



**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 (20)

2001- Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est au 5ème rang des cancers les plus fréquents, son pronostic est sombre et la survie est limitée chez la plupart des patients. Les options thérapeutiques limitées et présentent un fort taux de récurrence qui reste jusqu'à maintenant sans solution. Le CHC présente une composante inflammatoire importante et de nombreuses études cliniques et précliniques, dont nos précédents travaux, ont permis de mettre en évidence une réponse immunitaire anti-tumorale naturelle ainsi que des stratégies d'immunothérapie visant à la stimuler. L'efficacité de ces approches reste partielle et des combinaisons avec d'autres traitements sont activement recherchées.

Comme pour d'autres cancers, le développement du CHC s'accompagne souvent d'une perte de sensibilité à l'apoptose des cellules tumorales. Des altérations de l'activité des membres de la famille BCL-2 sont souvent retrouvées dans les cellules cancéreuses, dont le CHC. Les BH3 mimétiques sont des inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de cette famille dont l'action anti-tumorale est démontrée dans divers cancers et qui font l'objet de développements cliniques. La sensibilité de lignées de cellules de CHC à l'un de ces inhibiteurs (ABT-737) a été montrée in vitro. Si les mécanismes d'action de ces inhibiteurs sur les cellules tumorales sont assez bien caractérisés, il n'en est pas de même de leurs effets sur les cellules du microenvironnement tumoral, et plus particulièrement sur la composante immunitaire de ce microenvironnement. Le but de ce projet est de comparer les effets de deux inhibiteurs de la famille des BH3 mimétiques (ABT-737 et ABT-199) sur les cellules de tumeur hépatique et sur les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral au cours de la carcinogénèse hépatique, en conditions basales, ou dans le cadre d'une combinaison thérapeutique avec une stratégie d'immunothérapie non-spécifique avec un anticorps agoniste du CD137. Pour cela le modèle de CHC orthotopique chez la souris immuno-compétente C57Bl/6 sera utilisé. Les cellules tumorales Hepa1.6 sont inoculées par voie intra-portale et envahissent le parenchyme hépatique conduisant à un développement tumoral important en 3 semaines. Cette procédure est appliquée tout en respectant le bien être de l'animal avec un suivi associé à des points limites afin d'anticiper toutes douleurs ou inconforts dus au développement tumoral. Les inhibiteurs BH3 mimétiques seront administrés tous les 2 jours, seuls ou en combinaison avec deux injections d'anticorps anti-CD137.

Des analyses in vitro et in vivo permettront d'étudier l'effet des inhibiteurs sur les cellules tumorales et sur les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral. L'effet thérapeutique sera évalué par des études de survie et des mesures de la charge tumorale des animaux. Le nombre d'animaux impliqué dans l'étude est de 300 souris. Cette étude permettra d'évaluer la dépendance relative à Bcl-2 et/ou Bcl-xL des cellules cancéreuses et des cellules immunitaires du microenvironnement tumoral, qui reste méconnue aujourd'hui et peut avoir d'importantes répercussions en clinique.

Notre protocole est conforme aux nouvelles directives de la règle des 3R.

Dans le cadre d'un effort de raffinement des procédures, nous avons établis des points limites assez précoces permettant d'anticiper la détresse et la douleur de l'animal afin d'interrompre l'expérience, voir euthanasier l'animale si nécessaire. L'euthanasie est réalisée si 3 signes cliniques notoires traduisant une atteinte du bien-être de l'animale sont observés et persistent après les différentes mesures mises en place pour y remédier. Le développement tumoral et la charge tumorale sont un de ces points limites sur lesquelles nous procéderont à une surveillance accrue.

Dans le cadre de la réduction du nombre d'animaux impliqués, notre projet s'appuie sur des études préliminaires et un protocole par étape permettant une meilleure approche des coûts/bénéfices. Ainsi, le nombre de souris impliquées dans le projet a été diminué de façon à rester suffisant et statistiquement valable. Les expériences sont répétées une seule fois afin de voir la reproductibilité. Le nombre d'animaux a été estimé à 300, néanmoins ce nombre peut être amené à diminuer en fonction des résultats des 2 traitements. Dans le cas d'une non efficacité d'un traitement ABT, le nombre d'animaux comptabilisé pour le projet pourrait être amené à être réduit par une non-utilisation des animaux de ce groupe pour les dernières expériences.

2002- La coordination des fonctions exercées par l'organisme repose sur des systèmes de communication qui maintiennent l'équilibre fonctionnel indispensable à la vie. L'un d'eux, le système neuroendocrinien, agit en sécrétant des substances

chimiques, les hormones, dans la circulation sanguine où elles diffusent jusqu'à leurs tissus cibles afin d'exercer leur action. Dans les cancers neuroendocrines, cette sécrétion devient anarchique ce qui provoque une hypersécrétion à l'origine de complications cliniques sérieuses. De plus, des données de la littérature suggèrent que la sécrétion des cellules tumorales pourrait influencer ou rétroagir sur le développement des tumeurs. Cependant, à l'heure actuelle, l'impact de l'activité sécrétrice des cellules sur l'initiation et/ou le développement des tumeurs n'a jamais été démontré. Notre objectif est d'éclaircir ce point en comparant la croissance tumorale des cellules neuroendocrines possédant des propriétés sécrétrices différentes.

Dans ce but notre équipe de recherche va générer des modèles de xénogreffes de cellules neuroendocrines cancéreuses chez des souris immunodéficientes (absence de rejet des greffons). La croissance tumorale sera mesurée au cours du temps. En parallèle, des prises de sang hebdomadaires chez l'animal permettront de doser la quantité d'hormones sécrétées par les tumeurs. Cette approche nous permettra d'étudier la corrélation entre la sécrétion des tumeurs et leur développement.

Le bien être des animaux sera scrupuleusement respecté et surveillé tout au long de la procédure. Les souris seront hébergées dans des cages collectives, enrichies par des bâtonnets, des nids et d'autres objets réconfortants. Les tumeurs peuvent générer des gênes voire une souffrance chez l'animal. Dans tous les cas nous veillerons à ce que cette gêne éventuelle ne dépasse pas un seuil douloureux en utilisant une grille de scoring des symptômes, validée par un vétérinaire. Si l'animal souffre il sera sacrifié avant la fin de l'expérience. Trente souris seront utilisées pour ce projet qui constitue la dernière phase de notre projet initial, précédemment autorisé par la Comité d'Ethique.

Notre projet global a pour but de découvrir l'origine des perturbations favorisant l'apparition des tumeurs neuroendocrines et d'ouvrir des perspectives de recherche visant à identifier les molécules sécrétées qui génère l'apparition et la croissance tumorale. Ceci permettrait à long terme d'identifier des drogues capables de rétablir une sécrétion normale dans les cancers neuroendocrines.

2003- Les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de mortalité dans le monde avec 16,7 millions de morts chaque année. Un nouveau composé (peptide inhibant l'inflammation) prometteur dans le traitement de l'infarctus du myocarde a été identifié. Il est bien toléré chez l'animal mais a une durée de vie courte dans l'organisme. Des implants permettant l'utilisation de ce composé dans des indications chroniques ont été développés, dans le but de stabiliser ce composé et de contrôler sa libération dans l'organisme pendant plusieurs semaines, limitant ainsi le nombre d'injections requises.

Le composé actif est associé à un mélange de solvants tolérés biologiquement, de polymères d'acides lactique et glycolique biocompatibles et biodégradables, qui, une fois injecté, forme un implant qui sera lentement biodégradé pour libérer progressivement le composé pendant plusieurs jours/semaines.

Cette étude vise à vérifier la tolérabilité de tels implants chez le rat et la souris, et étudier la cinétique de libération du composé thérapeutique.

Étude de tolérabilité : Ces implants sont déjà connus pour être très bien tolérés chez le rat, donc seules 6 souris recevront 2 implants sous-cutanés afin d'étudier la tolérabilité.

Étude pharmacocinétique : le composé thérapeutique sera administré chez 42 souris c57/bl6 mâle (6 semaines) et 90 rat Wistar mâle (3 mois), divisés en plusieurs groupes pour recevoir le composé en intrapéritonéal d'une part ou en sous-cutané sous la forme de 2 implants différents d'autre part. Nous évaluerons ensuite la concentration plasmatique du composé au cours du temps.

Points limites : les animaux seront observés de façon quotidienne afin de suivre les variations de poids et la prise de nourriture, l'apparence physique externe et cutanée au niveau des implants (aspect général du poil, aspect de la peau ainsi que le comportement pouvant traduire une douleur ou un inconfort).

La stabilité et la cinétique de libération du composé actif par les implants a été étudiée au préalable in vitro afin de limiter au maximum le recours à l'expérimentation animale : Remplacement.

Le nombre d'animaux a été défini de façon à obtenir la meilleure significativité statistique avec le minimum d'animaux. En outre, l'administration de plusieurs doses permet une analyse itérative des résultats. En fonction des résultats des premiers groupes, nous pourrions réduire le nombre d'animaux inclus dans l'étude en supprimant les groupes suivants (par exemple en cas de non tolérabilité d'une formulation donnée) : Réduire.

Le design de cette étude a été choisi pour éviter une procédure chirurgicale lourde (pose de cathéter chroniques), et les procédures d'anesthésie et d'injections des implants respecteront les règles éthiques (anesthésie/chirurgie, points limites) : Raffinement.

2004- La tétraploïdie est une aberration génétique survenant dans les premiers stades du cancer. Cette modification conduit à la formation de cellules contenant le double de chromosomes et qui sont un état intermédiaire entre la diploïdie, cellules avec un contenu en chromosomes normal et l'aneuploïdie, caractéristique des cellules tumorales de mauvais pronostic. Nous avons démontré que les cellules tétraploïdes cancéreuses sont plus résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie, comparativement aux cellules diploïdes cancéreuses. Nous avons prouvé que le système immunitaire peut reconnaître et détruire les cellules tétraploïdes, empêchant ces cellules génératrices de cancer de se propager et de générer des cellules aneuploïdes. Il a été aussi décrit que le vieillissement est associé à une augmentation de la fréquence des cellules polyploïdes, reflétant peut-être la diminution des fonctions immunitaires associée au vieillissement.

Ce projet vise à étudier la relation entre le vieillissement et le cancer, étant donné que l'âge est le principal facteur de risque de développer un cancer.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales sur des animaux vivants, plus particulièrement la souris. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire ex-vivo du fait de sa complexité. Par ailleurs, le modèle de carcinogenèse utilisé a été développé chez la souris pour permettre ce type d'étude.

Ce projet se déroulera sur plusieurs années, et il nécessitera 1250 souris. Ce nombre d'animaux se justifie notamment par la différence d'âge des souris et les différents contrôles nécessaires pour montrer l'efficacité de nos modèles.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. D'une part, car elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur). En effet, l'objectif de notre travail est d'étudier la relation entre le vieillissement, le système immunitaire et le cancer, nous avons besoin de réaliser des expériences in vivo chez la souris, notamment moyennant d'un modèle de greffe de peau et un modèle de carcinogénèse de glande mammaire dont nous avons besoin d'un organisme entier, chez des souris immunocompétentes et immunodéficientes.

Les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Les nombres de souris par lot ont été calculés par des méthodes de calcul de puissance (avec un seuil de 5% et une puissance de 90%). Les tests statistiques utilisés seront principalement des suivis longitudinaux (e. g. inférence linéaire sur le log de la taille des tumeurs). En cas de croissance tumorale atypique (comme pour les cas de régression tumoral), nous utiliserons aussi des tests à des temps donnés (e.g. t-test, chi2, etc.).

Enfin, nous pourrions utiliser moins de souris si nous trouvons une significativité avec moins de souris. Les animaux recevront une alimentation adaptée à leur condition (alimentation enrichie, accès très facile, digestibilité importante) dès apparition des signes modélisant la carcinogénèse.

2005- La microchirurgie vasculaire est une technique chirurgicale utilisant un microscope permettant de réaliser des anastomoses vasculaires entre vaisseaux de très petit calibre (jusqu'à 0.2 mm de diamètre). Son développement a considérablement étendu les possibilités thérapeutiques en chirurgie, plus particulièrement en chirurgie réparatrice. En effet, elle permet la réimplantation de tissus amputés (doigt, orteil, oreille...), et surtout la pratique de lambeaux libres, tissus prélevés aux dépens d'une zone donneuse avec des vaisseaux nourriciers, qui seront transférés et micro anastomosés à des vaisseaux d'une zone receveuse. Malgré de nombreuses améliorations techniques la réalisation de micro-anastomoses vasculaires présente un taux d'échec de 10% par thrombose. Habituellement le modèle d'étude utilisé est le rat, car la dimension de ses vaisseaux approche celles des vaisseaux utilisés chez l'homme. La survenue d'une thrombose est classiquement objectivée à un temps donné soit par sacrifice de l'animal et contrôle visuel du thrombus, soit par une nouvelle chirurgie en effectuant un test de perméabilité sur l'anastomose. L'objectif de ce projet est donc le développement d'un modèle d'étude en temps réel de la thrombose après micro anastomose vasculaire par microscopie de fluorescence chez la souris. Les avantages d'un tel modèle sont:

- une étude dynamique et continue de la thrombose, impossible à réaliser sur les modèles habituellement utilisés puisque la mesure nécessite une exploration chirurgicale voire un sacrifice de l'animal

- une étude de la thrombose à un stade débutant (microscopique) ou partiel, stade particulièrement intéressant puisqu'une évolution vers le thrombus occlusif pourrait éventuellement être évitée, et observée.

Nous souhaitons étudier la thrombose après micro-anastomose durant les 6 premières heures par microscopie intravitale.

Les dommages liés avec cette procédure tiendront du fait que les animaux devront subir préparation chirurgicale autorisant la pratique d'une microscopie de fluorescence sur un axe vasculaire. A l'issue de l'expérimentation les animaux seront tous euthanasiés. Ce projet inclut 2 procédures, la première est un gavage qui sera effectué sous anesthésie gazeuse, la deuxième est une procédure invasive sans réveil les souris sont maintenues sous anesthésie tout au long de l'expérience.

Le nombre d'animaux nécessaire pour cette étude préliminaire sera de 160 souris sur 2 ans.

L'utilisation d'un modèle vivant avec un système hémostatique dont les principes fondamentaux sont proches de l'être humain est nécessaire pour conduire ce projet. Le Modèle murin a cette capacité et présente en outre des vaisseaux dont les dimensions sont relativement similaires aux vaisseaux utilisés habituellement en chirurgie humaine.

2006- *Coxiella burnetii* est l'agent responsable d'une zoonose nommée la fièvre Q. Cette bactérie qui est transmise à l'homme notamment par voie aérienne peut survivre pendant des années dans l'environnement, ce qui justifie la recherche notamment sur la dynamique de transmission pour réduire et/ou éviter la contagion.

Notre but est de développer un modèle afin de suivre la dynamique réelle de transmission de *C. burnetii* d'animaux infectés à des animaux sains.

Le projet portera sur un modèle murin. Il consistera à mettre en contact des souris préalablement infectées par voie aérienne avec des souris saines afin d'étudier la transmission horizontale en fonction du temps.

Les critères principaux d'évaluation de la transmission seront la détection de la bactérie dans le sang et dans différents organes des souris saines. Le profil sérologique de chaque animal sera également établi (dosage des taux des IgG/IgM). Le sang sera prélevé sous une anesthésie générale. Afin de maximiser les données obtenues de chaque animal, plusieurs tissus seront prélevés (sang, foie, rate, cerveau, poumons, cœur, tissu adipeux et intestins).

Les animaux seront hébergés dans des cages appropriées avec eau et aliments à volonté. Pour le confort des souris, un enrichissement sera mis en place à l'aide d'igloos et du matériel de nidification pour réduire toute angoisse. Les animaux seront surveillés quotidiennement pour déceler une quelconque souffrance.

Ce projet nécessitera au total 100 souris.

