, par la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux et approuvées par le Comité d'Ethique. Mise en œuvre des 3R : Remplacement : Aucune méthode évitant totalement le recours à l'animal selon les exigences réglementaires de tous les pays de destination des produits n'est développée à ce jour pour les procédures expérimentales décrites. Réduction : Le nombre d'animaux utilisés au total est calculé au plus juste de façon à répondre aux exigences réglementaires et aux besoins des procédures expérimentales sur une période de 5 ans. Le nombre d'animaux par groupe est défini par la réglementation. Réduire le nombre d'animaux recevant le produit est impossible. En revanche, une optimisation visant à réduire le nombre de groupes témoins est pratiquée aussi souvent que possible. Raffinement : Les animaux sont hébergés en groupe dans des locaux appropriés et dans des cages contenant des enrichissements conformément aux standards réglementaires (ETS 123). Ces animaux sont suivis par un personnel spécifiquement formé. En cas de signes cliniques, dans les meilleurs délais, les animaux bénéficient des soins vétérinaires ou sont euthanasiés selon les méthodes recommandées.

1781- Dans le cadre de travaux de recherche visant à mettre au point des solutions thérapeutiques permettant de lutter contre les infections ostéo-articulaires, le laboratoire doit disposer de liquide synovial qui se trouve dans les articulations. Le but des études qui seront menées in vitro grâce au liquide synovial est de comprendre les mécanismes entraînant l'inefficacité des traitements antibiotiques suite à la formation de biofilms dans le liquide synovial. Des molécules expérimentales seront également testées et leur efficacité évaluée. Le bénéfice attendu de ces travaux de recherche est de mettre au point des traitements efficaces qui à ce jour n'existent pas. Le liquide synovial sera prélevé chez des chevaux au niveau des articulations des membres. 10 chevaux seront prélevés sur la durée du projet. La classe de sévérité est légère, on ne s'attend à aucun signe clinique suite au prélèvement. A l'issue de l'expérimentation, les chevaux seront alors réformés et replacés dans le respect des conditions définies par la Directive Européenne 2010/63 (article n°19). Mise en œuvre des 3R : Remplacement : L'obtention de liquide articulaire nécessite le recours à l'animal. Ce liquide biologique a des propriétés très particulières qu'il est difficile de mimer par des produits de synthèse. Le laboratoire évaluera tout de même la possibilité de réaliser ses essais avec des produits de substitution, en les comparant avec le liquide synovial obtenu. Si les produits s'avèrent comparables, le laboratoire pourra se passer du liquide prélevé sur animaux. Réduction : Le nombre d'animaux utilisé est limité au mieux. Les prélèvements seront réalisés en fonction des besoins du laboratoire. Raffinement : Les chevaux sont hébergés en groupe et observés quotidiennement. Les prélèvements sont réalisés sur des animaux en parfaite santé. En cas de problème de santé, un vétérinaire effectue le suivi clinique et prescrit un traitement. Il peut décider de la réforme d'un cheval s'il le juge nécessaire. Dans ce cas, le cheval reçoit les soins prescrits, avant d'intégrer le circuit d'adoption mis en place par la société.

1782- L'allergie alimentaire constitue un problème majeur de santé publique du fait de sa prévalence et de la gravité des symptômes qu'elle engendre. L'allergie à l'arachide est particulièrement importante puisqu'elle est responsable de la plus grande partie des hospitalisations pour cause de choc anaphylactique. L'allergie alimentaire se déroule en deux phases successives : la sensibilisation qui est muette cliniquement suivie de la réaction allergique durant laquelle apparaissent les symptômes cliniques, notamment le choc anaphylactique qui peut s'avérer mortel. Le diagnostic avéré d'allergie alimentaire repose sur un test de provocation par voie orale qui permet de mimer les symptômes cliniques retrouvés lors d'une réaction allergique.

L'efficacité des traitements de désensibilisation a été évaluée sur des modèles murins de sensibilisation uniquement. Ces traitements s'avèrent efficaces cependant, nous ignorons si ces traitements permettent également de stopper la réaction

allergique proprement dite. Dans ce cadre, nous souhaitons donc développer un modèle murin d'anaphylaxie innovant. Nous allons évaluer différentes souches de souris (BALB/c, C3H/HeJ et C57BL/6c), ainsi que trois voies de sensibilisation (cutanée, orale et intranasale). Le modèle permettant d'obtenir des réactions anaphylactiques sera retenu pour évaluer l'efficacité du traitement de désensibilisation par voie épicutanée (Viaskin® peanut) face au développement ultérieur de la réaction allergique et plus particulièrement du choc anaphylactique. Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). En effet, nous projetons de réduire le nombre de souris utilisé tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, nous envisageons donc d'utiliser 312 souris femelles, âgées de 5 semaines. Le protocole est planifié de telle sorte que toutes les analyses sont réalisées sur le même animal (i.e. analyses de la réponse immunitaire et de l'anaphylaxie). Le bien-être des animaux (raffinement) est également planifié, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées permettant ainsi l'absence de signes de stress. De plus, une gestion précise de l'anesthésie/analgésie est étudiée pour chaque procédure expérimentale en vue de minimiser la douleur et la détresse. Des points limites quantitatifs, spécifiques aux protocoles, ont également été établis pour l'ensemble des procédures expérimentales.

1783- Dans le cadre de la commercialisation de vaccins destinés aux chevaux, un contrôle d'innocuité est imposé par la réglementation.

Les tests sont réalisés sur les chevaux. Pour chaque lot de vaccin, 2 chevaux reçoivent chacun une double ou une triple dose vaccinale. Ils sont observés quotidiennement durant 14 ou 28 jours suivant cette vaccination. Une grille de notation des effets indésirables (état général, fièvre et inflammation au point d'injection) est renseignée. Ce test est déterminant pour la commercialisation du lot. Les résultats attendus de ce projet sont de contribuer au contrôle de lots de produits afin de s'assurer leur fiabilité et de leur conformité par rapport aux spécifications et aux textes de référence en vigueur avant leur mise à disposition pour répondre au besoin du marché. Le degré de sévérité des protocoles de ce projet est léger pour l'ensemble des animaux. Animaux concernés : 14 chevaux pour la durée du projet (5 ans). A la fin du projet l'ensemble des chevaux sont réutilisés ou replacés en tant que chevaux de loisir. Mise en œuvre des 3R : Remplacement : Le contrôle des lots en vue de leur commercialisation fait appel à des techniques *in vitro* complétées par ce test d'innocuité. La suppression du test d'innocuité est acceptée par la Pharmacopée européenne : le test est retiré pour les destinations européennes. La démarche de demande de suppression du test est en cours pour tous les autres pays où les vaccins sont exportés. Cependant certaines réglementations locales imposent encore la réalisation de ces tests. Réduction : Le nombre d'animaux utilisé est décrit dans les textes réglementaires. Seuls 2 chevaux sont nécessaires à chaque test. D'autre part, compte tenu du très faible impact de chaque test, les animaux peuvent être réutilisés jusqu'à l'âge de 10 ans. Raffinement : Les chevaux sont hébergés en groupe et observés quotidiennement. En cas de problème de santé, un vétérinaire effectue le suivi clinique et prescrit un traitement. Les tests sont réalisés sur animaux en parfaite santé.

1784- Les tumeurs neuroendocrines dites "carcinoïdes" sont des tumeurs habituellement localisées dans le tractus digestif. Elles ont pour caractéristique de sécréter des quantités importantes de sérotonine, un neuromédiateur possédant de nombreux effets en dehors du système nerveux central. Cette sécrétion tumorale est responsable de symptômes aigus entrant dans le cadre du "syndrome carcinoïde", à type de diarrhées, de bouffées vasomotrices du visage et de complications chroniques qui altèrent fortement le pronostic de la maladie, au rang desquelles la cardiopathie carcinoïde est la plus importante.

Cette atteinte cardiaque, présente chez 2/3 à 3/4 des malades, se caractérise par la formation de plaques cellulaires à la surface de l'endocarde incluant les valves. Progressivement, elles deviennent rétractiles et provoquent des fuites et des sténoses classiquement dans les valves du cœur droit. Elle constitue une maladie orpheline car il n'existe actuellement aucun traitement préventif et qu'elle aggrave fortement la mortalité de ces cancers dont la vitesse de croissance est habituellement lente.

Par analogie avec ce qui a été observé dans la valvulopathie due au benfluorex Médiator*, nous pensons que la sérotonine (5-HT) sécrétée par la tumeur agirait en activant ses récepteurs de sous-type 5-HT₂ dans la valve elle-même et dans la moelle osseuse où elle mobiliserait des cellules impliquées dans la cicatrisation des tissus. Le projet actuel vise à évaluer cette hypothèse en développant un modèle murin de dégénérescence valvulaire cardiaque associée aux tumeurs carcinoïdes pour y tester des molécules à même de prévenir et/ou de reverser l'atteinte valvulaire. Il est à noter que ces mêmes produits, pourraient, en même temps, limiter les symptômes aigus. Le modèle expérimental est réalisé *in vivo* car il doit, au plus près, mimer la situation clinique humaine associant une tumeur sécrétante et une espèce particulièrement sensible sur le plan de ses valves cardiaques. Il consiste en une xéno greffe intra splénique d'une lignée tumorale carcinoïde humaine sécrétant de la 5-HT (cellules BON) à des souris immunodéprimées (souris Nude) et à suivre les lésions valvulaires cardiaques au cours du temps en parallèle du suivi du développement tumoral et de la sécrétion de 5-HT. Ce modèle servira ensuite à évaluer les effets de traitements pharmacologiques : antagonistes des récepteurs sérotoninergiques 5-HT₂ et inhibiteurs de la synthèse de la sérotonine (inhibiteurs des Tph1/2). Il sera conduit en parallèle d'approches *ex vivo* où des valves porcines seront mises en présence de cellules BON. Dans l'ensemble de ce projet qui respecte le concept des 3R, nous avons évalué au plus près le nombre d'animaux nécessaire compte tenu des contraintes méthodologiques et statistiques. Des critères limites sont annoncés et seront appliqués pour l'ensemble de nos procédures (utilisation d'analgésiques, surveillance clinique, mise à mort si nécessaire). Finalement, il est inconcevable de réaliser cette approche intégrée nécessitant la présence d'une tumeur, une moelle osseuse active et un cœur fonctionnel sans un modèle animal *in vivo*. De plus, ce travail est une phase préclinique indispensable avant de pouvoir pousser plus en avant des molécules à vocation thérapeutique. Néanmoins, nous avons déjà

mis en route un modèle ex vivo de co-culture de cellules carcinoïdes BON en présence d'une culture organotypique de valves tricuspides porcines qui vise à pouvoir remplacer progressivement le modèle in vivo chez la souris. Nous espérons pouvoir, grâce à ce modèle, aborder une partie simplifiée de la situation qui sera complémentaire de nos études in vivo. Il est cependant peu probable, au vu du mécanisme impliqué, qu'il puisse complètement remplacer le modèle animal intégré. Néanmoins, son accessibilité et ses avantages (taille des tissus, effet direct de la sécrétion tumorale) en feront probablement un modèle de choix permettant de réduire le nombre de souris. Nous projetons aussi de pouvoir faire le même type d'approches sur des cultures organotypiques de valves humaines. Le nombre de souris nécessaire pour ce projet est de 110 souris. A terme, ces travaux ont pour objectif d'initier de nouvelles approches thérapeutiques visant à prévenir ou faire régresser les lésions valvulaires sérotoninergiques à une étape précoce de la maladie. Ils seraient aussi de nature à limiter les symptômes non cardiaques (diarrhées, bouffées vasomotrices). Cette approche est la première ciblant directement la sécrétion hormonale responsable de la symptomatologie et viendra compléter les stratégies actuelles à visée anti-tumorale.

1785- Dans le cadre de la production et de la réalisation de contrôles qualité de ses produits (vaccins et sérums), la société doit disposer de réactifs issus de prélèvements de tissus sur animaux, lorsqu'il n'existe aucune alternative de produits de synthèse.

Les bénéfices attendus de ce projet sont d'une part de contribuer à la libération de lots de produits fiables et conformes aux spécifications et aux textes de référence en vigueur, d'autre part, d'assurer la production de vaccins conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication et enfin, d'obtenir la mise sur le marché de nouveaux vaccins répondants aux enjeux de santé publique.

Les prélèvements réalisés sur les animaux sont des prélèvements de sang. Le sang est ensuite retraité et permet, selon le besoin, d'obtenir du plasma, du sérum, du sang total non coagulé ou des globules rouges. Le sang sert à fabriquer ou à contrôler les vaccins. Les animaux donneurs peuvent être immunisés au préalable afin d'obtenir du sérum hyper immun, nécessaire au contrôle de certains produits. Pour ce faire, avant d'être prélevés, les animaux reçoivent des injections d'antigènes (équivalent à des vaccins) ce qui provoque chez eux une réaction immunitaire et donc la production d'anticorps. Ces anticorps sont ensuite présents dans leur sérum obtenu après un prélèvement de sang. Le nombre d'animaux concernés pour toute la durée du projet (5 ans) est de 76 ovins, 6 caprins, 4 équins, 15 oies, 50 dindes et 1500 poules domestiques. Le choix de l'animal (espèce, âge) est déterminé par l'utilisation du réactif. Il existe toujours une spécification technique entraînant le choix. Les niveaux de souffrance sont légers ou sans réveil pour les animaux non immunisés, et modérés pour les animaux hyperimmunisés. Mise en œuvre des 3R : Remplacement : Lorsque l'état de la science et les autorités de santé le permettent, les tissus d'origine animale sont remplacés. Le remplacement n'est à ce jour pas possible pour les produits concernés par ce projet. Réduction : Le nombre d'animaux utilisés est limité au minimum, de façon à répondre à la demande de façon optimum. Une sensibilisation des utilisateurs finaux est réalisée, afin d'éviter tout gaspillage de réactif. Dans le cas de la production de sérums hyper immuns sur ovins ou caprins un prélèvement terminal est envisagé afin de recueillir une grande quantité de sérum, limitant ainsi le nombre d'animaux nécessaire. Dans ce cas, une anesthésie puis une euthanasie sont réalisées. Raffinement : Les quantités de sang prélevées sont toujours inférieures aux recommandations réglementaires. Les prélèvements sur poules domestiques sont terminaux. Les animaux sont placés sous anesthésie générale profonde et la récolte du sang est maximisée. L'animal est ensuite euthanasié par une injection létale d'un produit homologué. Les animaux sont hébergés en groupe et observés quotidiennement. En cas de problème de santé, un vétérinaire effectue le suivi clinique et prescrit un traitement. Les prélèvements sont réalisés sur animaux en parfaite santé.

1786- La neuromyopathie de réanimation représente la pathologie neuromusculaire acquise la plus fréquente en réanimation. Elle est associée à une augmentation de la morbidité, de la mortalité et de la durée du séjour à l'hôpital, mais également à des séquelles à long terme pouvant altérer la qualité de vie des patients. Son principal facteur de risque est une réaction inflammatoire systémique secondaire à une infection (sepsis). L'atteinte musculaire est sévère et elle prédomine au niveau des membres, mais touche également les muscles respiratoires rendant l'utilisation d'un respirateur artificiel obligatoire et durable. La physiopathologie de la neuromyopathie est complexe et incomplètement connue. L'inflammation et en particulier les cytokines pro-inflammatoires, semblant jouer un rôle central, sont à l'origine d'une production d'espèces réactives de l'oxygène et d'azote très toxiques et aux conséquences multiples. L'objectif principal du projet est d'apporter des éléments permettant de comprendre et d'identifier les mécanismes responsables de l'atteinte musculaire. Il s'agira d'étudier l'expression et/ou l'activation de différents facteurs au cours du développement du sepsis induit par ligature et perforation caecale chez le rat. Plusieurs biomarqueurs de l'inflammation et du stress oxydant seront analysés au niveau plasmatique et musculaire à différents temps après induction du sepsis (pendant 7 jours). En parallèle, l'excitabilité musculaire sera analysée sur des fibres musculaires isolées de rat septique. Ces travaux seront menés sur une cohorte de 370 rats wistar, effectif justifié par le besoin important de matériel biologique utilisé dans plusieurs techniques de dosage. La règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) est respectée. Plusieurs prélèvements et analyses seront réalisés sur le même animal afin de réduire le nombre d'animaux expérimentés en se limitant à l'effectif minimal permettant une validation scientifique des résultats obtenus. Comme l'exige l'éthique, dans tous les cas, des protocoles d'anesthésie et d'analgésie appropriés seront appliqués.