2007- Le diabète de type 2 est un problème majeur de santé publique. Il est en constante augmentation dans notre société. En cause une augmentation de la prévalence de l'obésité, soit une augmentation de la masse de tissu adipeux. Le tissu adipeux participe au contrôle de la glycémie d'un individu. Le développement excessif du tissu adipeux perturbe les fonctions de l'adipocyte, cellule majoritaire du tissu adipeux, qui ne peut plus remplir sa fonction pour le maintien de la glycémie. Lors d'un apport alimentaire accru en énergie, on observe un changement d'expression d'un grand nombre de protéines dans l'adipocyte. Certaines des protéines dont l'expression est augmentée perturbent les fonctions de l'adipocyte en agissant sur des voies de signalisation délétères. Nous voulons étudier une de ces protéines, dont l'expression est augmentée dans l'adipocyte de souris génétiquement obèses ou soumises à un régime riche en graisses et chez l'Homme obèse, et déterminer si cette augmentation d'expression est responsable de la perte de contrôle de la glycémie chez la souris. Aucune étude publiée à ce jour n'a exploré le rôle de cette protéine dans le contexte du diabète de type 2. Pour satisfaire au remplacement, nous avons montré que l'augmentation d'expression de cette protéine dans un adipocyte en culture altère la fonction de l'adipocyte et les résultats obtenus soutiennent l'hypothèse de l'implication de cette protéine dans le développement du diabète de type 2. Nous devons donc maintenant invalider le gène de cette protéine uniquement dans l'adipocyte pour en déterminer les conséquences dans un organisme entier. Nous utiliserons un modèle de souris génétiquement modifiées d'inactivation adipocyte spécifique, nous soumettrons les souris à un régime riche en lipides et déterminerons les conséquences sur le contrôle de la glycémie.

Si nous observons que l'absence de cette protéine permet d'empêcher les perturbations de glycémie lors de l'obésité, nous déterminerons si l'inhibition de cette protéine chez des souris déjà obèses corrige les défauts glycémiques de ces souris. Pour cela nous invaliderons le gène de cette protéine dans des souris obèses grâce à un modèle de souris génétiquement modifiées permettant l'inactivation adipocyte spécifique et inductible par un composé inoffensif pour la souris. L'ensemble de ce travail nous permettra de découvrir si la protéine que nous étudions et la voie de signalisation qu'elle contrôle sont impliquées dans l'apparition des désordres glycémiques chez la souris obèses et si l'inhibition de cette protéine et la voie de signalisation qu'elle contrôle sont à considérer pour le traitement du diabète de type 2.

Au final ce projet présentera un rapport avantages/dommages positif puisqu'il doit contribuer à améliorer nos connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du diabète de type 2 chez l'homme lors de l'obésité en utilisant (i) des modèles de souris établis (fond génétique pur C57Bl6) qui ne présente pas de phénotypes dommageables et (ii) des procédures expérimentales qui n'affectent que faiblement les conditions de vie des souris.

Pour satisfaire à la réduction chaque procédure prévoit d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaire à des études statistiques pertinentes: 240 souris mâles dans deux procédures. Pour le raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés et les personnes réalisant les procédures sont autorisées et appliqueront les règles d'éthique. L'environnement est amélioré pour diminuer le stress. Le suivi sanitaire régulé permettra d'identifier les souris souffrantes et de prendre les mesures nécessaires le plus rapidement possible.

2008- L'objectif du projet est de mettre au point un modèle de polyarthrite rhumatoïde (PR) et de tester l'efficacité d'un composé utilisé dans le traitement de fond de la PR: le Méthotrexate (MTX).

Il existe différents modèles animaux qui induisent le développement de polyarthrite chez le rat ou la souris.

Pour la mise au point du modèle de polyarthrite rhumatoïde, le modèle CIA (collagen-induced arthritis) sera utilisé car le modèle d'arthrite induite par le collagène génère des lésions plus proches de la PR que celle induite par le AIA (adjuvant-induced arthritis). Pour cela 2 injections de collagène de type II bovin émulsifié avec un adjuvant incomplet de Freund seront réalisées dans la base de la queue des animaux.

D'autre part, nous avons choisis de travailler avec le rat car la réponse est plus variable chez la souris non prédisposée. Nous travaillerons sur des souches consanguines qui ont été très souvent utilisées dans la littérature et qui a montré un développement important de la pathologie. Nous utiliserons des rats âgés de 8-9 semaines à réception. Pour la mise au point du modèle, nous ferons varier le délais entre les deux injections (7 jours, 14 jours et 21 jours), la concentration en Collagène de type II bovin (1mg/mL ou 2 mg/mL), le sexe des animaux (mâle et femelle) et la souche (Lewis et Wistar). Une fois le modèle établis, le traitement au Méthotrexate (MTX) sera mis au point. Le MTX sera utilisé comme produit de référence car il est utilisé comme traitement de fond de la PR chez l'homme. Trois doses de MTX seront testées (0,3 mg/kg; 1mg/kg et 1,5mg/kg) en injection intrapéritonéale, une fois par semaine. Pour évaluer le développement de la pathologie, un suivi clinique sera réalisé 3 fois par semaine. La réaction des animaux aux différents traitements sera aussi évaluée lors des suivis cliniques. Vingt huit jours après la première injection les animaux seront euthanasiés puis leur sang sera ponctionné. Une radiographie des tarse sera réalisée. Ils seront ensuite prélevés pour quantifier les cytokines et agents pro-inflammatoires présents au niveau de l'articulation et une analyse histopathologique sera réalisée afin d'évaluer les éventuelles modifications lésionnelles des tissus. Afin de bien définir notre modèle, le dernier protocole consistera à évaluer le développement de la pathologie dans le temps. Pour cela une cinétique sera réalisée où des animaux, traités ou non au MTX, seront sacrifiés avant la deuxième injection, lors de l'atteinte du pic d'inflammation visible par analyse clinique et lorsque l'inflammation sera stabilisée.

A chacune des conditions testées, 5 à 10 animaux seront utilisés en fonction de la variabilité de la réponse aux injections afin d'obtenir des résultats qui soient statistiquement comparables.

En comparaison un groupe contrôle sain de 3 rats sera évalué. Ainsi, 355 rats au maximum et 191 rats au minimum pourront être utilisés.

Toutes les injections seront réalisées sous anesthésie gazeuse (mélange air/Isoflurane). L'injection du collagène de type II émulsifié avec un adjuvant incomplet de Freund 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.

2009- L'objectif de cette étude est de rechercher l'existence de liens entre cannibalisme et personnalité chez les larves d'un poisson d'eau douce, le sandre. Est-ce qu'un individu cannibale présente une personnalité différente d'un individu non cannibale ? Le cannibalisme chez le sandre est largement répandu dans le milieu naturel ou en milieu d'élevage. Le cannibalisme est un des goulots d'étranglement majeurs dans l'élevage intensif en aquaculture des larves de sandre. Il est connu que d'un point de vue comportemental, les individus montrant une personnalité de type « proactif » sont les plus agressifs et dominants et montrent une motivation supérieure à s'alimenter dans un environnement nouveau. Dans ce contexte, il est légitime de rechercher un lien entre personnalité et cannibalisme.

Pour cette étude, on se propose d'utiliser les larves de sandre chez qui le cannibalisme apparaît dans les deux ou trois semaines qui suivent l'éclosion. On les soumet à 3 tests comportementaux (nos trois procédures expérimentales) : Le premier test est un labyrinthe en croix, il permet d'évaluer l'exploration, la témérité et l'activité d'un individu. Le deuxième test est un test de sociabilité permettant d'évaluer le caractère social d'un individu. Ce test sera également conduit dans un labyrinthe en croix. Le troisième test est un test du nouvel objet qui permet d'évaluer la témérité, l'exploration et l'activité.

Pour ces différentes procédures, nous veillons à respecter la règle des 3R. Cette étude est une étude comportementale et donc implique de travailler sur l'animal vivant ; nous ne pouvons donc pas remplacer l'animal. Le nombre d'individus dans chaque lot (ou réplica) a été défini en fonction des exigences des tests statistiques (n=30 comme un minimum par réplica, soit un total pour les 6 réplicas de 180 poissons). Notre étude a été établie de façon à limiter les manipulations des animaux (diminution du stress), de respecter les règles de bien-être en particulier en anesthésiant les animaux pour le marquage et les photographies. Enfin, la mise à mort se fera à la fin de l'expérimentation par une surdose d'anesthésique. Cette dernière phase est obligatoire car nous avons besoin de conserver les animaux pour des analyses supplémentaires, ils ne pourront, donc, pas être réutilisés pour d'autres expérimentations.

2010- Une allergie est une réaction exagérée du système immunitaire vis-à-vis d'un allergène qui peut être présent dans l'alimentation, dans l'air... en principe sans danger pour l'homme Elle se présente sous différentes formes : digestives, cutanées, respiratoires.

Brièvement, la maladie allergique est divisée en 2 phases. Lors du premier contact avec un allergène, l'individu ne déclenche pas de réaction allergique mais produit des immunoglobulines (IgE) dirigées contre cet allergène. Ces IgE vont aller se fixer sur un mastocyte, une cellule contenant de nombreuses molécules, dont l'histamine. Lors du second contact avec cet allergène, l'allergène va être reconnu par les IgE fixées sur le mastocyte et ce dernier va relarguer son contenu induisant des symptômes cliniques.

Depuis le milieu des années 1950, de nombreuses publications mettent en évidence une association inverse entre allergie et cancer. Par exemple, une étude épidémiologique, réalisée aux Etats Unis en 2005, rapporte que les personnes atteintes d'asthme ou de rhinites allergiques ont un risque diminué de 20% de développer un cancer colorectal et 10% de développer tout autre type de cancer. Cette même étude révèle également que les personnes atteintes uniquement de rhinites allergiques développent moins de cancer du pancréas, et les personnes atteintes d'asthme développent moins de leucémie, de cancer du sein ou de cancer colo-rectal.

L'ensemble de ces données suggère que les IgE participeraient à l'immuno-surveillance de l'organisme, processus par lequel le système immunitaire détecterait et détruirait toute cellule tumorale nouvellement formée.

L'objectif de cette étude est de tester cette hypothèse en étudiant le potentiel protecteur d'IgE contre deux modèles de cancer (tumeur et métastases) chez des souris allergiques à différents lactosérums.

Pour cette étude 64 Balbc femelles seront utilisées et divisées en 8 groupes de 8 souris. Elle sera composée de 2 phases, la seconde phase ne sera réalisée que si la première phase est concluante.

Les souris seront sensibilisées à 3 lactosérums et ensuite lorsque l'existence d'IgE spécifiques sera confirmée, l'induction d'un cancer du sein sera effectuée et nous pourrons évaluer le pouvoir « protecteur » des IgE anti-lactosérum contre ce cancer. Deux voies d'injections de cellules seront testées. Des cellules seront injectées par voie sous cutanée. Cette technique nous permet de suivre l'évolution du volume tumoral en fonction du temps. L'injection de telles cellules par voie intraveineuse permet d'obtenir des métastases.

Une surveillance quotidienne des souris sera effectuée, weekend et jours fériés inclus. Elles seront maintenues dans un cycle jour-nuit de 12 heures à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et une hygrométrie de $55 \pm 20\%$. Elles disposeront de nourriture et d'eau ad libitum.

Nos travaux portant sur le cancer du sein, nous n'utiliserons que des souris Balbc femelles. Chez cette souche, l'injection de cellules 4T1 mime le cancer du sein humain (Raffinement). Notre étude statistique nous indique qu'utiliser 64 souris est nécessaire et suffisant (Réduction). L'utilisation de souris rendues allergiques est indispensable pour valider le fait qu'une allergie peut protéger d'un cancer (Remplacement). A la fin de l'étude toutes les souris seront mises à mort selon une méthode réglementaire.

2011- Une allergie est une réaction exagérée du système immunitaire vis-à-vis d'un allergène qui peut être présent dans l'alimentation, dans l'air...en principe sans danger pour l'homme. Elle se présente sous différentes formes : digestives, cutanées, respiratoires.

Brièvement, la maladie allergique est divisée en 2 phases. Lors du premier contact avec un allergène, l'individu ne déclenche pas de réaction allergique mais produit des immunoglobulines (IgE) dirigées contre cet allergène. Ces IgE vont aller se fixer sur un mastocyte, une cellule contenant de nombreuses molécules, dont l'histamine. Lors du second contact avec cet allergène, l'allergène va être reconnu par les IgE fixées sur le mastocyte et ce dernier va relarguer son contenu induisant des symptômes cliniques.

Depuis le milieu des années 1950, de nombreuses publications mettent en évidence une association inverse entre allergie et cancer. Par exemple, une étude épidémiologique, réalisée aux Etats Unis en 2005, rapporte que les personnes atteintes d'asthme ou de rhinites allergiques ont un risque diminué de 20% de développer un cancer colorectal et 10% de développer tout autre type de cancer. Cette même étude révèle également que les personnes atteintes uniquement de rhinites allergiques développent moins de cancer du pancréas, et les personnes atteintes d'asthme développent moins de leucémie, de cancer du sein ou de cancer colo-rectal.

L'ensemble de ces données suggère que les IgE participeraient à l'immuno-surveillance de l'organisme, processus par lequel le système immunitaire détecterait et détruirait toute cellule tumorale nouvellement formée.

L'objectif de cette étude est de tester cette hypothèse en étudiant le potentiel protecteur des IgE contre le cancer du sein dans un modèle de souris allergiques à un lactosérum.

Pour cette étude 80 souris Balbc femelles âgées de 4 semaines au début du protocole seront utilisées et divisées en 9 groupes de 8 souris et 2 groupes de 4 souris. Elle sera composée de 2 phases, la seconde phase ne sera réalisée que si la première phase est concluante. Dans un premier temps, les souris seront sensibilisées au lactosérum et dans un second temps lorsque l'existence d'IgE contre ce produit sera confirmée, l'induction d'un cancer du sein sera effectuée et nous pourrons évaluer le pouvoir « protecteur » des IgE anti-lactosérum contre le cancer du sein. La présente étude nous permettra de déterminer la quantité optimale de cellules tumorales 4T1 à injecter. Une surveillance quotidienne des souris sera effectuée. Les souris seront hébergées par groupe de 8 dans des cages de polycarbonate adaptées. Les souris seront maintenues dans un cycle jour-nuit de 12 heures à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et une hygrométrie de $55 \pm 20\%$. Elles disposeront de nourriture et d'eau ad libitum.

Nos travaux portant sur le cancer du sein, nous n'utiliserons que des souris Balbc femelles. Chez cette souche de souris, l'injection de cellules 4T1 mime le cancer du sein humain (Raffinement). Notre étude statistique nous indique qu'utiliser 80 souris est nécessaire et suffisant (Réduction). L'utilisation de souris rendues allergiques est indispensable pour valider le fait qu'une allergie peut protéger d'un cancer (Remplacement). A la fin de l'étude, toutes les souris seront mises à mort selon une méthode réglementaire.

2012- La présente étude vise au développement d'un nouveau médicament pour le traitement préventif chez l'Homme de l'insuffisance hépatique post-hépatectomie. Il s'agit d'une situation pathologique fréquente (environ 10.000 cas/an en France) faisant suite à l'exérèse d'une partie du foie (par exemple pour métastases hépatiques de cancers digestifs), le foie restant n'étant pas suffisant pour assurer les fonctions vitales. Schématiquement 5%-20% des malades bénéficiant d'une hépatectomie décéderont en post-opératoire, le plus souvent des conséquences de l'insuffisance hépatocellulaire. Ce traitement vise à réduire cette mortalité en amorçant la régénération du foie avant même l'intervention chirurgicale.

Ce médicament repose sur l'administration par voie intravasculaire d'ADN d'un type nouveau. Les tests préliminaires réalisés sur des cellules hépatiques en culture ont confirmé l'activité. Une confirmation de l'efficacité du traitement, l'optimisation des séquences ADN qui seront utilisées chez l'Homme et l'évaluation de sa tolérance nécessitent maintenant que l'étude soit réalisée chez le rat (1150 animaux). Cette étape chez l'animal, indispensable et irremplaçable à la suite du développement, est par ailleurs requise par les Agences Réglementaires.

Le présent protocole a été conçu de manière séquentielle avec analyse des résultats pas-à-pas de manière à éviter le sacrifice inutile d'animaux. Les phases exploratoires pourront être interrompues prématurément en cas de mauvaise efficacité ou tolérance du traitement, dans le but de réduire le nombre d'animaux qui feront l'objet de cette étude. La souffrance des animaux sera réduite par une prise en charge de la douleur et anesthésie appropriée en cas d'intervention chirurgicale. Des critères d'interruption sont définis en cas de souffrance de l'animal estimé selon une grille prédéfinissant un point critique imposant le sacrifice de l'animal.

2013- 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 phosphodiesterases (PDEs). L'objectif général du projet est de tester l'hypothèse selon laquelle une augmentation de l'expression d'une phosphodiesterase de type 4 (PDE4B, 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 PDE4B 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.