1787- Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont la deuxième cause de morbi-mortalité. Pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, il faut mieux connaître les facteurs régulant la circulation cérébrale qui permettraient de réduire les conséquences des AVC, par exemple en favorisant la dilatation des artères cérébrales et/ou en réduisant leur contraction. Lors

des AVC, les facteurs contractants semblent prédominants par plus de contraction artérielle due à stimulation des récepteurs AT1 de l'angiotensine II et moins de dilatation due à moindre stimulation des récepteurs AT2 de l'angiotensine II. Il faudrait donc rétablir l'équilibre. Or, les récepteurs AT1 et AT2 sont sensibles à la S-nitrosation (fixation de monoxyde d'azote, NO, sur les résidus soufrés des récepteurs). L'objectif est d'étudier les conséquences de cette nitrosation sur le fonctionnement des récepteurs AT1 et AT2. L'exposition d'artères cérébrales de rats à un donneur de NO, le S-nitrosoglutathion, GSNO, abolit la réponse de contraction induite par l'angiotensine II. Nous voulons maintenant approfondir les mécanismes impliqués pour les récepteurs AT1 et AT2 : - 192 rats (Wistar, ou Spontanément Hypertendus et leurs témoins Wistar-Kyoto) mâles adulte (3-5 mois) seront utilisés comme donneurs d'artère cérébrale moyenne, anneaux aortiques, microvaisseaux cérébraux pour dosages biochimiques ou biomoléculaires ; - 100 rats Wistar mâles adultes prétraités in vivo par le GSNO marqué à l'Azote15 pour prélèvement sanguin à la queue et dosage du GSNO ; - 192 rats (Wistar, ou Spontanément Hypertendus et leurs témoins Wistar-Kyoto) mâles adulte (3-5 mois) prétraités in vivo avant le don de tissus. Le prétraitement in vivo par le GSNO (ou par d'autres S-nitrosothiols synthétisés par l'équipe) se fera via des formulations galéniques permettant une libération contrôlée et prolongée (microparticules sous-cutanées ou formulations pour voie orale). Les aspects mécanistiques de S-nitrosation seront évalués sur culture de cellules musculaires lisses (Remplacement). Les réponses de contraction ou dilatation des artères suite à un pré-traitement in vivo par le GSNO nécessitent des tissus prélevés chez l'animal. Toutes les procédures respecteront les règles éthiques (anesthésie/chirurgie, points limites post-opératoires ; Raffinement). Les mêmes animaux serviront pour dons d'artère cérébrale moyenne et d'aorte (Réduction), d'autres pour les microvaisseaux cérébraux (et les intestins si voie orale). L'hébergement se fera par 4 (ou 3 si poids > 600g) /cages 1700 cm² 18 cm haut, avec enrichissement du milieu sous forme de tubes de carton.

1788- Les vaccins ont pour but d'induire chez un hôte, sans lui nuire, les réactions immunitaires protectrices qu'il développe normalement en réponse à une attaque par un agent pathogène. Les vaccins sont constitués d'un antigène spécifique de l'agent pathogène et éventuellement d'un adjuvant. L'antigène provoque une réponse spécifique des lymphocytes T (réponse cytotoxique) et B (production d'anticorps) et la mise en place d'une mémoire immunitaire: il s'agit de la réponse immunitaire adaptative. Mais, pour être efficace, le vaccin doit aussi stimuler les cellules de l'immunité innée, dont les cellules « natural killer » (NK) qui vont activer les cellules responsables de la réponse adaptative: c'est le rôle des adjuvants. Le relai entre la réponse immunitaire innée et adaptative se fait dans les organes lymphoïdes secondaires, en particulier dans les nœuds lymphatiques drainants le site d'administration du vaccin. Les adjuvants vaccinaux sont indispensables à l'efficacité de très nombreux vaccins, ce projet vise à développer un nouvel adjuvant sûr et efficace. L'objectif de ce projet est de caractériser finement, en particulier dans les organes lymphoïdes secondaires, la réponse immunitaire mise en place après l'injection de vaccins adjuvantés par un nouvel adjuvant et, plus précisément, caractériser le rôle des cellules « natural killer » (NK) qui interviennent dans la réponse innée. En effet, si l'efficacité de cet adjuvant a déjà été montrée dans de nombreux essais précliniques et cliniques de phase III, son mode d'action précoce au niveau des organes lymphoïdes secondaires est encore mal connu. Connaitre son mode d'action nous permettra ensuite de l'utiliser de façon optimale, selon la stratégie vaccinale à laquelle il sera couplé. Le modèle animal choisi pour ce projet est le primate non humain (PNH) car c'est le seul ayant une réponse vaccinale similaire à la réponse humaine au niveau systémique et local. Ce modèle permet également d'évaluer les réponses immunes dans les tissus lymphatiques autres que le sang, ce qui est très difficile chez l'homme. Au maximum 11 animaux nés et élevés dans des élevages agréés seront inclus dans le projet. En accord avec la règle des 3R, le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum compatible avec l'utilisation de tests statistiques non-paramétriques pour analyser les données. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (limitation des volumes prélevés, prélèvements et immunisations sous anesthésie). Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés par paires dans des modules individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

1789- Le projet proposé se situe dans le cadre d'une modélisation animale de la physiopathologie de la schizophrénie. La schizophrénie est une pathologie neuropsychiatrique du jeune adulte très invalidante (1ère source de handicap et de suicide des 25-35 ans) touchant environ 1% de la population et évoluant dans 2/3 des cas vers un état chronique. La schizophrénie est une maladie dont la prise en charge est particulièrement lourde et coûteuse, aussi bien pour la société que pour l'entourage familial des patients. Les recherches chez les malades non traités par des neuroleptiques, permettant de mieux comprendre la physiopathologie de la schizophrénie, sont très difficiles à mettre en œuvre, tant sur le plan éthique que pratique, en raison même de la nature de la maladie, ce qui rend la modélisation de la physiopathologie de la schizophrénie chez l'animal vivant, en situation comportementale, tout à fait irremplaçable.

Selon les conceptions contemporaines, la désintégration psychique caractéristique de la schizophrénie résulterait d'une dysconnexion fonctionnelle, entre différentes régions cérébrales, ayant une origine neurodéveloppementale. Parmi ces régions, le subiculum ventral, semble être tout particulièrement la cible de troubles neurodéveloppementaux chez les malades schizophrènes. Par ailleurs, l'existence d'un dysfonctionnement des neurones dopaminergiques atteignant le striatum (dorsal et ventral) dans la schizophrénie est aujourd'hui couramment admise. Ce dysfonctionnement dopaminergique pourrait être lié à une dysconnexion d'origine neurodéveloppementale entre le subiculum ventral et le striatum impliquant un type de récepteurs glutamatergiques, les récepteurs N-méthyl-D-Aspartate (NMDA).

Le projet a pour objectif de préciser chez l'animal (rat) jeune adulte les modalités de réactivité, aux antagonistes non-

compétitifs des récepteurs NMDA (kétamine, dizocilpine), des neurones dopaminergiques atteignant le noyau accumbens (striatum ventral), après inactivation néonatale du subiculum ventral. Cette inactivation fonctionnelle est réalisée chez des rats nouveau-nés âgés de 8 jours. En effet, ce moment de la période postnatale représente un moment crucial du développement cérébral chez le rat, comparable à la fin du second trimestre de gestation chez l'homme; période considérée comme de grande vulnérabilité au développement de la schizophrénie. Dans la mesure où la modélisation animale proposée concerne une pathologie ayant une origine neurodéveloppementale, et s'exprimant chez le jeune adulte, les animaux ayant subi le blocage néonatal du subiculum ventral seront ensuite utilisés à l'âge adulte pour tester leur réactivité, dopaminergique et comportementale, aux différents antagonistes NMDA. Il est important à ce niveau de rappeler que notre projet vise à modéliser la physiopathologie de la schizophrénie chez le rat et non pas la maladie dans son ensemble, typiquement humaine.

Concrètement dans ce projet, le nombre d'animaux utilisés, maintenu à son minimum, est en l'état estimé à 672 rats. Ce nombre total d'animaux estimé est contraint par le nombre maximal des animaux mâles adultes nécessaires pour réaliser l'étude pharmacologique qui est de 336 mâles. Ce nombre est conditionné par la nécessité de valider les résultats d'un point de vue statistique. Il correspond à 56 litières comportant en moyenne 6 mâles et 6 femelles. Les animaux mâles et femelles de chaque portée étant opérés au 8ème jour postnatal le total maximum d'animaux nécessaire est donc de 672. L'analyse statistique des résultats sera réalisée à l'aide de l'analyse de variance multifactorielle avec répétition des mesures dans le temps. Cette stratégie de mesures répétées dans le temps pour un même animal permet grandement de réduire le nombre d'animaux utilisés et, en permettant d'établir le décours temporel des réponses, permet de raffiner l'analyse de celles-ci.

Dans le cadre de la réalisation de ce projet, la mise en évidence d'une souffrance des rats sera attestée par, 1) une diminution de l'ingestion de nourriture et une perte de poids supérieure à 15%, 2) des signes comportementaux d'inconfort caractérisés par de l'apathie ou de l'agressivité et, 3) les signes cliniques standard (une piloérection, une fourrure mal entretenue, des difficultés motrices et/ou respiratoires, le dos voûté). Ces critères feront l'objet d'une attention quotidienne (voire 2 à 3 fois par jour pendant la période de récupération post-opératoire d'au moins 7 jours), tant de la part du personnel non impliqué dans les expériences que par nous-même. Pendant la phase post-opératoire l'eau et la nourriture sont placés dans des récipients adaptés situés directement sur le fond de la cage afin de faciliter la récupération des animaux. Les zones du corps ayant subi une intervention chirurgicale seront examinées nous-mêmes avec un soin plus particulier et délicatement enduites de crème Anesderm, ayant un effet analgésiant, autant de fois que nécessaire. Tout animal dont l'état de santé ne serait pas compatible avec la poursuite de l'expérimentation sera sacrifié par injection d'une dose létale de Doléthal

1790- La pollution environnementale liée aux polluants organiques persistants (POP) et ses conséquences en terme de transfert dans la chaîne alimentaire est une problématique qui prend de l'ampleur dans nos sociétés. Les POP sont des composés chimiques généralement stables et difficilement destructibles (températures dépassant 1 000 °C). Ils sont à l'origine de nuisances potentielles sur les écosystèmes et la santé des organismes vivants (perturbateurs endocriniens, neurotoxicité,...). Au plan national, les polluants organiques tels que les Polychlorobiphényles (PCB) et le Chlordécone (CLD) impactent les sols agricoles dans les régions accidentellement ou historiquement contaminées (ex. St Cyprien, Grès en Bouère, Antilles françaises). Ces molécules ont été interdites en France depuis des décennies mais elles sont encore présentes dans les sols pour plusieurs dizaines voire plusieurs centaines d'années (Plan National d'action sur les PCB, 2008,). La question qui se pose est celle du maintien de pratiques d'élevage sur les parcelles contaminées. En effet, les animaux peuvent ingérer involontairement des quantités non négligeables de sol, et par ce biais les contaminants peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire et in fine contaminer l'homme via son alimentation. Afin de préserver la santé des consommateurs et de sécuriser les denrées alimentaires, l'Union Européenne a fixé des valeurs limites de résidus dans les aliments (Règlements CE N° 839/2008, Règlement UE N°1259/2011). Les plans de surveillance mis en place ont permis d'identifier un nombre significatif de carcasses non conformes (exemple : crise PCB de St Cyprien en 2009, 8000 abattages de bovins ; exemple : contamination Chlordécone aux Antilles, plusieurs dizaines de bovins non conformes en 2011-2012) et donc impropres à la consommation. Les potentialités de séquestration, qu'elle soit en amont (au sein du sol contaminé) ou durant la digestion (apport du séquestrant via l'aliment) apparaissent comme des voies prometteuses de gestion de ce risque. La détermination de l'efficacité de cette séquestration est un enjeu majeur. Plusieurs travaux ayant trait à la problématique de la séquestration de polluants organiques (PCB) ont déjà été valorisés au sein de notre laboratoire, mais une telle approche comparant deux méthodes de séquestration n'a pour le moment pas été menée, notamment sur la CLD. Dans les possibles applications de terrain de ce projet, ces deux séquestrations renvoient à deux applications (dépôt de séquestrant sur le sol vs apport alimentaire de ce séquestrant) ayant des conséquences économiques distinctes (notamment du fait des quantités différentes de séquestrant nécessaire suivant ces modalités de maturations) Le projet consiste à caractériser l'impact de la séquestration de la CLD par le charbon actif (CA), en simulant les conditions réelles d'exposition chez le porc. Les résultats obtenus seront consignés d'une part dans une base de données en vue d'alimenter un modèle générique permettant de simuler la contamination d'un animal élevé en plein air suivant les méthodes d'élevage utilisées. Pour se faire 24 porcelets mâles castrés et sevrés (35 jours) prendront part à cette expérimentation. Le recul que nous avons pu obtenir sur cet animal et ce type de séquestration des contaminants, nous permet de fixer un nombre raisonné de répétition (n=4) pour obtenir des résultats scientifiquement probants. Il ne peut être envisagé de remplacement sur cette thématique et les animaux seront mis à mort après l'expérimentation. Même si les porcelets sont exposés à un polluant toxique (la chlordécone) la dose mimera une exposition environnementale. En se reportant aux seuils toxicologiques, il apparaît que les doses employées ne devraient pas engendrer de troubles ou de la souffrance pour les animaux. Toutefois, un maintien en cage individuelle apparaît nécessaire pour limiter les contaminations croisées entre individus. Les conditions de l'animalerie ont été optimisées pour réduire au

mieux l'impact de ce maintien : le contact visuel et olfactif seront préservés. De même des éléments assurant la distraction des porcelets seront ajoutés dans les cages.

1791- La dégénérescence valvulaire mitrale du chien est la pathologie cardiaque la plus fréquente dans cette espèce. Elle peut affecter toutes les races canines mais les petites sont les plus concernées. Ainsi le Cavalier King Charles présente une incidence de 40% à l'âge de 4 ans, de 70% à l'âge de 7 ans et 100% des animaux sont atteints vers 11 ans en moyenne. Les mécanismes de cette sensibilité particulière de certaines races sont inconnus et les études génétiques ont échoué dans la démonstration claire d'une mutation causale. Par contre, il est maintenant clairement établi que ces animaux ont une augmentation des concentrations sanguines de sérotonine provenant d'une dégranulation anormale des plaquettes et une surexpression, au sein du tissu valvulaire mitral, de récepteurs sérotoninergiques du sous-type 5-HT₂. Par ailleurs, on connaît le rôle de la stimulation de ces récepteurs dans les mécanismes d'activation des cellules de la matrice extracellulaire valvulaire. En effet, c'est l'activation chronique du récepteur 5-HT_{2B} par la nordexfenfluramine, métabolite actif du benfluorex Médiator[®], qui est à l'origine des valvulopathies médicamenteuses dues à ce médicament. L'objectif général du projet de recherche est de développer, pour la médecine vétérinaire, des bloqueurs des récepteurs 5-HT₂ comme protecteurs des valves cardiaques chez des chiens ayant une valvulopathie mitrale débutante détectée par l'examen clinique et/ou l'échocardiographie.

Le présent dossier est la partie in vivo d'un travail qui vise à identifier des molécules qui seront ensuite évaluées en essai clinique chez le chien. Dans une première partie, menée in vitro, l'affinité et l'activité d'une série de bloqueurs 5-HT₂ a été testée sur des cellules transduites avec les récepteurs 5-HT_{2A} et 2B canins. Nous souhaitons maintenant tester les produits retenus dans un modèle de valvulopathie induite chez la souris par l'administration chronique de nordexfenfluramine. Ce modèle est parfaitement établi et doit permettre d'évaluer le potentiel préventif mais aussi curatif de ces molécules. Il constitue la dernière étape pharmacodynamique avant de pouvoir mener des études toxicologiques et cliniques d'efficacité. Dans le cadre du respect des bonnes pratiques de laboratoire relatives à l'expérimentation animale, la règle des 3R se décline pour le présent projet de la manière suivante : Nos protocoles sont standardisés et plusieurs précautions sont prises pour le suivi de nos animaux. Ainsi, une surveillance quotidienne est réalisée par du personnel qualifié, les zootechniciens de la plateforme de l'animalerie, ainsi que la technicienne intégrées au projet. Nos animaux sont hébergés à l'animalerie centrale de la Faculté de Médecine dans des cages réglementaires de type II (14cm de hauteur et 370cm² de surface) sans dépasser 4 souris par cage (poids des animaux aux alentours de 28g). En ce qui concerne l'enrichissement du milieu, nous utilisons des tunnels en carton et des bâtons type « aspen bricks » à ronger. Nous avons réduit le nombre d'animaux sur cette étude, nous allons réaliser ici 10 animaux par groupe pour nous assurer d'avoir 8 souris dans chaque groupe en fin de protocole ce qui sera suffisant au vu du nombre de groupes (4 pour la partie 1 et 2 pour la partie 2) pour réaliser des analyses de variance sur valeurs quantitatives. A l'heure actuelle, le type d'approche développée dans cette étude ne peut, du fait de la complexité des systèmes biologiques intégrés qu'elle met en œuvre, être modélisée par des méthodes in vitro.