2014- Parmi les voies de signalisation à l'échelle de la cellule, la signalisation Notch est décrite pour contrôler la différenciation cellulaire et le renouvellement des cellules souches. De ce fait, cette voie de signalisation s'avère capitale lors du développement embryonnaire et pour maintenir la stabilité des cellules et des tissus chez l'adulte. L'altération de la signalisation Notch est à l'origine de maladies génétiques, de pathologies non-congénitales, et est associée au développement de certains cancers. Des thérapies ciblant Notch sont donc potentiellement intéressantes, mais restent toutefois limitées du fait d'une action non-ciblée sur le tissu d'intérêt et d'une toxicité trop importante. Ainsi, le développement et/ou l'identification de régulateurs tissus-spécifiques de cette voie pourrait s'avérer particulièrement intéressant.

Par des approches sur différentes lignées de cellules, notre équipe a récemment découvert de nouveaux régulateurs de la voie Notch. Cependant, les modèles cellulaires utilisés ne permettent pas d'appréhender l'importance physiologique de ce niveau de régulation, ni sa spécificité de tissu. Par ailleurs, nous avons produit des souris déficientes pour l'un de ces nouveaux régulateurs, Tspan5. Le projet porte sur le rôle de Tspan5 dans le développement des cancers intestinaux. Pour répondre à ce projet, nous souhaitons promouvoir l'apparition de tumeurs colorectales de manière artificielle chez des souris, et observer l'impact de Tspan5 dans leur apparition et leur développement. L'induction tumorale sera effectuée par un protocole déjà bien décrit, le protocole dit AOM/DSS, qui repose sur l'utilisation d'un agent pro-cancéreux (l'azoxyméthane) et d'un agent pro-inflammatoire (le dextran sodium sulphate),

Le nombre estimé de souris nécessaire à la réalisation de ce projet est de 84, cette estimation répondant à la règle des trois R. En effet, en accord avec le principe de remplacement, la plupart des questions posées par notre projet sont adressées par des approches sur des lignées cellulaires. En termes de réduction, le nombre d'animaux nécessaires a été minimisé tout en étant suffisant pour permettre des analyses statistiquement pertinentes. Enfin, en adéquation avec la notion de raffinement, nous effectuons en premier lieu une expérience pilote sur des souris sauvages pour déterminer le temps optimal entre fin de traitement et sacrifice des animaux, ceci pour limiter dans la durée les souffrances induites par le traitement. De plus, un traitement antalgique leur sera administré dès l'apparition des signes de souffrance (100 µg de fentanyl par voie transcutanée, 1 fois/semaine, 2 doses maximum).

2015- Depuis quelques années, de nouvelles prothèses de jambe et de main directement pilotées par l'activité cérébrale sont développées. Ces prothèses promettent à des patients lourdement handicapés un contrôle fin et rapide des mouvements de leur prothèse, par exemple pour boire une tasse de café ou pour marcher de façon autonome.

Jusqu'à présent la recherche sur ces prothèses de nouvelle génération s'est concentrée sur les défis posés par la mesure de l'activité cérébrale et sa traduction en commandes de mouvement. De ce fait, la vue du patient est presque toujours le seul sens disponible durant l'apprentissage puis l'usage quotidien de ces prothèses. Cette situation est très limitante par rapport à celle offerte par un bras ou une jambe naturelle, dont la posture et les contacts avec le monde extérieur sont continuellement relayés vers le cerveau, cerveau qui peut ainsi déclencher, arrêter et corriger des mouvements de façon spatialement et temporellement fine. La fabrication de prothèses contrôlées directement par le cerveau et dotées de capteurs tactiles et proprioceptifs est donc un but important de la recherche sur les prothèses, mais malheureusement même les aspects les plus simples du traitement des informations proprioceptives et tactiles dans le contrôle de la prothèse ne sont pas compris.

Le but de notre programme de recherche est donc d'identifier la façon dont des informations tactiles et proprioceptives produites par la prothèse peuvent être traitées par le cerveau pour affiner son contrôle.

Ce projet s'appuiera sur le modèle souris car il nous donne accès à de nombreuses méthodes expérimentales qui lui sont spécifiques, en particulier les outils génétiques qui nous permettront de contrôler l'activité d'une petite zone du cerveau pour communiquer la posture de la prothèse et les contacts qu'elle a avec l'environnement. Deux types de souris seront potentiellement employés : soit des souris d'élevage standard, soit des souris dotées d'une modification génétique qui permet potentiellement une modulation plus efficace de l'activité du cerveau. Ces souris ne seront utilisées que si la première approche s'avère inefficace. Elles sont en bonne santé et se reproduisent normalement.

L'activité du cerveau des souris sera mesurée à l'aide d'une électrode et servira à contrôler la prothèse. Afin de réduire le nombre de souris utilisées dans le protocole, cette électrode sera du type multi-électrode, ce qui permet d'enregistrer dans une même souris jusqu'à 32 fois plus d'information qu'avec une électrode unique.

Pour limiter la souffrance de chaque souris, l'ensemble des procédures de mise en place du système d'interaction avec la prothèse sera effectué sous anesthésie générale suivie d'une récupération sous analgésie et antibiotiques.

Une fois équipées pour contrôler une prothèse, les souris seront entraînées à deux types de tâche comportementale : la première de déclenchement d'une action motrice en réponse à une information, et la seconde de correction d'un mouvement en cours en fonction d'une nouvelle information.

Pour prendre en compte les données acquises au cours des premières expériences, nous serons amenés à faire évoluer ces deux tâches pour les optimiser et les corriger, sans doute cinq fois chacune. À chaque évolution du protocole, le comportement devra être à nouveau testé sur environ 10 souris (x2 protocoles) pour que les résultats de population soient représentatifs. Après cette première phase de recherche, nous souhaitons reproduire les protocoles finaux sur 75 animaux (x2 protocoles) pour obtenir des conclusions solides.

Au total nous prévoyons donc d'utiliser au maximum 250 souris sur 5 ans. Cependant, l'équipement permettant d'interagir avec sa prothèse peut être employé plusieurs mois (nous proposons jusqu'à 2 mois d'entraînement) sur une même souris sans que cela induise de souffrance. Il sera donc possible, sous réserve d'autorisation du vétérinaire, de réduire le nombre de souris utilisées pour ces expériences en les entraînant successivement à plusieurs protocoles. Cela renforcera la réduction du nombre de souris rendu possible par l'utilisation d'un moyen moderne pour enregistrer l'activité cérébrale : la multi-électrode.

Pour limiter la souffrance des animaux, nous implanterons les animaux sous anesthésie générale, suivie d'une analgésie.

Enfin, pour diminuer l'inconfort des animaux, pendant toute l'expérience ils seront logés en groupe dans des cages enrichies placées dans un vivarium à cycle inversé permettant de respecter leur cycle d'activité jour/nuit naturel.

2016- La lipolyse correspond à une dégradation de la matière grasse laitière qui conduit à l'accumulation d'acides gras libres (AGL) dans le lait. Les AGL issus de cette dégradation provoquent l'apparition de goûts rance et butyrique. La plupart des consommateurs ne tolère pas la flaveur d'un lait dont la teneur en AGL est supérieure à 1,2 meq/100 g de matières grasses. Les laits qui présentent des taux de lipolyse élevés à leur arrivée en laiterie sont donc écartés de la chaîne de production. Cette non-valorisation du lait entraîne outre le gaspillage de matières premières, des pertes financières pour les entreprises.

Le taux de lipolyse est parallèlement devenu un critère de paiement du lait en Bretagne. Le lait doit contenir moins de 0,89 meq d'AGL pour 100 g de matières grasses. Au-dessus de cette valeur, le point de pénalité est de -3,049 € pour 1000 L.

La lipolyse du lait affecte donc à la fois l'aptitude à la valorisation du lait par le transformateur et le revenu de l'éleveur.

Depuis les années 2000, les industries laitières constatent de nouveau une augmentation des phénomènes de lipolyse dans les laits de collecte des élevages de bovins laitiers. Parfois, aucune cause n'est identifiée. Les intervenants en élevage peinent à conseiller les éleveurs pénalisés pour des niveaux de lipolyse trop élevés. Globalement, la filière manque de références récentes sur les facteurs de variations de la lipolyse du lait.

Des premiers essais indiquent que l'effet de la génétique de l'animal et l'alimentation sont des facteurs susceptibles d'influencer la lipolyse du lait de vache. Cet essai nous permet de travailler sur ces facteurs.

Nous allons travailler avec 32 vaches laitières pendant 11 semaines.

Nous veillons au respect de la règle des 3R : réduire, raffiner, remplacer. Le nombre minimum d'animaux nécessaire à la mise en évidence de différences entre les traitements est calculé. Les animaux sont maintenus dans un environnement adapté à leur besoin. Les indicateurs de souffrances de l'animal tel que la baisse de l'ingestion ou la perte de production laitière sont observés.

2017- Dans les sociétés industrialisées, les problèmes de fertilité humaine sont de plus en plus fréquents. Pour pallier à ce véritable problème sociétal, la médecine moderne dispose de traitements hormonaux qui stimulent l'ovulation chez la femme. Au cours du traitement, les patientes reçoivent des doses massives d'hormones. Certaines d'entre elles sont réfractaires et doivent subir plusieurs traitements successifs permettant de définir pour chacune d'elle « au cas par cas » le dosage approprié capable d'induire une bonne maturation folliculaire. L'autre point délicat du traitement est l'étroitesse du champ d'action entre une bonne stimulation ovarienne et un risque d'hyperstimulation. Nous développons une solution alternative aux traitements hormonaux d'induction de l'ovulation chez la femme. Le but de cette étude est de tester un nouveau traitement d'induction de l'ovulation chez le primate non-humain le singe *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*), modèle proche de la femme. Pour cela, 12 animaux naïfs seront inclus dans le protocole, à raison de 3 animaux par lot. Le nombre d'animaux est faible pour des raisons éthiques, mais sera suffisant pour observer les effets souhaités. Le nouveau traitement sera comparé aux traitements d'induction de l'ovulation classiquement utilisés chez la femme. Ce travail ne peut être fait sur un modèle cellulaire ou ex-vivo car aucun modèle de ce genre n'est actuellement disponible pour l'étude de la fonction de reproduction. De même aucun autre modèle animal ne peut être utilisé car le traitement est destiné à être utilisé chez la femme : le singe *cynomolgus* est l'espèce réglementaire pour ce genre d'étude. Nous avons limité le nombre d'animaux (3 animaux par lot) et raffiné nos procédures (prise de sang sous anesthésie, procédure d'imagerie non invasive). Le système d'élevage ne sera pas modifié et il y aura un enrichissement social (hébergement en groupe, surface suffisante par animal, présence de jouets).

2018- L'amélioration de la robustesse et des capacités adaptatives des porcs aux conditions d'élevage sont des enjeux incontournables pour la durabilité de l'élevage. Les animaux très productifs sont souvent considérés comme plus susceptibles

de développer des maladies car moins adaptables, et donc moins robustes. Deux mécanismes seraient impliqués dans cette moindre robustesse. Le premier est celui d'une contre sélection sur l'immunité ayant conduit à une moindre résistance vis-à-vis des pathogènes. Le second est une moindre tolérance des porcs aux aléas de l'environnement comme la survenue d'évènements sanitaires. Ce second mécanisme inclut les modifications métaboliques induites par une infection ou un stress. La moindre tolérance des animaux très productifs serait liée à l'incapacité des animaux à allouer suffisamment de ressources nutritionnelles aux fonctions de santé, cette allocation se faisant en priorité vers la croissance. Chez le porc, quelques études ont tenté d'explorer les conséquences de la sélection génétique sur des paramètres de la réponse immunitaire. Aucune n'a pour le moment directement exploré les conséquences de la sélection génétique sur la répartition des nutriments entre fonctions impliquées dans la santé et la croissance chez le porc. Le projet décrit ici ambitionne d'apporter des connaissances nouvelles sur la place des métabolismes et de la répartition des nutriments entre fonctions dans les capacités d'adaptation des porcs à un stress immunitaire et inflammatoire engendré par la dégradation de l'hygiène de l'environnement d'élevage. Les connaissances acquises sur l'utilisation et la partition des nutriments en réponses à diverses contraintes et pratiques d'élevage (pression sanitaire, sélection génétique) permettront 1/ d'établir si des porcs sélectionnés sur l'efficacité alimentaire sont ou non moins aptes à répondre à un challenge inflammatoire ; 2/ de déterminer si le métabolisme de nutriments est impliqué dans ces différences. A terme, les résultats pourraient permettre de mieux raisonner les pratiques alimentaires, vers une alimentation respectueuse des capacités d'adaptation des animaux et adapté aux besoins nutritionnels individuels (alimentation de précision). Le projet est réalisé dans le cadre d'un projet européen traitant des maladies de production des porcs et volailles. L'expérimentation sera conduite sur 160 porcs en croissance de 30 kg (environ 2 mois d'âge) jusqu'au poids commercial d'abattage (115 kg à environ 6 mois d'âge) et portera sur la caractérisation des réponses zootechniques, physiologiques et métaboliques de deux lignées divergentes de porcs sélectionnés sur l'efficacité alimentaire et soumis ou non à un stress inflammatoire pendant 6 semaines. Le stress inflammatoire consiste à élever les porcs dans des conditions d'hygiène dégradée, ce stress générant une réponse inflammatoire d'intensité modérée, et induisant un ralentissement de la croissance ainsi que des modifications métaboliques. Le dispositif expérimental permettra de comparer 4 lots de 40 porcs : lignée efficace soumise au stress inflammatoire (1) ou non (2) et lignée peu efficace soumise au stress inflammatoire (3) ou non (4). Pendant toute la durée de l'essai, les porcs seront élevés en loge individuelle afin de suivre la consommation individuelle. Des prises de sang ponctuelles (toutes les 3 semaines) ainsi que des prises de salive sur l'ensemble des porcs permettront des mesures d'indicateurs immunitaires et métaboliques. Un sous-effectif de porcs seront équipés, sous anesthésie générale, d'un dispositif de prélèvement de sang non permanent à l'oreille permettant des prélèvements sériés sans douleur afin d'évaluer le statut métabolique des animaux après un repas. L'ensemble des porcs sera abattu, autopsié et des prélèvements d'organes seront effectués pour des analyses immunitaires et métaboliques. Dans le respect de la règle des 3 R, les effectifs d'animaux utilisés ont été établis sur la base d'expériences précédentes réalisées sur le même modèle de dégradation de l'hygiène (Réduction). L'approche mise en place et visant à étudier les réponses physiologiques complexes des porcs à une conditions d'élevage ne peut être reproduite sur des modèles cellulaires (Remplacement). Le projet portant sur la santé des porcs, les animaux feront l'objet d'une surveillance particulière par du personnel qualifié et expérimenté. Ce projet permet d'agréger une multitude de compétences scientifiques permettant d'appréhender plusieurs dimensions des réponses des animaux (du gène à la zootechnie) et bénéficiera de compétences en intégration des données et modélisation permettant une exploitation optimale des données obtenues (Raffinement).

2019- L'ostéomyélite est une infection osseuse d'origine bactérienne caractérisée par une réponse inflammatoire aigüe ou chronique menant à une perte osseuse. *Staphylococcus aureus* est, dans à 60% des cas, la bactérie responsable avec un taux de résistance à la méticilline en constante augmentation. Ces infections nécessitent des traitements longs et des actes chirurgicaux afin de retirer les tissus nécrosés.

Le problème est d'autant plus compliqué lorsque l'infection est due à des bactéries persistantes. Ce phénomène, différent de la résistance bactérienne due à des mutations génétiques, montre que sur une même population bactérienne, une partie sera détruite par l'agent anti-infectieux tandis que l'autre partie des bactéries va cesser de se multiplier, restant simplement à l'intérieur de la cellule. Ces bactéries persistantes peuvent toutefois se retransformer en agent infectieux à croissance rapide, provoquant une rechute dès l'arrêt de l'antibiotique.

La vancomycine, la daptomycine, la rifampicine et le linézolide sont les antibiotiques les plus prescrits dans les infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM).

Le but de cette étude serait donc, à l'aide d'un modèle animal murin d'ostéomyélite à *S. aureus*, d'évaluer l'efficacité des agents anti-SARM de référence sur un couple de bactéries persistantes. Cela nous permettrait d'obtenir un modèle reproductible sur petits animaux pour la recherche de nouvelles pistes thérapeutiques.