1792- La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente système moteur adulte (2 à 3 nouveaux cas pour 100 000 habitants). A ce jour, elle reste une pathologie incurable et toujours fatale, 2 à 5 ans après l'apparition des premiers symptômes, généralement pour cause d'insuffisance respiratoire. La SLA présente des formes sporadiques et familiales ; parmi ces dernières 5 à 20% des cas découlent de mutations du gène de la superoxyde dismutase à cuivre et zinc 1 (Sod1). Sur cette base génétique, diverses lignées de souris transgéniques ont été mises au point, qui reproduisent les principaux symptômes de la maladie. Ces lignées transgéniques sont à la base des recherches expérimentales menées à l'heure actuelle dans le domaine de la SLA. A l'échelle cellulaire, la SLA se caractérise par la dégénérescence de deux types de neurones moteurs : les neurones moteurs supérieurs, localisés dans le cortex cérébral et qui connectent le cerveau à la moelle épinière, et les neurones moteurs inférieurs, situés dans la moelle épinière et qui relaient les informations du cerveau vers les muscles striés squelettiques. Cette atteinte cellulaire conjointe représente l'un des éléments discriminant du diagnostic de la SLA. Malgré cette description clinique précise, il est frappant de noter que les recherches précliniques se sont jusqu'à présent focalisées sur les neurones moteurs inférieurs, faisant des neurones moteurs supérieurs, et du cortex moteur en général, les « grands oubliés » de l'échiquier de la SLA. Face aux échecs répétés des essais thérapeutiques, la question du rôle des neurones moteurs supérieurs, et autres neurones corticaux, dans le déclenchement et la progression de la SLA apparaît plus que jamais pertinente. L'objectif de ce projet de recherche est de mettre en évidence les mécanismes moléculaires qui sous-tendent le dysfonctionnement et/ou la perte des neurones moteurs supérieurs et des neurones inhibiteurs corticaux au cours de la SLA. Plus spécifiquement, nous proposons de marquer les neurones moteurs supérieurs (chirurgicalement), et les interneurons inhibiteurs corticaux (génétiquement) de souris développant la SLA, les souris Sod1G86R, et de souris-contrôle sauvages, afin de pouvoir les purifier, à différent stade de la pathologie, et de réaliser une étude comparative de l'expression des gènes au cours de la maladie. Cette étude permettra de mettre en évidence les voies de signalisation qui contrôlent spécifiquement la perte ou le dysfonctionnement de populations neuronales corticales-clés de la physiopathologie de la SLA, afin d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires et de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

Cette étude impliquera un total de 256 animaux sur 5 ans. Les neurones étant des cellules extrêmement fragiles et très difficiles à purifier, nous estimons devoir regrouper les cellules de 4 animaux différents par purification pour obtenir suffisamment de cellules pour réaliser une extraction des ARN et un séquençage de qualité. Chaque purification sera réalisée quatre fois, pour permettre l'obtention de quatre réplicats biologiques réels (n=4). Les purifications de neurones, extractions d'ARN et séquençages seront réalisés, pour chaque population neuronale (neurones moteurs supérieurs et interneurons

corticaux inhibiteurs), à 4 âges différents (30 et 60 jours, asymptomatiques ; et 90 et 105 jours, symptomatiques), à partir de souris sauvages et Sod1G86R. Pour chaque population neuronale, nous estimons donc qu'un minimum de 128 animaux sera nécessaire, ce qui représente donc un total de 256 animaux. ($4 \text{ animaux/n} \times n=4 \times 4 \text{ âges} \times 2 \text{ génotypes} \times 2 \text{ populations} = 256$). Cette approche est conforme à la règle des trois R : Réduction : - l'étude proposée n'a jamais été réalisée auparavant, et ne consiste donc pas une répétition d'autres études ; - l'étude proposée sera réalisée sur un nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour générer des données fiables, ne nécessitant pas de répétition ultérieure ($n=4$);

- l'étude proposée n'impliquera que des souris mâles, pour limiter les possibilités de variations liées au sexe. Pour limiter le nombre de portées générées, les femelles seront systématiquement utilisées dans le cadre d'autres études menées au sein du laboratoire.

Raffinement : - l'étude a été pensée de manière à limiter au maximum l'inconfort ou la douleur des animaux. La procédure 1 nécessite une chirurgie dont le déroulement et les étapes successives seront suivies de près pour limiter au maximum l'inconfort des animaux ou une potentielle douleur. La procédure 2 est sans réveil et sans douleur. - les souris étant des animaux grégaires, elles seront laissées entre individus issus d'une même portée afin de leur permettre de maintenir les interactions sociales qui limitent un potentiel stress ou mal-être des animaux. Remplacement : dans le domaine de recherche sur la SLA, le modèle animal le plus pertinent est, à l'heure actuelle, la souris mutée sur le gène de la Sod1. Pour intégrer la complexité de la pathologie, il est indispensable de travailler sur des animaux homéothermes ayant une forte dépense énergétique. En effet, le métabolisme et la consommation énergétique ont été récemment montrés comme étant des éléments importants de la pathologie, tant chez la souris que chez l'homme. Outre ces aspects, l'utilisation d'invertébrés comme la drosophile ou le nématode se heurte à une organisation du système nerveux qui n'a pas la complexité requise et ne permet pas de répondre aux questions cliniques posées. Au delà de la SLA, ce projet innovant est destiné à contribuer à l'effort commun de recherche sur l'étiologie des maladies neurodégénératives du système moteur. Orientée vers la découverte de nouveaux acteurs moléculaires et le développement de stratégies thérapeutiques alternatives, cette thématique de recherche originale a pour ambition d'offrir aux cliniciens et à leurs patients de nouvelles réponses et de nouveaux atouts thérapeutiques.

1793- Avec 17,1 millions de décès chaque année, les maladies cardiovasculaires causent, selon l'OMS 29% de la mortalité mondiale, faisant d'elles la première cause de mortalité. L'athérosclérose, l'une des maladies les plus fréquentes, entraîne l'obstruction des petits et grands diamètres des vaisseaux, ce qui provoque une perturbation dans la circulation sanguine. En cas d'occlusion, les vaisseaux sanguins peuvent être remplacés par des prothèses synthétiques ou naturelles. Cependant, le taux de réussite à long terme de ces prothèses reste peu élevé en raison des occlusions générées par leur faible diamètre. A ce jour, il existe un besoin de dispositif qui, à notre connaissance, permet une surveillance facile continue d'une greffe vasculaire. Dans ce cadre, nous proposons de développer un capteur de pression intégré, pleinement attaché aux greffes vasculaires, permettant de surveiller les mécanismes impliqués dans leur applications. Ce capteur pourra également être utilisé pour d'autres applications comme l'anévrisme aortique abdominal (AAA), pour qui la surveillance de la pression interne peut être cruciale pour éviter la rupture potentielle de l'anévrisme. La partie sensible de ce capteur sera constituée d'une matrice polymère de fluorure de vinylène et trifluoroéthylène (P(VDF-TrFE)), chargée en nanoparticules d'oxyde de zinc ZnO. Il est absolument essentiel pour la suite du projet de s'assurer de la biocompatibilité de ce matériau. Un travail préliminaire a présenté des résultats encourageants et a d'ores et déjà permis de montrer une bonne biocompatibilité vis-à-vis des cellules. Mais il est crucial pour valider cette biocompatibilité et l'utilisation de ce matériau pour futur dispositif de procéder également à une étude sur un modèle animal, en chronique. Pour cela, nous proposons une étude prospective et comparative sur 12 rats, répartis en 2 groupes : Groupe 1 (G1) : implantation sous cutanée abdominale durant 1 mois. Groupe 2 (G2) : implantation sous cutanée abdominale durant 3 mois. Chaque rat recevra 3 échantillons différents (des films de 1cm^2 et $250\mu\text{m}$ d'épaisseur) : Echantillon A : film de P(VDF-TrFE) seul; Echantillon B : film de P(VDF-TrFE) + 1 % de nanoparticules de ZnO. Echantillon C : film de P(VDF-TrFE) + 1 % de nanoparticules de ZnO afin de vérifier l'innocuité du matériau, l'état général (comprenant les observances cliniques, des mesures pondérales et les paramètres biologique) de chaque rat sera suivi et une étude histologique sera menée.

1- Remplacement: Un travail préliminaire sur la biocompatibilité/toxicité vis-à-vis des cellules a été réalisé et est très prometteur. Ces tests in vitro ne représentent qu'une première estimation dans l'évaluation de la biocompatibilité du matériau. Ils ont l'avantage d'être des méthodes rapides et sensibles de criblage, mais malheureusement, ils fixent implicitement des limites aux prédictions que l'on serait tenté de faire sur le comportement in vivo des matériaux ou des dispositifs considérés. Le problème de la transposition des résultats obtenus in vitro à l'application en clinique humaine reste entier et les renseignements ultimes ne pourront être fournis que par l'étude des interactions hôte/biomatériau in vivo chez un modèle animal comme le rat.

2- Réduction: Nous proposons un travail expérimental prospectif et comparatif pour lequel le nombre d'animaux utilisé (12 rats) est optimisé de façon maximale : - chaque animal sera son propre contrôle- chaque rat recevra 3 échantillons différents. Ainsi, le nombre d'animaux éligibles est considérablement diminué.

3-Raffinement: Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu) et les méthodes utilisées (anesthésie générale, analgésie contrôlée, soins post-opératoires si nécessaire) sont les plus appropriées pour réduire la douleur, le stress ou tout autre dommage intercurrent. Des mesures très complètes de suivis cliniques et paracliniques seront menés selon les protocoles standards mis en place dans notre structure comprenant des points limites afin d'éviter toute souffrance de l'animal : variation du poids de l'animal, apparence physique externe, changement dans les comportements non provoqués et réponses comportementales aux stimuli externes.

1794- Les traitements des maladies chroniques à l'aide d'anticorps sont des outils pertinents et plusieurs d'entre eux ont montré leur efficacité dans différents domaines ou applications. Cependant ce type de traitement présente quelques inconvénients qui doivent être pris en compte (onéreux, immunogènes). Ils peuvent être remplacés par des traitements avec des peptides qui présentent de nombreux avantages (stabilité, biodisponibilité, efficacité métabolique, faibles toxicité et immunogénicité).

Parmi eux, le peptide P140 améliore les manifestations cliniques chez les patients souffrant de maladies autoimmunes telles que le Lupus érythémateux systémique et augmente la survie chez les souris MRL/lpr qui portent une mutation sur un gène et sont caractérisées par un syndrome auto-immun accéléré. Le peptide P140 correspond à un fragment spécifique d'une protéine (SNRNP70/U1-70K) et son action réduit les processus d'autophagie que l'on retrouve dans d'autres pathologies telles que la maladie de Crohn classée parmi les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Une étude préclinique pour tester l'efficacité de ce peptide envers les MICI consistera en l'administration du peptide P140 chez le rat carencé en vitamines B9 et B12 soumis à un stress inflammatoire colique causé par un traitement, soit au sulfate de dextran sodique (DSS), soit à l'aide d'extraits bactériens lyophilisés. Ce modèle de carence associé à un stress inflammatoire a déjà permis d'étudier l'efficacité de substances à visée thérapeutique dans les MICI et sera donc un outil tout à fait approprié pour l'étude du traitement avec le P140. Les animaux traités subiront une analyse médicale (coloscopie, sous anesthésie générale) puis seront mis à mort pour permettre l'analyse anatomopathologique des organes cibles, principalement le colon, ainsi que le plasma. Les conditions de stabulation, en accord avec la réglementation en vigueur, viseront l'optimisation du bien-être des animaux.

1. Remplacement : Il n'existe aucune alternative d'approche in vitro car notre étude porte sur les effets curatifs d'un peptide synthétique chez le rat soumis à une inflammation chronique de l'intestin, et plus particulièrement au niveau du colon.
2. Réduction : Ce protocole nécessite 2 groupes pour le régime nutritionnel, 3 groupes pour le traitement pro-inflammatoire, 2 groupes pour le traitement anti-inflammatoire et 2 groupes pour le sexe des animaux. Ainsi, 72 rats seront nécessaires pour cette étude pour obtenir une puissance statistique suffisante tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux.
3. Raffinement : Toutes les procédures expérimentales (régime spécial, traitements pro- et anti-inflammatoires, coloscopies) auront lieu dans l'animalerie, dans un environnement sécurisant pour l'animal. De plus les coloscopies se feront sous anesthésie générale. En fin de protocole les animaux seront mis à mort et des prélèvements seront effectués (sang, cerveau, foie, cœur, estomac, intestin, graisses viscérales) pour permettre des analyses biochimiques.

1795- Les vitamines B9 et B12 (donneurs de méthyles) jouent un rôle essentiel dans la production du matériel génétique (ADN, ARN) et des acides aminés nécessaires à la croissance cellulaire, ce qui explique leur caractère indispensable aux cours du développement. Elles sont importantes pour la formation des globules rouges, le fonctionnement du système nerveux (synthèse de neuromédiateurs) et du système immunitaire. Elles sont nécessaires à la production de nouvelles cellules, ce qui les rend particulièrement importantes durant les périodes d'activité métabolique intense comme la grossesse (développement du fœtus), l'enfance et l'adolescence. Des observations faites en 1986 ont montré que les individus nés avec un petit poids de naissance ont un taux de mortalité cardiovasculaire plus élevé une fois atteint l'âge adulte. Cela a abouti à une théorie qui postule qu'une carence protéique pourrait agir durant les phases précoces de la vie et définir en partie le risque de souffrir de maladie cardiovasculaire à l'âge adulte. De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence une relation entre des événements pathologiques durant la grossesse et le développement, plus tard au cours de la vie, de maladies cardiovasculaires, métaboliques et dégénératives. Ce phénomène porte le nom de «programmation fœtale». Nous avons montré que la carence maternelle en donneurs de méthyles est responsable d'un petit poids à la naissance et des altérations chez le raton de 21 jours de plusieurs organes notamment le cerveau, le foie et le cœur avec de manifestations du syndrome métabolique (accumulation des graisses dans le foie et cœur). Nous voulons tester l'hypothèse d'une programmation fœtale avec la question suivante : la combinaison de la carence précoce en donneurs de méthyles et de la surnutrition dans la vie adulte provoque-t-elle une majoration des altérations neurologiques et métaboliques ?

1. Remplacement : Il n'existe aucune alternative d'approche in vitro car notre étude porte sur le développement et le vieillissement des individus dans des conditions de nutrition bien précises.
2. Réduction : notre étude portera sur 146 rats Wistar (26 géniteurs et 120 descendants) répartis en 4 groupes présents à 3 périodes de la vie des animaux (jeune adulte, adulte et adulte vieillissant). Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum, à savoir 10 animaux par groupe à chaque étape, permettant ainsi l'interprétation scientifique des résultats par des tests statistiques appropriés.
3. Raffinement : Nous commençons chaque procédure expérimentale par une période d'acclimation à ce nouvel environnement. Les animaux subiront des tests neurocomportementaux non douloureux à 3 périodes de leur vie et des analyses médicales non invasives (Petscan, Densitométrie osseuse) et sous anesthésie générale. En fin de protocole les animaux seront mis à mort et des prélèvements seront effectués (sang, cerveau, foie, cœur, estomac, intestin, graisses viscérales) pour permettre des analyses biochimiques.

1796- La thérapie photodynamique (PDT) est un traitement employé en cancérologie pour éradiquer les tumeurs de petite taille accessibles à la lumière. Le principe repose sur l'activation, en présence d'oxygène et de lumière, d'une molécule photoactivable appelée photosensibilisateur (PS) qui se localise préférentiellement dans la tumeur. L'une des limitations de ce traitement est le manque de sélectivité tumorale qui a pour conséquence des effets secondaires sur les tissus sains en particulier une photosensibilisation cutanée sur plusieurs semaines pouvant entraîner des brûlures. Une amélioration de la pharmacocinétique des PS pour une meilleure accumulation dans la tumeur tout en préservant les tissus sains est donc essentielle. Les PS étant pour la plupart fluorescents, il est possible de suivre leur devenir dans l'organisme par des techniques basées sur la détection de la fluorescence émise par ces molécules. Le projet a pour objectif d'évaluer, par spectrofluorimétrie