Ce travail s'effectuera en plusieurs temps.

Le modèle sera en premier lieu validé avec deux souches de SARM responsables d'une infection initiale, puis récidivante, et isolées chez un même patient. L'objectif sera de comparer leur capacité respective à induire une ostéomyélite chez la souris à J7 et J14.

Après exposition du fémur droit de la souris sous anesthésie générale, un défaut osseux de 1mm de diamètre est réalisé par trépanation. L'infection est ensuite induite par injection dans le canal intramédullaire de 2µL de suspension bactérienne. Sept jours et quatorze jours après infection, les animaux seront euthanasiés et le fémur et la rate seront prélevés. Afin de déterminer les charges bactériennes, des numérations seront réalisées sur les rates et une partie des os, les autres étant destinés à des analyses histologiques.

La deuxième phase consistera à évaluer et comparer l'efficacité thérapeutique in vivo des agents anti-infectieux de référence (rifampicine, vancomycine, linézolide et daptomycine) dans le modèle murin à *S. aureus* préalablement validé. Après numération des bactéries survivantes dans la rate et dans le tissu osseux, les résultats obtenus pour les différents groupes seront comparés par un test statistique approprié.

Afin de mener à bien ce projet, un nombre de 688 souris sera nécessaire. La souche de souris utilisée pour l'ensemble de l'étude dépendra des résultats obtenus lors de la première phase. En effet, d'une souche à une autre, les résultats de l'induction bactérienne peuvent diverger énormément. Le modèle d'intérêt dans ce projet serait sur la souris Swiss mais certains essais seront également réalisés sur souris C57BL/6Jrj avant de choisir définitivement le fond génétique. Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable et reproductible. Enfin le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude et des points limites seront mis en place.

2020- En 2010, les maladies cardiovasculaires causèrent 16 millions de décès à travers le monde (Data OMS), soit 29.5% de la mortalité. Ce morbide fardeau persiste car le besoin médical cardiovasculaire n'est pas intégralement couvert par les thérapeutiques disponibles à ce jour, de nouvelles approches sont nécessaires.

Ce projet a pour objectif de sélectionner parmi les composés synthétisés par les chimistes, ceux qui allieront les plus grandes efficacités et sécurité. Le cœur et les vaisseaux étant le centre d'un système dynamique qui délivre le sang à tous les organes d'un Homme, la recherche et l'essai de nouveaux composés ne peuvent se passer de cet aspect dynamique uniquement présent et comparable chez les mammifères supérieurs. Après une phase de sélections et de tri des composés in vitro, les composés les plus actifs sont évalués des porcs. L'objet de ce projet est la sélection et la caractérisation des candidats médicaments sur le porc. Nous procéderons en trois étapes ; en premier lieu nous évaluerons les composés sur des animaux sains à partir de paramètres simples de télémétrie, puis dans un second temps nous évaluerons les composés avec des explorations plus poussées au cours d'une expérience unique à l'état anesthésié (par ex, exploration pression-volume), et enfin nous testerons les meilleurs candidats-médicaments issus des deux premières étapes sur des animaux engagés dans un processus de modélisation des pathologies cardiovasculaires. Les modèles animaux de pathologies cardiovasculaires pourront être obtenus par l'administration de produits délétères ou par intervention chirurgicale. Les modèles utilisés sont reproduits de la littérature.

Ces tests sur les animaux interviennent après une phase de sélection in vitro des composés qui réduise de nombreuses étapes d'expérimentation in vivo par des modèles cellulaires assurant la réduction du nombre d'animaux utilisés au strict minimum. L'utilisation d'animaux pathologiques est la dernière étape du processus qui ne concernera que 20% des animaux utilisés, dans le souci du bien-être animal et de pertinence clinique des modèles, il conviendra de réduire le stress, la douleur et l'inconfort des animaux en leur pourvoyant les antalgiques et les ménagements similaires à ceux que reçoivent les patients souffrant de maladies cardiovasculaires.

Dans le cadre de notre projet de recherche de nouveaux composés visant à traiter les maladies cardiovasculaires, nous prévoyons d'utiliser au maximum 1000 porcs sur 5 ans, qui regrouperont 800 animaux sains, utilisés pour les caractérisations primaires, 150 animaux modèles d'insuffisance cardiaque et 50 animaux pour les prélèvements de cardiomyocytes

2021- La cornée est un tissu transparent à l'avant de l'œil. Dans certaines pathologies des vaisseaux sanguins envahissent de façon anormale l'intérieur de la cornée claire. Ce phénomène appelé « néovascularisation cornéenne », est un problème majeur de santé publique, la perte de la transparence de la cornée empêche une vision correcte et peut conduire à la cécité, aux États-Unis l'incidence serait de 1,4 millions de patients par an. Les origines sont multiples : maladies héréditaires, séquelles de traumatismes ou de brûlures, complications d'infections virales ou bactériennes, suites des greffes de cornées, port prolongé de lentilles de contact. Les traitements ciblent la régression des vaisseaux par application de produits anti-inflammatoires, coagulation des vaisseaux par laser ophtalmique, ou transplantation de membrane amniotique, les traitements ne sont pas toujours efficaces et les effets secondaires ne sont pas à négliger : augmentation de la pression intra oculaire, apparitions de cataracte (opacification du cristallin, autre structure de l'œil dont la transparence est capitale pour la vision). Les récents traitements visent les facteurs directement impliqués dans la formation des nouveaux vaisseaux au niveau moléculaire.

L'objectif du projet est la mise en place au sein de l'établissement utilisateur d'un modèle expérimental de néovascularisation cornéenne chez le lapin et les rongeurs afin de participer au développement de nouvelles thérapies pour cette pathologie. Le principe est d'induire sur un seul œil, la prolifération de vaisseaux suite à une lésion. En raison des particularités physiologiques et anatomiques de l'œil et l'absence pour l'instant de modèle alternatif pour ce type de projet, nous aurons recours à des animaux adultes, des lapins et des rongeurs pour établir notre modèle. Les informations bibliographiques recueillies, les analyses statistiques ainsi que notre expérience nous permettrons de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés. Pour ce projet, d'une durée de 5 ans, un nombre maximum de 1225 lapins de 8 à 12 semaines, 1225 rats et 1225 souris de 5 à 7 semaine à l'arrivée dans notre animalerie, est envisagé afin de valider les efficacités des traitements.

Afin de minimiser l'impact sur le bien-être des animaux, un suivi quotidien sera effectué et des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter une éventuelle douleur ou souffrance à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet ainsi qu'un enrichissement des cages d'hébergement seront mis en place.

2022- L'imagerie médicale est un domaine en plein développement. Les toutes nouvelles technologies de tomographie optique couplant l'émission de photon à des images Rayon-X, et n'imposant pas l'administration préalable de produits radioactifs, pourraient présenter une valeur ajoutée à la prise en charge diagnostique et thérapeutique des patients.

Ce projet vise à développer ces approches d'imagerie optique non invasive chez le rongeur anesthésié afin de développer des biomarqueurs d'imagerie et de découvrir de nouvelles thérapies transposables à l'homme. Des traceurs et des sondes d'imagerie très diverses seront administrés à l'animal afin de réaliser des images caractérisant selon les besoins :

- Le devenir d'un composé pharmacologique chez le Rongeur, en observant la cinétique d'un fluorochrome associé à cet élément.

- L'expression d'un gène bioluminescent (émettant de la lumière).

- Le potentiel in vivo d'un bio-matériel ou d'un hydrogel-composite synthétique

- Un Système de délivrance de composés (petites molécules, peptides, SiRNA) in-situ

- Un Support mécanique et /ou nourricier de la régénération cellulaire et tissulaire

Ces études permettront de mieux comprendre certaines pathologies, de proposer de nouveaux biomarqueurs, et des approches thérapeutiques innovantes pour ces maladies.

Ces études par imagerie in vivo réalisées en conditions d'anesthésie, permettent des approches longitudinales chez les mêmes animaux, et concourent au respect des consignes éthiques de réduction et de raffinement dans les approches expérimentales

Ce projet couvre l'utilisation d'au maximum 640 rats et 1600 souris pour 5 ans. Ces études réalisées au sein du centre de recherche sont encadrées par des recommandations internes, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (hébergement, soins, manipulation, expérimentations), et ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal. Un support en biostatistiques est apporté par des experts de la spécialité, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées, et réduire le nombre d'animaux utilisés. Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact l'animal, et à l'observation des signes cliniques fondamentaux

2023- Le présent projet vise à déterminer si un composé agissant sur le stress oxydatif, peut modifier le métabolisme du glucose. La régulation intégrée de la glycémie impliquant plusieurs organes à la fois (notamment, cerveau, foie, pancréas), l'investigation de ce composé sur la glycémie et le diabète de type 2 nécessite l'utilisation de modèles animaux in vivo, ce qui exclut l'application stricte de la règle N°3 des 3 R (= Remplacer).

Pour garantir des résultats valides sur le plan statistique, 6 animaux par traitement seront systématiquement prévus. Ce nombre d'animaux réduit à son minimum possible en suivant la règle N°1 des 3 R (= Réduire). L'ensemble de ce projet conduira à implication d'un total de 108 souris.

Le protocole suit la règle N°2 des 3 R (= Raffiner) par un suivi de la masse corporelle et du comportement des animaux basé sur les critères d'interruption suivants :

- perte de masse rapide, supérieure à 20% de la valeur initiale.

- prostration, poil hérissé, et/ou signes de malaise général.

- Glycémie supérieure à 10 g/L chez les souris diabétiques (db/db).

Lors du test de sensibilité à l'insuline, tout animal dont la glycémie descend en dessous du seuil de 40 mg/dL recevra une injection intra-péritonéale de solution sucrée (1 g de glucose par kg) et sera exclu du test.

2024- Le virus de la bursite infectieuse aviaire (IBDV) est le principal virus immunodépresseur chez le poulet (*Gallus gallus*). Il détruit les lymphocytes B (Cellules du système immunitaire, responsables des réactions de défense de l'organisme contre les substances qu'il considère comme étrangères) de la Bourse de Fabricius (BdF, organe producteur des lymphocytes B chez les oiseaux) qui en temps normal produisent les anticorps protégeant les animaux des infections microbiennes.

Les signes cliniques de la maladie, dite bursite infectieuse aviaire ou maladie de Gumboro, sont durant la phase précoce : anorexie, plumes ébouriffées, dépression, diarrhée suivies d'une prostration de l'animal. La mortalité varie de 0 à 60 % suivant la virulence de la souche. Durant la phase chronique de la maladie, les sujets survivants, du fait de la destruction de leurs lymphocytes B par le virus, sont immunodéprimés et développent des infections secondaires aux manifestations cliniques variables.

L'objectif du projet est de produire un stock de souches d'IBDV et de sérums immuns nécessaires aux travaux du laboratoire sur cette maladie. Les souches d'IBDV virulentes ne sont pas cultivables in vitro. La seule méthode possible pour constituer des stocks viraux à partir de ces souches et les étudier plus avant est donc la propagation in vivo par infection de poulets exempts d'organismes pathogènes spécifiques. Ce protocole standardisé est réalisé en conditions confinées. Il prévoit une euthanasie des poulets avec récolte des BdF où est concentré le virus, dès le déclenchement des signes cliniques, entre 3-4 jours post-infection (jpi). Un point-limite basé sur l'intensité des signes cliniques de la maladie est défini : au-delà de ce point limite, une euthanasie compassionnelle sera pratiquée. Les effectifs des animaux sont limités au minimum permettant de produire le volume de stock viral nécessaire aux besoins du laboratoire, ce qui correspond à un nombre maximal de 1450 animaux pour une durée de 5 ans. Dans certains cas, les poulets, les moins affectés cliniquement, peuvent être maintenus jusqu'à 49 jpi avec jusque deux rappels d'inoculation à 21jpi et 35 jpi afin de collecter un sérum post-infectieux.

2025- Des études récentes menées aux USA, en Chine et en France ont conduit à l'identification d'un virus grippal d'un nouveau genre parmi les virus influenza. Les bovins semblent être l'hôte privilégié du virus influenza de type D (IDV), mais il a également été détecté chez le porc aux USA. Des études expérimentales ont en outre montré qu'il peut se répliquer chez le furet et le cochon d'Inde (modèles animaux utilisés pour l'étude des infections grippales chez l'Homme), ce qui évoque un

potentiel zoonotique (capacité du pathogène à passer de l'animal à l'Homme et inversement). Enfin, quelques études sérologiques ont conduit à la détection d'anticorps spécifiques dans des populations bovines, porcines et humaines. Dans le cadre de projets de recherche visant à mieux évaluer le spectre d'hôte de ce virus et d'étudier les transmissions inter-espèces possibles, il est nécessaire de disposer de réactifs de référence pour la mise en œuvre des analyses virologiques et sérologiques ad hoc. L'essai expérimental proposé ici a pour objectif de vérifier la capacité d'un IDV d'origine bovine à se multiplier chez le porc Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiés (EOPS), d'étudier la cinétique d'excrétion virale, de disposer d'un IDV s'étant multiplié chez le porc, de suivre la cinétique de séroconversion et de produire des sérums hyperimmuns. Les expérimentations seront conduites dans le respect de l'éthique et du bien-être des animaux. En particulier, le nombre de porcs utilisés sera ici limité à 3, nombre nécessaire mais suffisant pour répondre aux objectifs annoncés. Les animaux seront surveillés quotidiennement. Les virus isolés des porcs inoculés et les prélèvements biologiques positifs obtenus permettront de valider les méthodes de diagnostic et ainsi de mettre en œuvre des investigations visant à évaluer la circulation de ce virus chez le porc domestique en France. Cet essai fournira également des informations et des données pour la mise au point ultérieure d'un modèle expérimental d'infection du porc par l'IDV aux fins de reproduction de l'infection naturelle. Le cas échéant, ce modèle permettra ensuite d'étudier l'implication de l'IDV dans le complexe respiratoire porcin.

2026- Les modèles murins génétiquement modifiés sont indispensables pour l'étude de
-la régulation et fonction de gènes,
-rôle d'un gène dans la formation de tumeur
-l'obtention de modèles pouvant être utilisés pour des tests thérapeutiques

Après une première étape d'analyse *in vitro*, le recours à la souris génétiquement modifiée permet de comprendre les mécanismes sous-jacents au niveau d'un organisme entier. Notre projet consiste à développer de nouvelles lignées murines pour permettre aux chercheurs d'avoir les outils les plus adaptés à leurs études. Bien évidemment, les lignées ne sont créées que si elles présentent un intérêt biologique potentiel et si elles n'existent pas par ailleurs dans d'autres établissements de recherche. Notre expertise nous permet d'avoir d'excellents résultats et donc de minimiser le nombre d'animaux nécessaires.

Nous prévoyons pour l'année à venir d'utiliser 1240 souris.

Dans un souci de raffinement, toutes les mesures seront prises pour éviter le stress et la douleur des animaux. Ainsi, les gestes techniques sont assurés par du personnel qualifié, avec un recours à l'analgésie lors des procédures chirurgicales.

2027- Contexte et objectifs. *Trichomonas vaginalis* est un parasite responsable d'infection sexuellement transmissible chez l'Homme. Les conséquences de l'infection sont importantes, elles favorisent la transmission du VIH, provoquent des vaginites et nuisent à un développement harmonieux de l'enfant à naître. Les médicaments trichomonacides (5-nitroimidazole) ne peuvent pas être administrés par voie générale à la femme enceinte. Nous développons de nouvelles formulations trichomonacides à administrer localement (ii) Résultats attendus. Cet hydrogel est thermosensible. Il présente la propriété d'être à l'état liquide à température ambiante, facilitant ainsi son administration, et à l'état gel après son administration (à 37°C). Ainsi, cet hydrogel sera capable de tapisser les muqueuses colonisées pour assurer une libération prolongée dans le temps des principes actifs. Tous les traitements qui seront essayés ont montré une efficacité *in vitro* sur la même souche. Le vagin est un organe dont les fluides sont en perpétuel renouvellement. Le développement de l'infection vaginale est une somme de processus physiopathologiques complexes découlant d'interactions vasculaires, tissulaires, cellulaires et moléculaires formant de nombreuses barrières pharmacologiques. Le recours à l'animal est indispensable pour évaluer l'activité de nouvelles formulations médicamenteuse. Il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* capable de reproduire la complexité de ce processus. Seule une expérimentation *in vivo* nous permettra de déterminer quelles formulations sont susceptibles d'un développement ultérieur. Les souris sont prémédiquées par un traitement hormonal pour permettre l'implantation vaginale d'une souche de parasite humain. A J1 les souris sont infectées, elles sont traitées à J2 et J3. L'efficacité des traitements effectués se fait par numération des parasites à J4. L'efficacité thérapeutique se mesure en comptant les parasites intravaginaux chez les souris traitées et en comparant le nombre obtenu à celui obtenu chez les souris témoins non traitées. 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.

Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. 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.

212 souris seront employées pour ces essais.

2028- En France comme dans beaucoup d'autres nations, les recherches sur les perturbations cognitives au cours du vieillissement sont considérées comme une priorité à cause du vieillissement de la population. Le vieillissement normal est caractérisé par un déclin progressif des capacités mentales qui touche plus particulièrement certaines formes de mémoire, dont la mémoire spatiale et la mémoire des événements (mémoire épisodique) qui nous permettent de réaliser bon nombre de nos activités quotidiennes. La fonction de séparation de pattern (SP) est indispensable à la mémoire des détails et donc au bon fonctionnement de la mémoire épisodique. Le test de SP est l'un des tests cognitifs les plus sensibles au vieillissement normal. Chez l'Homme, ces déficits apparaissent très tôt et sont corrélés à des perturbations d'activité dans une région de la formation hippocampique, le gyrus denté. Des études chez l'Animal suggèrent que la fonction de SP dépend des très jeunes

neurones qui sont produits dans le gyrus denté grâce à la neurogénèse adulte. Le but de notre projet est de favoriser la production et/ou la maturation de ces jeunes neurones pour favoriser la fonction de SP chez la Souris âgée. Or des travaux récents suggèrent que l'administration répétée d'un composé naturellement présent dans le cerveau, la D-serine, présente de telles propriétés grâce à son action positive sur l'activité du récepteur glutamatergique N-méthyl-D-aspartate (récepteur excitateur du cerveau). L'efficacité de la D-serine sur les performances de SP sera évaluée chez des souris jeunes et âgées en variant la période d'administration de la D-serine pour stimuler la production, la survie ou l'activation des jeunes neurones pendant le test.

Règle des 3 R : Raffinement. Leurs performances de SP seront évaluées dans un test basé sur l'exploration d'un objet que l'on a plus ou moins discrètement éloigné de sa position initiale. Le même principe est utilisé dans les tâches de SP sur un écran d'ordinateur pour l'Homme. Même si notre objectif est surtout d'améliorer les performances des animaux âgés, nous étudierons aussi les effets du composé chez des souris jeunes afin caractériser les effets bénéfiques de la D-serine sur ces deux populations. En dehors de la période de test, les souris sont maintenues en groupes de 2 à 4 et reçoivent du matériel à manipuler pour construire leur nid. Les injections sont réalisées avec des volumes faibles et des petites seringues adaptées à la Souris. Réduction : Le nombre total de souris, 210, a été réduit au strict nécessaire (maximum 12 par groupe final) pour permettre des analyses statistiques fiables sur les souris âgées car le vieillissement normal, chez l'Homme comme chez l'Animal, se caractérise par une grande dispersion des performances de mémoire. Remplacement : L'évaluation des performances de mémoire ne peut se faire que chez un animal dans un test comportemental. A ce jour, les modèles in vitro et les modèles computationnels sont élaborés sur une partie des structures cérébrales impliquées dans la mémoire et ne peuvent pas rendre compte de la complexité des fonctions impliquées dans les performances cognitives d'un individu.

2029- Nos projets visent à étudier l'efficacité de nouveaux traitements anticancéreux dans des cancers du rein qui présentent soit une insensibilité soit ayant acquis des résistances aux thérapies conventionnelles et indiqués dans le cancer du rein. Le cancer du rein à cellules claires a comme principale caractéristique d'être incurable et fortement métastatique.

En plus d'étudier l'efficacité de nouveaux traitements, nous tâcherons de déterminer de nouveaux marqueurs prédictifs de la réponse aux traitements de référence. Nous déterminerons également si ces marqueurs peuvent être considérés comme de nouvelles cibles thérapeutiques.

Le but final est de proposer des méthodes rapides de détection de la perte d'efficacité d'un traitement et donc une réactivité interventionnelle lorsque plusieurs lignes thérapeutiques ont une AMM. Notre but est également de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour répondre aux besoins des patients atteints de cancer du rein. Pour ce faire, nous réaliserons différentes études de régression tumorale chez la souris nude.

La procédure 1 a pour but de confirmer que l'inhibition de plk1 par un agent pharmacologique, le volasertib, induit une régression tumorale, et ceci afin de pouvoir à terme proposer cette alternative de traitement aux patients atteints de cancer du rein résistants au traitement de référence, le sunitinib, un traitement inhibant la vascularisation tumorale.

Les procédures 2 et 3 ont pour but de déterminer le rôle des protéines VEGFC, NRP2 et TTP dans les mécanismes de résistance s'établissant au cours du traitement par sunitinib dans les patients atteints de cancer du rein. Cette partie a pour objectif d'apporter une connaissance fondamentale du mécanisme de résistance et de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques.

D'un point de vue éthique et conformément aux exigences de remplacement, réduction et raffinement, les expériences sur les animaux ont été précédées de nombreuses expériences réalisées sur des lignées cellulaires. Ces mises au point in vitro nous permettent de diminuer le nombre d'animaux à utiliser dans les expériences in vivo. De plus, une grande importance sera accordée au bien-être des animaux avec un suivi régulier, par un personnel formé à l'expérimentation animale, afin de détecter tout signe de détresse et/ou de souffrance suite à l'injection des cellules en sous cutanée mais aussi suite à l'administration des différents traitements. Si de tels signes devaient apparaître, les mesures nécessaires seront prises grâce à l'application des points limites clairement définis. Conformément aux recommandations en vigueur, nos souris bénéficient d'un milieu enrichi et l'ensemble des manipulateurs est dument qualifié et diplômé dans le domaine de l'expérimentation animale.

En vue de futures applications cliniques qui exigent la démonstration d'efficacité de traitement sur au moins un modèle animal, ces études in vivo sont nécessaires et non contournables.

Nous utiliserons pour ce projet un total de 200 souris nude.

Ces souris sont immunodéficientes ce qui permet de réaliser des xénogreffes de cellules humaines dans un modèle murin sans rejet par le système immunitaire. Elles constituent donc le meilleur modèle pour des études de croissance tumorale à partir de xénogreffes de cellules humaines. Ce modèle animal est couramment utilisé dans le monde et a été beaucoup utilisé par l'équipe. Ces points majeurs nous permettent de réduire le plus possible le nombre d'animaux nécessaires pour nos études dans la mesure de la significativité statistique.

2030- La mesure de l'oxygénation tumorale est un élément clé à prendre en compte dans le choix d'une thérapie. Nous développons des nanosenseurs d'oxygénation qui permettront d'accéder à ce paramètre clé lors d'examen par Imagerie par Résonance Magnétique classiquement réalisés lors du processus diagnostic. De plus ces nanosenseurs peuvent se voir conférer une activité thérapeutique par addition de molécules. Le projet faisant l'objet de cette demande d'autorisation est donc dédié à l'évaluation chez le rongeur de ces nanoplateformes théranostiques. Un maximum de 279 rats pourra être inclus dans ce projet pour répondre aux problématiques explorées. Ce nombre d'animaux a été réduit au maximum pour que les résultats obtenus soit exploitables et non critiquables. Des points limites liés au comportement de l'animal (état général et

masse de l'animal) et à la taille de la tumeur ont été fixés et les animaux les atteignant seront euthanasiés. Ce projet s'inscrit dans une démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale en respectant la « règle des 3R ».

2031- Les glioblastomes (GBM) demeurent des tumeurs très agressives. En effet, malgré une thérapie agressive associant la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie, la médiane de survie des patients n'excède pas 15 mois. L'hypoxie, une des caractéristiques physiopathologiques des GBM, est connue pour stimuler la croissance tumorale mais également pour induire des résistances aux thérapies conventionnelles, ce qui expliquerait la faible survie des patients.

Les GBM sont également décrits comme étant des tumeurs très inflammatoires dont les macrophages (MΦ), les premiers effecteurs du système immunitaire, représentent la plus abondante population de cellules inflammatoires présentes dans la tumeur. Il a ainsi été montré que les MΦ s'accumulaient au niveau tumoral et qu'ils pourraient se polariser en un phénotype M1 (anti-tumoral) ou M2 (pro-tumoral). A présent, il semble que les MΦ, retrouvés chez les patients atteints de GBM, soient préférentiellement de phénotype M2 et seraient associés à un mauvais pronostic. Cependant, les facteurs responsables de leur migration et de leur polarisation dans les GBM ne sont pas encore identifiés.

L'hypoxie étant associée à une agressivité tumorale, nous nous interrogerons, dans une première partie, si elle pourrait intervenir dans l'orientation de l'inflammation vers un phénotype M2. De plus, il a été montré que la radiothérapie pourrait elle-même induire des changements d'oxygénation de la tumeur. Des études ont en effet montré que celle-ci induisait un recrutement de cellules macrophagiques au niveau tumoral et c'est pourquoi nous nous sommes également intéressés aux effets de la radiothérapie sur la migration et la polarisation des MΦ au niveau des GBM.

A ce titre, mieux comprendre le contexte inflammatoire des GBM permettrait d'améliorer la prise en charge des patients, notamment en essayant de bloquer l'inflammation pro-tumorale. Ainsi dans une seconde partie, nous avons cherché de nouvelles approches thérapeutiques liées aux MΦ.

Dans un souci constant de respecter la règle des 3R, nous avons construit ce projet de recherche autour d'expériences absolument indispensables sur la base de calculs de puissance statistique. Pour les animaux avec suivi de croissance tumorale, l'utilisation de l'imagerie IRM permet de suivre très précisément la croissance tumorale et ainsi d'arrêter les expériences sur des critères quantitatifs de volume tumoral avant d'atteindre les points limites. Ces études seront réalisées sur 776 souris (696 souris Nude mâles (dont 516 pour la préparation de MΦ) et 80 souris NOD-SCID mâles).

2032- L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe notamment des médicaments ayant un intérêt thérapeutique dans le domaine de l'inflammation chronique de l'intestin (maladie de Crohn). Le principal objectif de l'étude est d'évaluer les effets d'un traitement chronique par 2 composés (la dénomination des composés est sujette à confidentialité) sur un modèle d'inflammation colique chez le rat. Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de détailler l'efficacité et les mécanismes d'action de leurs composés.

Le modèle d'inflammation colique qui sera utilisé est un modèle d'inflammation induite par une instillation annale unique de TNBS (2,4,6-TriNitroBenzeneSulfonic acid). Les composés à tester seront administrés par voie orale pendant les 7 jours suivant l'instillation de TNBS. Le poids corporel et la prise alimentaire des animaux seront mesurés tous les jours pendant toute la phase de traitement. Le jour de la dernière administration du composé, un prélèvement de fèces sera réalisé (pour analyse de biomarqueurs). Les animaux seront ensuite anesthésiés et un prélèvement sanguin par ponction cardiaque sera pratiqué. Après euthanasie, le côlon sera prélevé, mesuré et pesé. Une analyse histologique macroscopique sera réalisée sur une portion du côlon par deux expérimentateurs afin de quantifier les zones d'épaississement, d'hyperhémie et d'ulcération de la muqueuse.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- Raffinement: Le modèle animal utilisé est un modèle d'inflammation colique induite par le TNBS chez le rat, qui est un modèle particulièrement bien caractérisé dans la littérature. En particulier, ce modèle présente une inflammation colique aux caractéristiques proches de celles observée chez les patients humains atteints de la maladie de Crohn. Le protocole sera planifié de façon à limiter au maximum tout stress induit aux animaux (périodes d'acclimatation et d'habituation des animaux aux procédures d'administration) et à établir des points limites appropriés.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de résultats préliminaires obtenus lors d'études antérieures utilisant le même modèle. Le nombre de 10 animaux par groupe a été défini comme le nombre d'animaux à utiliser pour pouvoir mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés. Un total de 50 rats Wistar sera utilisé, divisé en 5 groupes de 10 animaux :

deux groupes contrôle négatif (Non TNBS-véhicule ; TNBS- véhicule), un groupe contrôle positif (TNBS-composé de référence) et 2 groupes traités respectivement avec l'un des 2 composés à tester (TNBS-Composé).

- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un traitement sur l'inflammation colique.

2033- Nous avons montré, par de nombreuses expériences in vitro, qu'un composé de synthèse, le mannodendrimère Gc3Tri, est doué de propriétés anti-inflammatoires. Cet effet a été confirmé in vivo dans un modèle d'inflammation pulmonaire aiguë (modèle LPS) chez la souris. Il se traduit notamment par un moindre influx des neutrophiles dans les poumons des animaux.

Nous proposons de tester l'effet de ce mannodendrimère dans un contexte infectieux, et plus particulièrement dans le cas d'une infection à Francisella, agent, chez les mammifères, de la tularémie, dont la forme pulmonaire est souvent fatale. Nous

avons choisi cette bactérie pour trois raisons. D'une part c'est un bon modèle de septicémie, qui est la deuxième cause de mortalité des patients admis en soins intensifs. D'autre part, *Francisella tularensis* fait l'objet d'intenses recherches car elle est considérée comme le plus probable agent de bioterrorisme. Enfin *Francisella novicida* n'est pas pathogène pour l'homme mais reproduit, chez la souris, toutes les caractéristiques de la tularémie humaine. La gravité de la maladie, que ce soit chez l'homme ou chez l'animal, est dépendante de la voie de contamination. Si la voie cutanée résulte en une forme bénigne, l'infection par aérosol conduit à une mortalité de 35% sans traitement avec des doses aussi faibles que 10 à 50 micro-organismes. Nous utiliserons donc la voie aérienne pour administrer la bactérie aux animaux. Une fois infectées, les souris ne développent aucun signe pathologique pendant les premières 24h, puis une forte réaction inflammatoire survient, se traduisant par la production de cytokines et de chimio-attractants. Ces derniers permettent notamment le recrutement d'un grand nombre de neutrophiles. Cette forte réaction immune, qui ne peut juguler la multiplication bactérienne, est même à l'origine d'atteintes du tissu pulmonaire. La septicémie apparaît rapidement et les souris meurent en 4 à 6 jours. L'hypercytokinémie et l'accumulation de neutrophiles dans les tissus sont des facteurs aggravants de la maladie.

Le but du protocole est donc d'évaluer l'impact de l'action anti-inflammatoire du Gc3Tri sur l'évolution de l'infection en association ou non avec une antibiothérapie. Pour cela nous déterminerons l'effet de l'administration intraveineuse du mannodendrimère sur l'évolution de l'infection des souris par *Francisella novicida*. Les paramètres suivants seront suivis : survie des souris, charge bactérienne dans les poumons, le foie, la rate et le sang.

L'étude sera découpée en 4 expériences et nécessitera 465 souris réparties par groupe de 15 à 20 selon les expériences. Dans ce modèle expérimental, comme dans la plupart des modèles d'investigation *in vivo*, la variabilité inter individuelle en réponse à un stimulus est importante et ne nous permet pas de diminuer le nombre d'animaux par groupe afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante.

L'état général des animaux (poil hérissé, hypo- ou hyperactivité...), la physiologie (rythme respiratoire), le comportement alimentaire, ainsi que la prise de poids des animaux seront suivis deux fois par jour. Les signes pathologiques spécifiques de la maladie, tels que démarche voûtée, écoulement oculaire seront également pris en compte.

Ces différents critères permettront d'appréhender au mieux l'effet de l'infection et des produits testés et/ou la douleur qu'ils pourraient engendrer. Tous signes et comportements anormaux et/ou perte de poids de plus de 20 % des animaux entraîneront l'exclusion de ces derniers qui seront ensuite euthanasiés.

L'utilisation d'antibiotique pour certains lots de souris nous permettra de contrôler l'infection bactérienne et donc de réduire la douleur des animaux traités. Les animaux seront euthanasiés dès qu'un point limite sera atteint et leurs organes seront prélevés et un dénombrement bactérien sera réalisé, ne remettant pas en cause l'expérience.