fibrée et imagerie optique de fluorescence (appareil dédié au petit animal), la distribution dans l'organisme de la souris, en fonction du temps (pharmacocinétique) de nouvelles formulations nanovectorisées de méso-tétra hydroxyphénylchlorine (mTHPC), un photosensibilisateur connu en clinique sous le nom de Foscan (Biolitec, Iena A). Des liposomes de mTHPC (Foslip) présentant une pharmacocinétique améliorée par rapport au Foscan (mTHPC base) existent mais leur instabilité dans le plasma limite leur utilisation. D'autres formes de nanovectorisation de la mTHPC pourraient améliorer la stabilité plasmatique tout en maintenant des propriétés pharmacocinétiques favorables. A la suite de l'étude pharmacocinétique, la biodistribution des PS sera ensuite validée par l'analyse des organes après la mise à mort de l'animal à des temps de cinétique précis. Les avantages des techniques employées reposent sur le fait qu'elles sont non invasives. On peut ainsi utiliser le même animal tout au long de la procédure qui dure 48 h et implique 7 séances de spectrofluorimétrie/imagerie. Les dommages causés à l'animal sont faibles et reposent surtout sur la nécessité de greffer des tumeurs humaines et d'injecter les composés en i.v. chez l'animal. Du fait de la xénogreffe et de la possibilité d'appliquer ces techniques sur modèle murin, des souris immunodéprimées ("nude") seront utilisées. Le nombre total d'animaux est basé sur notre expérience antérieure et a été calculé de la façon la plus rigoureuse. Il est de 192 souris pour tester 4 nouveaux composés. Conformément aux exigences de réduction, le nombre d'animaux est calculé au plus juste ainsi le nombre de 4 souris/groupe pour l'imagerie, l'animal avant injection étant son propre témoin (niveau de fluorescence avant l'injection des produits) et la spectrofluorimétrie étant faite en même temps que l'imagerie. Pour les études de biodistribution, cinq souris par groupe sont suffisantes pour l'analyse statistique. Conformément aux exigences de remplacement, notre équipe teste en amont la cytotoxicité des produits in vitro sur des cellules en culture. Conformément aux exigences de raffinement, les techniques non invasives sont privilégiées et l'ensemble des procédures est réalisé sur animal anesthésié.

1797- L'imagerie biomédicale est l'une des disciplines les plus actives dans le domaine de la recherche médicale dans le monde. Le développement de nouvelles méthodes en imagerie biomédicale, et notamment en IRM, est soutenue par l'enjeu sociétal de déterminer des biomarqueurs les plus précoces dans l'évolution de pathologies, de la manière la plus non-invasive possible. Cela se traduit par un marché global pour les technologies en bio-imagerie qui devrait atteindre 37,4 milliards de \$ d'ici 2017. Dans ce contexte, l'objectif du projet est de mettre au point, optimiser et développer de nouvelles séquences d'imagerie IRM afin d'offrir le plus grand panel de méthodes IRM pour la caractérisation et la recherche de biomarqueurs de pathologies.

L'IRM, technique d'imagerie biomédicale en perpétuelle évolution, est extrêmement attractive pour les études précliniques. Elle est non invasive et non irradiante. Elle permet :

- de remplacer l'utilisation de techniques plus invasives pour l'obtention d'information similaire ;
- d'avoir des informations anatomo-fonctionnelles complémentaires et/ou inaccessibles par d'autres techniques dans des conditions de bien-être animal sans comparaison. Ces nouvelles informations peuvent être intégrées dans une étude pour la raffiner comme nouveau critère d'inclusion ou d'exclusion. Cela permet d'obtenir une meilleure qualité des résultats qui n'auront pas besoins d'être répétés, réduisant ainsi le nombre d'animaux;
- un suivi longitudinal individuel des modifications anatomo-fonctionnelles permettant ainsi de réduire très significativement le nombre d'animaux nécessaires ;
- d'avoir accès à des informations déjà utilisées chez l'homme quotidiennement dans les services hospitaliers, permettant de développer des projets de recherche translationnelle.

L'IRM offre, à travers plus d'une centaine de séquences, un très large panel d'images avec des contrastes différents, basées essentiellement, sur les caractéristiques physiques des protons de l'eau donnant ainsi accès à différentes informations telles que des informations morphologiques (structurale et basée sur la diffusion de l'eau dans le tissu), paramétriques (mesures quantitatives), fonctionnelles (basée sur l'oxygénation tissulaire, perfusion), et sur le métabolisme. Des agents de contraste exogènes sont nécessaires pour certaines problématiques comme l'observation de la perméabilité vasculaire, le rehaussement du contraste dans une structure d'intérêt. Malgré la présence par défaut d'un certains nombres de séquences sur la machine, le paramétrage de ces dernières a été déterminé par le constructeur avec des bobines données, à un champ magnétique donné, sur des objets tests. Autrement dit, ces paramètres ne sont pas optimisés pour la plupart de nos besoins. Pour chaque séquence, entre 10 à 20 paramètres sont ajustables pour son optimisation et mise au point : résolution spatiale, temps d'acquisition, rapport signal à bruit, diminution des artefacts, sensibilité aux mouvements physiologiques, organe ou structure à visualiser,... En parallèle, la communauté de scientifiques spécialisés en IRM étant très active, de nouvelles séquences apparaissent tous les ans dont l'intérêt est démontré à travers la publication d'articles. Ce dynamisme oblige les plateformes IRM telle que la nôtre à mettre au point et tester ces séquences sur ces propres équipements. Ce travail des sciences de l'ingénieur doit être réalisé en amont de tout projet, afin de s'assurer de la faisabilité lors du dépôt du projet. Le rongeur (souris, rat) est depuis toujours le modèle de prédilection pour la recherche biomédicale, par sa taille, son coût, sa manipulation aisée et son taux élevé de reproduction. Il est utilisé comme modèle standard pour l'étude de la plupart des pathologies. Il représente ainsi à lui seul environ 80% des expériences menées sur animaux (Union Européenne, 2008). Ce projet sera mené en conformité avec le principe des 3 Rs :

Remplacement : L'utilisation des animaux sera réduite au maximum par l'utilisation d'objets tests ou des tissus fixés lors des premières optimisations et mises au point des séquences. Mais au vue de la complexité des tissus in-vivo dont les caractéristiques IRM sont propres, l'utilisation d'animaux sera incontournable. Raffinement : Les animaux sont maintenus sous anesthésie pendant toute la durée de l'examen IRM afin de réduire au maximum le stress. La température et la respiration des animaux sont en permanence surveillées par un système de monitoring afin de pouvoir intervenir le plus rapidement possible en cas de diminution de ces dernières. En dehors des examens IRM, les animaux sont surveillés

quotidiennement et ont accès ad libitum à la nourriture et à l'eau. Réduction : Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum. Afin de s'assurer que tous les animaux ont une semaine entre 2 examens IRM pendant une période allant jusqu'à 6 mois, nous considérons avoir besoin sur les 5 ans de 100 animaux (rats et souris confondus). Nous avons estimé que 5 rats et 5 souris peuvent être présents simultanément pour nos besoins. Ce délai pourra être de minimum 24h en cas d'utilisation d'agent de contraste tel que le manganèse.