2034- La tuberculose (TB) est due à une infection par *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium bovis*. Elle reste actuellement l'une des maladies infectieuses les plus importantes chez l'homme et les animaux. Elle continue d'induire un coût énorme à la fois en santé humaine et animale. À l'heure actuelle, le seul vaccin disponible contre la tuberculose est le bacille de Calmette-Guérin (BCG), qui démontre une efficacité variable chez les humains comme chez le bétail. Le BCG induit une protection efficace contre la tuberculose disséminée et la méningite tuberculeuse chez l'enfant, mais une mauvaise protection contre la tuberculose pulmonaire chez les adolescents et les adultes. Cependant, le BCG demeure le vaccin le plus largement utilisé dans le monde. Par conséquent, une grande partie de l'effort de recherche est destinée à améliorer l'efficacité du BCG par un certain nombre d'approches; comme les vaccins BCG hétérologues. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires impliquant l'immunité lymphocytaire T induite par la vaccination BCG aiderait à identifier les corrélats immunitaires de protection, ce qui facilitera et accélérera la conception rationnelle de l'amélioration du vaccin ou à son remplacement contre la tuberculose. Le développement et l'évaluation d'un nouveau vaccin nécessite l'utilisation d'un modèle animal approprié, dans lequel sera testé des candidats vaccins potentiels. Il y a plusieurs modèles disponibles pour les travaux de développement d'un vaccin dans la tuberculose comme les souris, les cobayes, les bovins ou encore les primates non humains. Dans ce projet, le modèle murin constitue un outil scientifiquement essentiel (reconnu dans toute la communauté scientifique travaillant sur la tuberculose). Il permet d'évaluer les vaccins potentiels pour une application aux espèces cibles. Remplacement : Il n'y a pas de méthodes alternatives pour remplacer ce modèle murin pour mesurer l'efficacité de nouvelles stratégies vaccinales. Réduction : 60 souris (selon la méthode statistique de Russ Lenth) seront utilisées et réparties en 6 lots pour tester différences combinaisons thérapeutiques et les voies d'inoculation d'un boost viral afin de potentialiser l'effet du vaccin existant. Raffinement : il y aura un enrichissement social et l'ode structure (mise en place de papier essuie-tout pour la réalisation du nid).

2035- Les protocoles décrits dans cette demande ont un objectif principal, l'évaluation de la réponse immunitaire suite à l'induction d'une inflammation temporaire dans le péritoine de souris contrôles et d'animaux génétiquement modifiés.

L'objet de l'étude est l'évaluation qualitative et quantitative de la capacité d'un modèle murin à répondre à une inflammation. Ce projet est mis en œuvre dans le cadre général de la validation de modèles animaux génétiquement modifiés pour des études précliniques *in vivo*.

Pour ce type de projet nous avons travaillé sur tous les paramètres de l'analyse pour standardiser notre étude et définir de manière précise le nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement relevant. Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 1500 animaux pour ce protocole pour les 5 années que couvre notre demande.

L'injection de composés inflammatoires dans le péritoine de souris induit un phénotype modéré chez la souris. Nous avons néanmoins prévu dans nos procédures une surveillance des animaux régulière pendant les 4 jours que dure cette expérimentation et l'expérience sera suspendu rapidement si nécessaire.

2036- Les Rétinopathies Pigmentaires (RP) touchent environ une personne sur 4 000 dans les pays occidentaux, et se caractérisent par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet puis à cône, entraînant une perte progressive de la vision ou une cécité. Des études antérieures ont mis en évidence que le gène *Nxn1* codait par épissage alternatifs pour des facteurs ayant une fonction protectrice sur les photorécepteurs, le RdCVF « Rod-derived cone viability factor » et le RdCVFL. Le RdCVF est sécrété par les photorécepteurs à bâtonnet et médie une activité protectrice sur les photorécepteurs à cône par activation de l'entrée du glucose. Le second produit du gène *Nxn1*, le RdCVFL (thiorédoxine), jouerait quant à lui un rôle protecteur sur les photorécepteurs à bâtonnet des effets photo-oxydatifs de la lumière. Par ailleurs le RdCVFL pourrait aussi jouer un rôle dans la régulation circadienne du RdCVF.

Nous nous proposons ici d'étudier les conséquences de l'absence du RdCVFL (lignée de souris transgénique RdCVFL-/-) sur la fonctionnalité des photorécepteurs au cours du vieillissement « normal » ou « accéléré » (induction d'un stress oxydatif ou lumineux) en comparaison avec le modèle de souris déficiente à la fois pour le RdCVF et RdCVFL (modèle étudié depuis plusieurs années par l'équipe) et des animaux contrôles. L'activité des photorécepteurs sera mesurée par un électrorétinogramme (ERG) et la structure des couches de la rétine sera visualisée par tomographie par cohérence optique (OCT). Toutes conditions et génotypes confondus, ce projet nécessitera l'utilisation de 99 animaux. L'analyse des animaux. L'activité des photorécepteurs ne pouvant être enregistrée qu'in vivo, nous avons besoin de recourir à l'animal pour ce projet. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des carrés de cellulose et des bâtons à ronger. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

2037- L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle de type BOLD (IRMf) est une technique extrêmement utilisée pour étudier le fonctionnement du cerveau humain au cours des processus cognitifs. Le signal d'IRMf est corrélé avec l'activation neuronale locale, néanmoins le lien de causalité entre ces deux événements n'est que partiellement compris.

Notre projet consiste à associer simultanément, chez la souris, l'imagerie cellulaire à l'imagerie IRM de façon à déterminer quantitativement la relation spatiale et temporelle entre le flux sanguin capillaire, l'activation de neurones/astrocytes spécifiques et le signal IRMf.

Ce travail permettra de mieux comprendre la nature des signaux utilisés pour l'imagerie humaine.

Ce type d'expérience est très difficile en raison des limites techniques imposées par l'aimant de l'IRM.

Notre approche, qui n'a jamais été réalisée précédemment, limitera le nombre d'animaux utilisés dans la mesure où les réponses cérébrales seront enregistrées simultanément avec plusieurs techniques.

Afin d'analyser le rôle des principaux types de cellules du cerveau, six modèles de souris transgéniques seront utilisées sur 5 ans, soit seulement 30 souris par modèle. Auxquels s'ajouteront 30 souris contrôles. Les six modèles nous permettront d'étudier différents types cellulaires comme les astrocytes, les pericytes ou encore les neurones. Soit 210 souris.

Chaque intervention chirurgicale se déroulera sous anesthésie générale.

2038- Les Rétinopathies Pigmentaires (RP) touchent environ une personne sur 4 000 dans les pays occidentaux, et se caractérisent par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet puis à cône, entraînant une perte progressive profonde de la vision ou une cécité. Les études menées antérieurement par l'équipe sur les RP ont mis en évidence que le gène *Nxn1* codait pour des facteurs ayant une fonction protectrice sur les photorécepteurs, le RdCVF « Rod-derived cone viability factor » et le RdCVFL. Le RdCVF sécrété par les bâtonnets médie une activité protectrice sur les cônes en y activant l'entrée du glucose. Le RdCVFL (thiorédoxine), jouerait quant à lui un rôle protecteur des effets photo-oxydatifs de la lumière sur les bâtonnets.

De plus, l'équipe a aussi mis en évidence quatre facteurs activateurs du gène *Nxn1*. Parmi des facteurs, il y a l'homéoprotéine Pax4 dont l'expression varie avec le cycle circadien. Il a aussi été montré chez le rat, que l'expression du RdCVF corrélait avec celle de Pax4 et pas celle du RdCVF. Dans cette étude nous corrélons le phénotype visuel de souris déficiences en PAX4 spécifiquement au niveau des photorécepteurs à bâtonnet [lignée RhoCre : Pax4lox/lox] à l'expression des facteurs RdCVF/RdCVFL et nous étudierons l'influence du rythme circadien et de son inversion sur les fonctions des photorécepteurs à cône et à bâtonnet de souris déficientes (ou non) pour le gène *Nxn1* [lignée *Nxn1* KO]. L'effet sur les photorécepteurs sera évalué par analyse électrorétinographique (ERG) et par imagerie de la structure de la rétine (OCT). L'activité électrique des photorécepteurs ne peut être évaluée qu'in vivo. Au total, pour ce projet nous utiliserons 68 animaux.

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

2039- Chaque année dans le monde, on estime à 160 000 le nombre d'enfants atteints de cancers pédiatriques (70 000 en guérissent) dont 20% dans les pays développés. Les cancers pédiatriques ont été les grands bénéficiaires des progrès des thérapies anticancéreuses au cours des dernières décennies. En effet, aujourd'hui, le cancer de l'enfant peut être soigné, dans les pays développés, dans 75 à 80% des cas (contre environ 50% chez l'adulte). En France, 1800 enfants en sont atteints chaque année (1 enfant sur 600) et on estime aujourd'hui que 60 000 personnes ont survécu à un cancer pédiatrique dont environ la moitié sont des hommes. Cependant, ces thérapies sont connues pour leurs effets gamétotoxiques, pouvant

entraîner une stérilité définitive. Alors que chez l'homme adulte on peut proposer de congeler des spermatozoïdes avant d'engager le traitement pour préserver sa fertilité, ce n'est bien entendu pas possible chez le jeune garçon. La seule mesure de préservation actuellement envisageable pour ces enfants est alors de procéder à un prélèvement et une cryoconservation de tissu testiculaire, sans garantie que les progrès scientifiques futurs permettront de restaurer leur fertilité dans le cadre d'un projet parental assisté médicalement.

Dans ce contexte, nous avons développé en collaboration avec des partenaires académiques un premier prototype de « testicule artificiel » permettant d'effectuer la spermatogénèse (production de spermatozoïdes à partir de cellules souches germinales) ex vivo à partir de tissu testiculaire immature (tests réalisés aujourd'hui chez le rat). Nous souhaitons désormais poursuivre le développement de ce projet en réalisant la transition à l'espèce humaine, dans le but de passer à l'application clinique de préservation de la fertilité chez les garçons prépubères devant recevoir un traitement oncologique stérilisant. Une biopsie testiculaire avant le traitement stérilisant permettra d'obtenir du tissu testiculaire contenant des spermatogonies. La spermatogénèse in vitro permettra d'obtenir des spermatozoïdes qui seront cryoconservés et utilisés ultérieurement en ICSI (Intra Cytoplasmique Sperm Injection qui consiste à injecter in vitro un spermatozoïde dans un ovocyte) lors du désir de paternité. La commercialisation de la technologie est attendue à l'horizon 2018. Nous estimons que 10 000 enfants atteints de cancer pourraient bénéficier, chaque année dans le monde, d'une telle mesure de préservation.

Le nombre d'animaux utilisé est de 120 souris

Nous estimons qu'un nombre total de 120 souris seront nécessaires pour accomplir ce projet. Tout sera mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux utilisés ainsi que leur stress ou souffrance. Cela sera assuré par l'optimisation du nombre d'animaux par condition expérimentale.

L'analyse in vivo reste incontournable, afin de mener à bien notre projet de recherche, dans un environnement physiologique. Nous ne pouvons pas remplacer l'animal par un modèle in vitro.

Les souris sont hébergées dans des cages en présence de litière favorisant l'absorption des liquides vers le bas (par conséquent la surface la litière reste saine plus longtemps). Les souris ont également à leur disposition des formes d'enrichissement (nid végétal à base de fibres courtes de coton, des tunnels en carton et des igloos teintés en polycarbonate) afin de réduire l'ennui et le stress.

2040- De nombreuses dystrophies héréditaires de la rétine conduisent à la cécité car il n'existe pas de traitement permettant de stopper ou ralentir efficacement la perte des photorécepteurs. La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) et la rétinite pigmentaire (RP) sont deux pathologies atteignant la rétine et provoquant une altération du champ visuel et/ou de l'acuité visuelle.

L'hétérogénéité génétique de ces maladies (plus de 170 gènes n'expliquant que 60% des cas) limite drastiquement la perspective d'un traitement par thérapie génique. C'est ainsi qu'une stratégie par transplantation de photorécepteurs a été mise en place par l'équipe. Le bénéfice sur la fonction visuelle de cette technologie est resté limité du fait d'une dédifférenciation des cellules épithéliales (comme le sont les photorécepteurs) en cellules mésenchymateuses. L'équipe a mené des études in vitro afin de comprendre les mécanismes qui entrent en jeu dans ce processus. Elle a identifié que le gène OTX2 jouait un rôle clé dans la prévention de cette dédifférenciation.

Dans ce projet, nous aimerions tester les effets positifs d'une transplantation de cellules épithéliales pigmentaires de la rétine (RPE) préalablement infectés avec de l'OTX2 via des outils viraux afin de parer le processus de dédifférenciation. Nous transplanterons des rats RCS (modèle murin de dégénérescence rétinienne) et nous testerons l'efficacité sur la vision par un électrorétinogramme (ERG). La structure des couches de la rétine sera aussi visualisée par tomographie par cohérence optique (OCT). L'activité des photorécepteurs ne pouvant être enregistrée qu'in vivo, nous avons besoin de recourir à l'animal pour ce projet. Cette étude incluant les animaux contrôles nécessitera la transplantation de 30 rats.

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

2041- Le développement neural regroupe l'ensemble des processus qui accompagnent la croissance du système nerveux depuis les stades embryonnaires jusqu'à la mise en route des fonctions cérébrales. Comprendre comment le cerveau se met en place est un enjeu majeur en médecine car un grand nombre de maladies neurologiques sont liées à des anomalies du développement. Nous utiliserons la connectivité rétine-cerveau comme modèle. Une grande partie des études se feront sur des cultures cellulaires in vitro ; toutefois les études des mécanismes participant au développement des projections rétinienne ne peuvent pas être réalisées exclusivement sur des cultures primaires. La complexité du réseau de neurones qu'est le système nerveux ne peut être reproduite in vitro, ce qui nécessite l'expérimentation in vivo. Le nombre total de souris utilisées dans ce projet est estimé à 894 souris adultes, 1368 embryons (E14-E15) et 1974 souriceaux (P10- P15), pour 5 ans. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des carrés de cellulose, une maisonnette et des bâtons à ronger. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

2042- Les essais thérapeutiques récents utilisant des composés immunomodulateurs ont donné des résultats extrêmement prometteurs sur certains types de cancers comme le Mélanome. Si les anticorps utilisés à ce jour ont des effets spectaculaires

sur la pousse tumorale, ils ont aussi des effets secondaires important. La recherche s'intéresse donc de très près à la caractérisation de nouveaux composés immunomodulateurs.

Dans le protocole présenté ici, la souris est utilisée comme modèle préclinique. Une tumeur comme la cellule B16, issue d'un mélanome murin, peut être implantée en intra dermique chez la souris, elle produit en quelques semaines une tumeur. Cette lignée de croissance lente est un modèle largement utilisé dans les essais précliniques de composés immunomodulateurs, nous allons utiliser cette lignée dans ce cadre précis en contrôlant sa croissance et la réponse du système immunitaire.

Ces études seront réalisées de manière séquentielle pour déterminer l'action de ces composés sur la pousse tumorale, la dose optimale à injecter et la réponse du système immunitaire. Dans chaque cas nous nous limiterons au nombre d'animaux permettant de répondre clairement à la question posée. Ces études ont pour but à la fois le suivi de la pousse tumorale mais aussi la réponse du système immunitaire. Ce type d'expérimentation doit être effectué in vivo.

les animaux sont toujours hébergés en groupe, avec un maximum de 5 animaux par cage le milieu est enrichie avec l'ajout de deux produits "Enrichment Diamond Twists" Harlan) et "Dome Home" (Special Diet Service).

La demande déposée est pour l'utilisation d'un maximum de 1860 animaux sur 5 années.

2043- • Le but du projet est de créer une nouvelle lignée de lapins, sélectionnée conjointement sur la prolificité, les effets directs et maternels du poids au sevrage, en appliquant une méthode d'optimisation de la sélection pour maximiser le progrès génétique et limiter l'évolution de la consanguinité. La prolificité est le critère économique le plus important après l'efficacité alimentaire. La sélection pour le poids au sevrage a pour but de limiter la diminution de la croissance liée à la sélection pour la prolificité. Par ailleurs la croissance est liée favorablement avec l'efficacité alimentaire. Cette lignée a aujourd'hui une vocation expérimentale. Elle doit permettre de vérifier la possibilité d'une sélection conjointe sur la prolificité et la croissance des jeunes et de vérifier l'évolution de sa consanguinité sur le long terme. Cette lignée sert également à produire des animaux expérimentaux représentatifs des lignées commerciales actuelles, vendues pour la consommation, pour l'ensemble de la communauté scientifique.