1798- Cette unité d'enseignement (UE) de 1ère année de Master est une unité consacrée à la formation des étudiants aux bases neurobiologiques de grandes fonctions comportementales que sont l'apprentissage et la mémoire ainsi que la régulation des émotions. En complément de la formation théorique, une partie de cette UE vise à permettre aux étudiants de réaliser un travail pratique (TP) relevant de la psychopharmacologie expérimentale. Il s'agit pour eux d'étudier les effets comportementaux de l'administration aiguë de substances anxiolytiques ou psychostimulantes à des rats libres de se mouvoir mesurés dans différents labyrinthes. Le recours à l'administration de médicaments est un moyen simple et bien maîtrisé qui permet de modifier des registres comportementaux comme l'anxiété ou l'activité et donc de donner une dimension pratique aux enseignements théoriques dispensés dans cette UE. Au-delà de cet objectif, la réalisation de ce TP vise également à permettre aux étudiants de mettre en œuvre un protocole expérimental, de gérer sa réalisation, d'en analyser les résultats et de les restituer comme ils seront amenés à le faire dans le cadre de leur futur métier. La réalisation de cette expérimentation se fait au cours d'une séance de travaux pratiques d'une journée. Soixante rats adultes sont utilisés pour un groupe de TP de 16 étudiants. Ces animaux sont produits au niveau de l'animalerie agréée de la faculté selon un plan de reproduction établi lors de chaque année universitaire de manière à ne produire que le nombre d'animaux strictement nécessaire à la réalisation de l'ensemble des TP recourant à l'expérimentation animale. Le groupe de TP est alors divisé en 4 ateliers de 4 étudiants chacun. Deux ateliers visent à étudier l'activité locomotrice des animaux mesurée dans un open-field alors que les 2 autres s'intéressent au comportement relatif au niveau d'anxiété mesuré dans le labyrinthe en croix surélevée. Les substances administrées ont des effets qui sont en rapport avec les effets comportementaux étudiés. Ainsi, les rats testés dans l'open-field sont administrés avec des substances psychostimulantes (caféine ou nicotine) tandis que ceux étudiés dans le labyrinthe en croix surélevée sont injectés avec une substance anxiolytiques (diazépam). Pour réaliser son expérimentation, chaque atelier se voit alloué un lot de 15 rats que les étudiants ont à peser et à répartir aléatoirement en 3 groupes de 5 rats chacun. Un groupe de rats constitue le lot témoin alors que les 2 autres recevront la substance pharmacologique qu'ils ont à étudier à 2 doses différentes. L'expérimentation proprement dite débute une fois les solutions préparées et prêtes à être administrées. Elle consiste à administrer à chaque rat un volume approprié de la solution correspondante à son groupe (solution de méthylcellulose 0,3% dans l'eau stérile pour le groupe témoin, solution de la substance à étudier dans la méthylcellulose 0,3% à 2 concentrations différentes) par voie intra-péritonéale (100µL/100g de poids corporel). Trente minutes après l'administration, les rats sont placés dans le labyrinthe et leur comportement observé et quantifié. Un rat est ainsi administré puis testé au plan comportemental toutes les 10 minutes. Les résultats des observations comportementales sont ensuite recueillis par les étudiants dans un tableau informatique en vue de leur analyse statistique. Chaque atelier de 4 étudiants doit ensuite restituer les résultats de l'expérimentation sous la forme d'un rapport dactylographié devant présenter de façon pédagogique les résultats et les conclusions de l'expérience. Par rapport aux principes de la règle des 3R, le recours à l'animal pour réaliser ce type d'expérimentation et observer les effets de l'administration de ces substances sur le comportement animal ne peut pas être substitué par des systèmes virtuels ou cellulaires (Remplacer). Le nombre de rats utilisés par groupe de TP est de 60 pour permettre à chaque atelier de disposer du nombre minimum d'animaux (15) pour pouvoir réaliser une analyse statistique convenable tout en limitant ce nombre au minimum. Enfin, la gestion des animaux au sein du département d'enseignement dont relève le master et l'UE est optimisée en particulier au niveau de l'organisation des TP pour permettre la réutilisation de ces animaux dans d'autres TP et ainsi limiter au maximum l'utilisation des animaux lors des travaux pratiques (Réduire). La formation des étudiants à l'observation et l'analyse du comportement leur permet ainsi de mieux appréhender au travers des modifications comportementales observées la notion de points limites et d'apprendre ainsi à observer les animaux dans le cadre de l'obligation de surveillance quotidienne et à percevoir toute modification inhabituelle qui peut être synonyme de mal-être et/ou de souffrance devant amener à l'arrêt de l'expérience en cours (Raffinement). Il est aussi à indiquer que la réalisation de ce TP est une occasion pour les étudiants de mettre en application des connaissances pratiques acquises au cours de la licence et du 1er semestre du master relatives à l'expérimentation animale, et à la mise en œuvre et la réalisation de procédures expérimentales. Enfin, la réalisation de ce travail est encadrée par des enseignants-chercheurs universitaires formés aux pratiques de l'expérimentation animale et dans le cadre d'un établissement agréé pour l'expérimentation animale (Raffinement).

1799- Selon les sources de l'OMS (organisation mondiale de la santé), les maladies cardio-vasculaires constituent la première cause de décès dans le monde, avec 29% de la mortalité globale soit 17 millions. Parmi ces maladies, les pathologies vasculaires dues à la présence d'une plaque d'athérome sont caractérisées par une réduction localisée du calibre des artères responsables d'une diminution du flux sanguin et de la mort des tissus qui ne sont plus vascularisés. D'ailleurs ce type de lésions au niveau d'une artère coronaire peut conduire à un infarctus du myocarde. Le traitement en dernier recours est chirurgical et se traduit par un pontage artériel. L'utilisation d'un vaisseau appartenant au patient (autogreffe) reste la solution idéale, mais seulement environ un tiers des patients n'ont pas de vaisseau autologue disponible ou adapté. Dans ce cas, des greffons vasculaires synthétiques sont utilisés avec succès pour le remplacement d'artère de gros calibre ; cependant les greffons de faible calibre (diamètre interne \leq 6 mm) s'obstruent rapidement et n'assurent plus leurs fonctions. L'un des acteurs majeurs de cette obstruction observée est l'absence de cellules sur la paroi interne du greffon. Il est donc important de

créer une banque de greffons vasculaires cellularisés, de différents diamètres, non immunogènes, hémocompatibles et capables de résister aux contraintes hémodynamiques. Le greffon actuellement développé au laboratoire répond aux attentes des chirurgiens vasculaires mais leurs capacités thérapeutiques doivent encore être validés à long terme chez l'animal. Nous proposons l'implantation d'un substitut vasculaire naturel, fabriqué à partir d'une artère ombilicale humaine sans cellule que l'on "re-fonctionnalise" avec des cellules souches mésenchymateuses (qui ont l'avantage de donner des cellules non-immunogènes spécialisées et fonctionnelles). L'objectif de ce projet, est de comparer 2 types de substituts originaux fabriqués soit par une méthode dite conventionnelle, soit par une méthode dite "modifiée". Ce travail expérimental de pontage sera réalisé chez le lapin (nombre maximal d'animaux utilisés = 30) car leur carotide a un diamètre comparable à celui d'une coronaire humaine avec une pression sanguine similaire à celle de l'homme. De plus ce modèle permet une grande accessibilité pour des mesures écho-doppler qui permettront de suivre sur plusieurs semaines, la fonctionnalité du greffon. Le nombre d'animaux a été calculé d'après notre expérience du modèle afin d'obtenir des groupes statistiquement exploitables. Nous avons veillé à en réduire au maximum le nombre impliqué dans cette étude. Afin d'optimiser l'expérience, les conditions d'hébergement, de soins (points limites) et les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) sont les plus appropriées pour réduire la douleur, le stress ou tout autre dommage qui en découleraient. Enfin la mise en œuvre de cette expérimentation animale ne se fait qu'à l'issue d'une validation de ces greffons vasculaires in vitro la plus complète possible (modèle de contraintes mécaniques en 3D). La phase de validation sur l'animal est alors impérative avant les premiers essais cliniques. Les résultats attendus seront, d'une part la perméabilité vasculaire à long terme avec une réponse physiologique de la paroi et un débit sanguin adapté, et d'autre part, une différenciation des cellules souches en cellules vasculaires matures et fonctionnelles.

1800- L'inflammasome est un complexe protéique qui régule l'inflammation au sein de notre organisme. Il joue d'ailleurs un rôle primordial dans de nombreuses pathologies humaines inflammatoire tel que la goutte ou le diabète de type 2. Des études récentes ainsi que des observations réalisées par l'équipe démontre que l'inflammation favorise la croissance des cellules tumorales. Notre objectif est donc de démontrer in vivo le rôle de l'inflammasome dans la tumorigenèse pulmonaire et mammaire en utilisant des modèles de greffes de cellules tumorales et sous-cutanées. D'une façon systématique, nous comparerons la croissance des tumeurs chez les souris contrôles ou chez lesquelles l'inflammasome est absent. De plus, l'inflammasome ayant un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire, nous étudierons les cellules immunitaires présentes au sein des tumeurs dans les différentes souris afin de déterminer son rôle dans la réponse immunitaire anti-tumorale.

Les résultats obtenus lors de ce projet permettront de mieux comprendre le rôle de l'inflammasome dans les cancers du sein et du poumon. Dans un objectif thérapeutique, mieux comprendre le rôle de l'inflammation dans la croissance des cellules tumorales permettra de cibler le complexe de l'inflammasome et de déterminer les conséquences physiologique de son absence au cours du développement des cellules tumorales. Plus précisément, l'utilisation de 1236 souris nous permettra d'étudier l'inflammasome au cours du processus complexe qu'est la croissance tumorale mammaire et pulmonaire. Les procédures mises en place ici sont issues de protocoles améliorés au sein de l'équipe permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés. La combinaison de technologies avancées permet également de n'utiliser qu'un petit groupe d'animaux pour en extraire un grand nombre de données. Afin de prévenir toute douleur, certaines procédures seront effectuées sous anesthésie et les animaux utilisés seront suivis tout au long des procédures avec une attention particulière.