• Pour réaliser la sélection génétique, 1120 animaux sont identifiés par la pose d'une petite boucle d'oreille (système Simplex Baby), et pesés à la naissance puis au sevrage à chaque génération. On retient ensuite 140 femelles et 50 mâles pour constituer la nouvelle génération. Les femelles sont inséminées 8 fois à 42 jours d'intervalle avant d'être réformées. Cette durée de carrière est représentative de la durée moyenne de reproduction dans les élevages commerciaux. Elle permet également de vérifier que la sélection mise en place ne détériore pas la survie des femelles. Pour avoir une estimation précise de la longévité des lapines, il est important d'avoir une durée d'étude la plus longue possible. En élevage cunicole, le nombre moyen annuel de gestations, avec des intervalles de 42 jours, est égal à 8. Les seuls animaux faisant l'objet d'une procédure expérimentale (biopsie d'oreille réalisée à l'aide d'une pince Allflex) sont les reproducteurs mâles et femelles de chaque génération, soit 140 femelles et 50 mâles par génération, soit 1140 animaux au total pour les 5 années d'expérimentation.

• le nombre d'animaux entrant dans la procédure est le minimum qui garantit un progrès génétique significatif et une évolution de consanguinité limitée. Le logement des animaux se fait dans le respect des règles de l'élevage conventionnel, à savoir bâtiment chauffé en hiver, rafraîchi en été, cages respectant largement la norme NF47-001 car leur surface est 10 % supérieure à celle préconisée par la norme Afnor. Les conditions d'élevages sont les plus proches de celles des élevages commerciaux. La procédure de biopsie choisie est la moins stressante pour l'animal, car elle fait appel à la contention la moins longue.

2044- Les anticorps sont des molécules qui ont la propriété de se "mouler" sur leur cible. Ils peuvent être générés par des processus de vaccination. En effet, ils sont sécrétés par des cellules du système immunitaire. Celle-ci peuvent être isolées, immortalisées, et clonées. Les anticorps monoclonaux sont alors utilisés comme médicament à "action ciblante", ou en recherche pour "détecter" le produit étudié. Ils sont par conséquent employés dans des domaines très variés allant de l'agronomie à la santé humaine.

Le processus d'obtention d'anticorps passe par une étape d'immunisation où de grandes quantités de protéines sont souvent nécessaires, ce qui peut être un frein à certains projets. Les systèmes d'expression in vivo ont considérablement évolué ces dernières années, permettant d'obtenir des niveaux importants de protéines. L'immunisation d'animaux par injection de plasmides permet ainsi de court-circuiter la nécessité de disposer de protéines recombinantes purifiées. De même, il est extrêmement difficile d'exprimer et de purifier des protéines de surfaces possédant plusieurs domaines transmembranaires.

Un autre avantage de cette technologie est de pouvoir s'affranchir de l'utilisation d'adjuvant agressif, substances souvent associés à effets secondaires douloureux pour l'animal.

L'objectif du projet est de mettre au point un protocole permettant d'obtenir une expression suffisante pour induire une réponse immunitaire élevée. La première partie du programme consistera à tester, à partir d'une molécule référence, différentes formulations pour identifier la plus satisfaisante. Une étape de validation sera ensuite réalisée en évaluant la formulation retenue avec quatre différents types de protéines cibles (expression intra-cellulaire, sécrétrice, membranaire à multiple domaine, molécule composite par exemple).

Pour ce projet, le nombre maximal d'animaux prévu est de 70 souris, dans le respect de la règle des 3R :

Réduire : 10 formulations différentes pourront être évaluées, et une seule sera sélectionnée pour valider le protocole sur 4 cibles différentes. Ce nombre restreint de formulation est possible grâce à une étude bibliographique du sujet. En effet, plusieurs auteurs ont démontré la faisabilité de la procédure. Cependant, les conditions expérimentales utilisées dans ces travaux sont trop hétérogènes pour permettre d'établir un protocole standard. Les formulations seront testées par série de 4

afin de limiter le nombre d'animaux. En effet, dès qu'une formulation permettant d'obtenir une réponse immunitaire élevée, sera identifiée, la seconde étape du projet, portant sur la validation du protocole, sera engagée.

Raffiner : L'état de santé des animaux est contrôlé après chaque injection par le suivi des poids pendant quelques jours. En cas de souffrance modérée, l'injection de morphine est prévue dans les protocoles. Enfin, pour chaque projet d'immunisation, les conditions d'immunisation et les réponses observées sont consignées dans un fichier. Une analyse rétrospective des expériences réalisées sera effectuée dans le but d'améliorer le nombre d'animaux nécessaires pour ce type d'immunisation.

2045- Un des problèmes majeurs de santé publique actuellement est l'émergence de la résistance aux antibiotiques et des infections nosocomiales. Parmi les souches bactériennes responsables d'infections nosocomiales dans le domaine hospitalier, on trouve notamment des bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli* et *Salmonelle*. Une fois installée, l'infection est très difficile à éradiquer. Surtout lorsque les bactéries secrètent une matrice extracellulaire extrêmement imperméable qui les protège de tout type d'agressions extérieures et qui leur permet d'adhérer à tout type de support. Elles forment alors un biofilm. Ce mode de virulence est très employé par les bactéries car elles se multiplient et colonisent leur hôte très rapidement. De plus, les antibiotiques ou autres agents chimiques deviennent alors inefficaces. Ce phénomène est très problématique dans le milieu médical surtout lors d'implantation de matériel étranger chez l'homme comme par exemple des prothèses vasculaires. Malgré toutes les précautions d'hygiène prises lors des interventions chirurgicales, l'introduction d'un corps étranger dans l'organisme humain peut favoriser la prolifération bactérienne et ainsi devenir un support idéal pour le développement de biofilms.

Récemment, plusieurs articles scientifiques ont fait état de l'inhibition de la formation des biofilms par plusieurs molécules de petite taille, produites naturellement par les bactéries et que l'on appelle les Acides RiboNucléiques régulateurs ou ARN_{reg}. Des résultats préliminaires, obtenus *in vitro*, montrent que 5 ARN, synthétisés chimiquement sous forme d'Acides Nucléiques Peptidiques (PNA), inhibent la croissance des bactéries, la formation des biofilms en microplaques ainsi que la formation des biofilms, *in vitro*, sur implant de prothèse vasculaire. Chaque PNA a été testé seul ou en combinatoire avec un 2ème PNA afin d'améliorer l'efficacité d'inhibition.

Le but de cette étude est de reproduire l'effet de ces PNA *in vivo*, sur un même implant de prothèse vasculaire et de démontrer l'effet préventif des PNA ; chaque implant sera en effet pré-incubé dans une solution de PNA avant d'être transféré chez l'animal. Empêcher les bactéries de former du biofilm reste sûrement le meilleur moyen d'empêcher l'infection chronique de s'installer.

Le modèle animal choisi est la souris (Swiss, femelles, âgées à 4 à 6 semaines). 492 animaux au maximum sont nécessaires à la réalisation d'une étude complète (Lot de 9 souris / traitement, 13 traitements différents, 2 souches différentes, 2 doses différentes et un lot de 24 souris « contrôle »). Toutes les procédures d'implantation et d'infection de matériel se font sous anesthésie générale de courte durée. Une surveillance quotidienne de chaque animal sera réalisée afin d'évaluer son bien-être et ainsi gérer au mieux la prise en charge de la douleur et de la souffrance avec une évaluation de critères physiques (pelage, yeux, comportement) et physiologiques (température, poids) selon une grille de Morton et Griffith modifiée.

Avec ce modèle *in vivo*, nous recueillerons des données essentielles à la mise au point d'une ou plusieurs molécules inhibitrices de biofilms, susceptibles d'être utilisées dans le milieu médical.

2046- L'hepcidine, synthétisée par le foie et secrétée dans le plasma, contrôle le métabolisme du fer. Des niveaux anormalement bas d'hepcidine entraînent des maladies de surcharge en fer (hémochromatoses génétiques) qui peuvent entraîner des complications vitales ou fonctionnelles. Pouvoir induire la production d'hepcidine chez ces patients représente une voie thérapeutique potentielle. Nos résultats expérimentaux, obtenus dans un modèle cellulaire, montrent que l'acide valproïque pourrait induire l'expression de l'hepcidine.

Notre objectif est de tester, chez la souris, dans un modèle physiologique intégré et maîtrisé, sans facteur confondant, l'impact de l'acide valproïque sur l'expression de l'hepcidine et le métabolisme du fer. Nous évaluerons l'effet de l'administration d'une dose unique d'acide valproïque chez la souris en trois phases qui s'enchaînent : 1) Détermination d'une dose efficace par test de deux doses différentes, déjà utilisées dans la littérature pour des études sur d'autres paramètres, administrées par injection intrapéritonéale, et analyse de l'effet à 24h sur les niveaux de fer et d'hepcidine (35 souris) ; 2- Etude de la cinétique d'efficacité de la dose la moins élevée afin de déterminer : i) le délai entre l'injection et l'efficacité sur le niveau d'hepcidine, et la concentration en fer dans le plasma, ainsi que la durée d'effet (rémanence) sur les paramètres mesurés (96 souris). 3- Utilisation de la concentration la plus faible efficace de la phase 1 et analyse aux temps ou une efficacité a été retrouvée lors de la phase 2 pour tester l'efficacité de l'administration selon une voie plus utilisable (orale ou sous cutanée) pour l'administration répétée et chronique (140 souris). Ce protocole est prévu pour répondre à la règle des 3R.

- Réduire : le nombre d'animaux est le nombre minimal pour que des études statistiques fiables puissent être conduites. La souris a été préférée car des modèles pathologiques existent dans cette espèce et les résultats obtenus pourront être utilisés ultérieurement dans ces modèles. Par ailleurs le résultat de chaque phase est conditionnel pour la réalisation de la suivante.

- Raffinement : La réalisation du protocole ne devrait pas entraîner de douleur significative. Des points limites ont toutefois été définis et seront observés en cas d'évènement inattendu. Les animaux seront anesthésiés avant prélèvement et euthanasie. Le nombre d'animaux indiqué pour la phase 3 sera réduit si la phase 2 indiquait que les temps précoces ou tardifs pouvaient être évités. Le nombre de 266 souris au total est donc un nombre maximal.

- Remplacer : l'étude fait suite à une expérimentation *in vitro*. Le passage à un modèle physiologique intégré est nécessaire pour avoir une appréciation réelle de l'effet de l'acide valproïque dans une situation physiologique et intégrée. Cette étude

permettra de disposer des paramètres permettant d' optimiser les conditions pour la réalisation de futures études dans le but d'évaluer l'effet de l'administration chronique chez l'animal hémochromatosique puis ultérieurement chez l'homme.

2047- Projet : Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est une tumeur maligne primitive de très mauvais pronostic qui se développe aux dépens des hépatocytes. Les études réalisées in vitro sur les lignées cellulaires et in vivo sur les tumeur humaines ont permis de mettre en évidence des dérégulations au niveau des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) tels que les récepteurs de l'EGF (EGFR), de l'IGF-1 (IGF1R) et de l'insuline (IR), ainsi que de la protéine adaptatrice EBP50/NHERF1, un régulateur d'EGFR. Afin de valider les données in vitro, nous souhaitons étudier dans un modèle expérimental de CHC induit chez la souris, l'implication des RTK et d'EBP50 dans ce cancer.

Type d'animaux : Souris transgénique EBP50^{-/-} et C57BL6j

Nombre d'animaux : 192

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 192 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement-Réduction-Raffinement :

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

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

*Raffinement : Les animaux auront à disposition un enrichissement du milieu (coton/maison) tout au long de la vie. Dans le cadre de ce projet, un arrêt précoce des expériences sera effectué en cas de souffrance des animaux. Un suivi quotidien et individuel des animaux sera pratiqué selon les critères suivants : posture, activité, mobilité, état du pelage complété par un suivi pondéral. Si une souris présente un ou plusieurs signes de souffrances l'expérience sera arrêtée.

2048- Les Rétinopathies Pigmentaires (RP) touchent environ une personne sur 4 000 dans les pays occidentaux, et se caractérisent par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet puis à cône, entraînant une perte progressive profonde de la vision ou une cécité.

Des études sur la souris rd1, modèle murin de RP très étudié par la communauté scientifique, ont montré que les segments externes des cônes étaient raccourcis. Par ailleurs, des études antérieures de l'équipe ont montré que le RdCVF jouait un rôle protecteur sur la dégénérescence secondaire des cônes. Nous aimerions savoir s'il est possible de restaurer la longueur des segments externes chez les personnes atteintes d'une RP par une administration intraoculaire ciblée de RdCVF.

Cette étude se fera sur des souris déficientes en RdCVF (Nxn1^{-/-}) afin d'éviter les interférences avec le RdCVF endogène. Au total 60 animaux seront nécessaires à cette étude (incluant les animaux contrôles). L'activité des photorécepteurs n'étant pas mesurable in vitro, l'utilisation du modèle animal est indispensable pour notre étude. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les conditions d'hébergements seront adaptées au modèle expérimental. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». »

2049- L'hyperactivité sympathique est associée aux symptômes du syndrome métabolique tels que la résistance à l'insuline, l'obésité et l'hypertension et pourrait être une des causes de développement de ce syndrome. Différents agents pharmacologiques sympatho-inhibiteurs sont actuellement utilisés pour réguler l'hyperactivité sympathique et agissent via les récepteurs α 2-adrénergiques et imidazoliniques. Toutefois, ces ligands pharmacologiques ne sont pas sélectifs et ne permettent pas de déterminer les contributions respectives des récepteurs α 2-adrénergiques et imidazoliniques.

Une équipe a récemment identifié un nouveau composé pharmacologique ciblant spécifiquement le récepteur imidazolinique (LNP599). Ajouté à l'eau de boisson de rats SHHF hypertendus, obèses et diabétiques de type-2, le composé entraîne une inhibition du système sympathique et des effets bénéfiques sur les symptômes du syndrome métabolique (amélioration de la résistance à l'insuline, de la tolérance au glucose, du profil lipidique, de la concentration plasmatique en adiponectine....)

Afin d'approfondir ces résultats et de déterminer plus spécifiquement le rôle de ce récepteur dans la biologie des tissus adipeux et l'équilibre énergétique, nous souhaitons traiter des souris soumises à un régime hyperlipidique avec le composé LNP599 et étudier différents aspects du métabolisme glucido-lipidique par des analyses dynamiques (test de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline, prise alimentaire et dépense énergétique) et moléculaires sur différents organes avec en priorité les tissus adipeux blanc et brun ainsi que les tissus périphériques métaboliquement actifs (foie, muscle, pancréas..). Ceci est indispensable pour valider l'efficacité de ce composé dans plusieurs modèles de syndrome métabolique et d'insulino-résistance, avant d'envisager son emploi chez des primates non humains, puis une étude clinique.

L'ensemble de ces manipulations in vivo impliquera l'utilisation de 128 animaux pour une durée de 5 ans. Nous utiliserons des animaux mâles adultes, non modifiés génétiquement et provenant d'un fournisseur agréé. Au cours de la mise en place de ce projet, nous avons tenu compte de la règle des 3R, en réduisant le nombre d'animaux par expérience (tout en conservant des

valeurs statistiques) et en raffinant les procédures (limitant les « interventions » chez l'animal). Enfin, la pierre angulaire de ce projet est de tester un nouveau composé de façon intégrée chez la souris, afin de démontrer son efficacité dans la survenue ou l'amélioration de l'obésité et d'un diabète de type 2. Il ne nous est donc pas possible de remplacer ces animaux.

2050- La présente demande est rédigée dans le but d'immuniser des souris contre la protéine TRPV2 afin d'obtenir des anticorps monoclonaux spécifiques et inhibant la fonction de cette protéine.

La protéine TRPV2 est un membre de la grande famille des canaux TRP. En provoquant le passage des ions calcium au travers de la membrane plasmique en réponse à divers stimuli, ces protéines permettent à la cellule de communiquer avec son environnement et à engager des réponses cellulaires appropriées (e.g. prolifération, migration,...). Des études récentes ont démontré l'implication de ces canaux dans la régulation d'étapes spécifiques lors du développement de cancer : la surexpression de TRPV2 a notamment été mise en évidence dans plusieurs cancers solides, en particulier dans les formes métastatiques dans lesquelles TRPV2 favorise la dissémination des cellules. TRPV2 constitue donc une cible thérapeutique prometteuse pour bloquer la formation des métastases cancéreuses. Aucun anticorps bloquant dirigé contre TRPV2 n'existe cependant à ce jour.

L'objectif de ce projet est la génération d'anticorps neutralisant spécifique du canal TRPV2 humain. Cette activité biologique des anticorps pourra être obtenue en bloquant ou en stabilisant le canal en position fermé, par encombrement stérique (agissant comme un « bouchon » au niveau du pore formé par le canal pour faire passer les ions calcium) ou en diminuant l'expression du récepteur à la membrane.

Ces anticorps hautement spécifique et neutralisant seront des outils de choix pour l'étude et la compréhension du rôle de TRPV2 dans la tumorigénèse, et le développement de nouvelles molécules anti-cancéreuses.

Pour la partie expérimentation animale, trois stratégies d'immunisations seront réalisées consécutivement, en fonction des résultats obtenus, dans le respect de la règle des 3R. La première approche va consister à immuniser des lots de 6 souris à l'aide de la protéine TRPV2 entière surexprimée à la surface de cellule murines. La seconde approche utilisera une forme tronquée de TRPV2, constituée uniquement des domaines impliquées dans la formation du pore calcique. En cas d'échec de ces deux premières stratégies, c'est-à-dire en absence d'obtention d'anticorps neutralisant anti-TRPV2 spécifique, l'injection de peptides correspondant au site actif du canal sera évaluée dans une troisième approche.

Toutes les immunisations seront préférentiellement réalisées par voie intrapéritonéale (injection de cellules) ou par voie sous-cutanée (troisième approche), suivant un cycle de trois injections espacées de 15 jours. A l'issue de la dernière injection, des prélèvements sanguins sous-maxillaires chez chaque animal seront réalisés pour contrôler le développement d'une réponse immunitaire spécifique. En fonction des titres sériques mesurés, un ou plusieurs animaux seront sélectionnés pour les étapes in vitro du projet. En cas de développement d'une réponse immunitaire insuffisante, la stratégie employée sera réévaluée, ou des cycles supplémentaires d'injections seront réalisés.

Pour ce projet, le nombre maximal d'animaux prévu est de 36 souris, 18 souris Balb/c et 18 souris Swiss, afin de respecter au mieux la règle des 3R :

Réduire : Un antigène par procédure pourra être testé pour induire une réponse immunitaire spécifique, chacun injecté à six souris d'une même souche. Chaque nouveau lot ou changement d'espèce ne sera réalisé qu'en l'absence de résultat concluant (obtention d'anticorps spécifiques), ceci afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire au projet.

Raffiner : L'état de santé des animaux est contrôlé après chaque injection par le suivi des poids pendant quelques jours. En cas de souffrance modérée, l'injection de morphine est prévue dans les protocoles. Enfin, tous les résultats d'immunisation sont consignés dans un fichier. Ce document permettra une analyse rétrospective des expériences réalisées afin d'améliorer les protocoles d'immunisation, et in fine le nombre d'animaux nécessaire par projet.

2051- Le contrôle de la communication entre les neurones est nécessaire pour adapter les réponses des neurones aux modifications de l'environnement. La communication neuronale se fait au niveau des synapses où un neurone présynaptique émet un neurotransmetteur qui se fixe sur un récepteur de l'autre neurone dit post-synaptique pour induire une réponse. Ces dernières années, nous avons développé des outils d'optique, d'imagerie et d'analyse pour suivre le comportement des récepteurs post-synaptiques au niveau de la molécule unique. Cela nous a permis de montrer que les neurones contrôlent la mobilité des récepteurs pour contrôler l'efficacité synaptique, et que ces contrôles impliquent également des cellules non neuronales présentes dans le cerveau.

Nos études visent à caractériser les régulations des synapses. Dans la mesure où les lignées cellulaires ne font pas de synapses fonctionnelles, nous devons utiliser des cultures primaires ou des cultures d'explants de cerveau dans lesquels les interactions cellulaires complexes sont conservées.

Le but du présent projet est d'approfondir notre analyse du comportement des récepteurs. Nous voulons 1-Implémenter dans notre laboratoire de nouvelles méthodes de microscopie qui nous permettront d'accéder à de nouveaux paramètres du comportement des récepteurs aux neurotransmetteurs, et qui nous permettront d'étudier ce comportement dans le tissu nerveux et non plus uniquement dans des cellules en culture. 2-Utiliser ces nouvelles technologies pour comprendre l'importance du contrôle de la diffusion des récepteurs aux neurotransmetteurs dans la régulation de l'activité neuronale.

Pour suivre les récepteurs aux neurotransmetteurs par les nouvelles méthodes de microscopie, ceux-ci doivent être fluorescents. Nous ferons donc exprimer par les neurones des versions fluorescentes des récepteurs grâce à des vecteurs plasmidiques d'expression.

La règle des 3R sera suivie de la manière suivante : Réduction - Les cultures primaires ou d'explants que nous utiliserons permettent de réduire considérablement le nombre de souris utilisées puisqu'une seule souris permet de réaliser plusieurs

essais. Raffinement - Nous réduirons au maximum l'inconfort des souris car les procédures que nous mettrons en œuvre sont bien établies et n'induisent pas de douleur d'angoisse ou de stress, et nous appliquerons des soins pré- et post-opératoires quand cela sera utile. Remplacement - Il n'existe pas de méthode alternative fiable pour remplacer les cultures primaires de cellules ou d'explants pour étudier la fonction synaptique, mais nous sommes vigilants et nous le resterons quant aux développements de telles méthodes.

Nous prévoyons d'utiliser environ 2500 souris pendant les 5 années de ce projet.

2052- La cécité est un problème de santé publique qui handicape gravement les personnes atteintes et qui concerne un français sur mille. Parmi les causes principales de cécité, la rétinite pigmentaire désigne un ensemble de pathologies progressives et héréditaires de la rétine qui mène à une cécité incurable et qui atteint plus d'un million de personnes à travers le monde. La symptomatologie clinique résulte en la perte progressive des photorécepteurs engendrant une perte de la vision nocturne puis diurne.

Si la plupart des photorécepteurs dégénèrent et perdent leur capacité de réponse à la lumière, une population de cônes résiduels persiste : les cônes dormants. Ces cônes dormants peuvent être réactivés par une stratégie de ciblage par la technique d'optogénétique.

L'optogénétique est une méthode novatrice basée sur des animaux transgéniques exprimant des protéines photosensibles appartenant à la famille des opsines. Par injection intraoculaire, ces protéines vont être exprimées au sein de différentes couches cellulaires de la rétine. Ces cellules rétinienne seront activées par de la lumière générée par des LEDs de haute intensité.

Dans ce projet, nous testons un nouveau traitement applicable à la rétinite pigmentaire qui consiste en une unique injection intraoculaire (injection sous-rétinienne chez la souris) et en une stimulation chronique par des LEDs de haute intensité.

Parallèlement, le comportement des animaux sera évalué par différents tests non-invasifs prédictifs d'un état de restauration de la vision. Ces tests permettront de visualiser les effets de la stimulation chronique optogénétique en considérant l'animal dans son ensemble.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'effet d'une stimulation chronique par la lumière (LEDs haute intensité) sur le remodelage rétinien, l'état d'activation électrophysiologique et ses conséquences sur le comportement visuel. En d'autres termes, nous cherchons à étudier si une stimulation optogénétique chronique par la lumière peut ralentir ou stopper le processus de dégénération des photorécepteurs et si la réactivation électrique de ces cellules maintien ou restore le circuit neuronal sous-jacent au sein d'un modèle animal de la rétinite pigmentaire.

En respect du principe de remplacement (1), de réduction (2) et de raffinement (3) décrits au 2° de l'article R. 214.105 « règle des 3R » du code rural cité dans le décret 2013-118 :

1- L'utilisation des animaux au sein des procédures expérimentales ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. En effet, la stimulation chronique par des LEDs, l'évaluation comportementale ou la mesure des potentiels évoqués visuels ne peuvent être réalisés qu'in vivo.

2- Un total de 945 souris (Rd1rd/rd et CNG3-/-Rho-/-), modèle de rétinite pigmentaire, sera utilisé (détails en 3.4.10). Ce nombre estimatif d'animaux, est réduit à son minimum pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs sans compromettre les objectifs du projet.

3- Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. Les conditions d'hébergements seront adaptées au modèle expérimental de cette étude. En effet, les animaux seront hébergés sans enrichissement, ce dernier pouvant interférer sur le processus de dégénérescence des photorécepteurs. Cette condition d'hébergement est primordiale lors de notre protocole d'éclairage chronique par les LEDs afin que la lumière parvienne convenablement aux yeux des animaux traités. Les animaux ne doivent en aucun cas pouvoir se cacher de la lumière par quelconques objets afin de ne pas compromettre la période de traitement chronique par la lumière des LEDs.

2053- La consommation de fructose est un facteur de risque bien connu pour le diabète, l'adiposité viscérale, la stéatose hépatique non alcoolique et la dérégulation de la prise alimentaire. Chez les individus consommant de grandes quantités de fructose, l'intestin est exposé à des concentrations élevées de fructose. Bien que de nombreuses études aient mis en évidence le rôle du microbiote intestinal dans la physiopathologie de l'hôte, les interactions entre le fructose et le microbiote intestinal n'ont pas été étudiées. Ce projet testera l'hypothèse selon laquelle le fructose alimentaire pourrait modifier la composition du microbiote. De plus il déterminera si un déséquilibre de la flore intestinale par le fructose est impliqué dans la médiation de ses effets délétères sur la physiologie de l'hôte. L'intolérance au fructose affecte plus de 80% des enfants de moins de 2 ans et est également retrouvé chez les adultes sous forme bénigne ou sévère. Les symptômes associés à la malabsorption du fructose vont de la diarrhée et des douleurs abdominales à la dépression et l'anorexie. Même si la malabsorption des sucres est associée à la prolifération bactérienne, les mécanismes fondamentaux qui conduisent à ces symptômes n'ont jamais été étudiés dans le cadre du fructose.

L'ensemble des études préliminaires ayant été réalisées chez le rat, l'hypothèse du rôle du microbiote sera testée sur ce modèle. En revanche, l'étude des conséquences de la malabsorption du fructose sur le microbiote sera réalisée sur des souris transgéniques "intolérantes au fructose", modèle animal très adapté au sujet (deux souches seront utilisées).. Des souris de souche sauvage constitueront des « contrôles ». A ce titre, la caractérisation initiale de leur réponse au fructose est

indispensable. Si les souris répondent de la même façon que les rats, par la suite le nombre d'animaux utilisé sera réduit à l'utilisation seule de souris.

Notre projet nécessite l'utilisation de modèles animaux car les mécanismes étudiés mettent en jeu des interactions complexes au sein de l'hôte (identification des bactéries du tractus digestif sur- ou sous- représentées en présence de fructose et conséquences sur l'hôte de ces bactéries ou produits de leur métabolisme) que la culture d'organes séparés ne saurait reproduire. Le nombre d'animaux utilisés (au maximum 190 souris axéniques et 150 rats axéniques) est réduit au minimum possible sans nuire à la qualité statistique des données déterminée lors d'expériences préliminaires. Les animaux devant être hébergés en cage individuelle (pour une mesure précise de la prise alimentaire), leur milieu sera enrichi et ils seront hébergés dans des cages transparentes et ouvertes permettant une interaction visuelle, olfactive et auditive. Ils seront surveillés quotidiennement, et pesés trois fois par semaine.

Le traitement imposé aux animaux (changement de régime alimentaire) est indolore. Les régimes seront constitués au maximum de 40% de sucres (glucose, fructose ou amidon) ce qui est très proche des régimes standards contenant généralement 40-70% d'amidon. La présence de 40% de fructose dans les régimes n'entraîne pas de dysfonctionnement intestinal (douleur, diarrhée etc). Les volumes de gavage seront adaptés aux poids des animaux et celui-ci sera pratiqué par des expérimentateurs entraînés à la contention et au gavage. Les animaux seront habitués à être manipulés tous les jours durant la phase d'adaptation et de régime. Quelques gouttes de sang seront prélevées à la queue pour mesurer la glycémie aux temps 0, 30, 60, 90, 120 min après le gavage. A la fin de l'expérimentation le sang cardiaque sera prélevé après anesthésie.

2054- 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-adrénergique (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 thérapie génique par injection d'adénovirus associés (AAV-9) permettant l'augmentation de l'expression de phosphodiésterases de type 2 ou de type 4 (PDE2A, PDE4B des enzymes dégradant 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. 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 356.

2055- L'obésité, dont la prévalence ne cesse d'augmenter, est associée à une diminution de la concentration en 25(OH)D au niveau plasmatique chez les patients obèses comparés au sujets sains. Les mécanismes impliqués dans ce phénomène ne sont pas clairement établis.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier l'effet de l'obésité sur les modifications du métabolisme de la vitamine D.

Nous étudierons

1) les modifications du profil d'expression des différents gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine D au niveau de différents tissus (foie, rein, muscle et plus particulièrement le tissu adipeux) dans un modèle validé d'obésité induite par l'alimentation

2) l'impact de cette prise de poids sur la quantité de vitamine D et de ses métabolites dans les différents tissus.

Les souris seront nourries pendant 8 semaines avec un régime contrôle contenant une faible quantité de lipide et avec des quantités croissantes de lipides.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 40 animaux, répartis en 4 groupes. Des groupes de 10 animaux sont nécessaires afin de pouvoir mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les différents paramètres étudiés. Les animaux seront hébergés en cage conventionnelle par groupe de 3 ou 4 individus, et l'environnement sera enrichi par l'ajout d'igloos et de nid végétal. Un suivi de croissance sera réalisé par pesée toutes les semaines et une mesure de la consommation.

A l'issue des 8 semaines de régime, les animaux seront euthanasiés afin de prélever les tissus d'intérêt.

Le principe des 3Rs sera respecté qui consiste à réduire, remplacer et raffiner l'expérience.

2056- Nous voulons étudier dans ce projet les mécanismes cellulaires et moléculaire impliqués dans la douleur oculaire Les pathologies de la surface oculaire représentent un des principaux motifs de consultation pour douleurs oculaires en Ophtalmologie. Ainsi, on estime qu'entre 15 et 25% de la population âgée de plus de 65 ans présente une sécheresse oculaire symptomatique avec douleurs. En outre, plus de 60 millions de patients glaucomateux dans le monde sont traités avec des collyres, et plus de la moitié d'entre eux se plaignent de symptômes douloureux et d'irritation de la surface oculaire. Cette douleur chronique de la surface oculaire entraîne, au-delà de la souffrance ressentie par les patients, une véritable atteinte de leur qualité de la vie puisque qu'on estime que près de 60% des patients sont gênés dans leurs activités quotidiennes. Parallèlement, 80% de ces patients douloureux estiment que leur douleur n'est pas suffisamment prise en considération.

La sensibilité somatique de la face, des cavités buccale et nasales, ainsi que des méninges est assurée, pour l'essentiel, par les trois branches du nerf trijumeau, les nerfs ophtalmique, maxillaire et mandibulaire. Le nerf ophtalmique donne naissance aux nerfs ciliaires courts et longs responsables de l'importante innervation cornéenne. Cette densité en terminaisons nerveuses est une des caractéristiques remarquables de la cornée, ce qui en fait le tissu le plus innervé de l'organisme. En effet, il a été estimé que l'épithélium cornéen comprend 300 à 600 fois plus de terminaisons libres nerveuses que le derme et 20 à 40 fois plus que la pulpe dentaire.

Les douleurs chroniques oculaires sont malheureusement parmi les plus invalidantes et les plus difficiles à traiter, et leur mécanisme physiopathologique, de nature neurogène et/ou inflammatoire, demeure de nos jours très mal connu ce qui nécessite une meilleure compréhension des mécanismes sous-tendant la douleur oculaire.

Ce programme de recherche nécessitera l'utilisation de 300 rats males adultes Sprague Dawley et de 664 souris males et femelles adultes C57Bl6/J. Ces deux espèces adultes sont celles les plus utilisées à ce jour pour étudier et mieux comprendre les pathologies oculaires. De plus, à ce jour, il n'existe pas encore des systèmes in vitro pouvant mimer la pathologie étudiée.

L'ensemble des animaux impliqués dans ce projet sera examiné bi-quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. L'ensemble des animaux dispose d'un enrichissement dans leur cage (bâton à ronger et maison en carton). Enfin, le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

2057- Les Rétinopathies Pigmentaires (RP) touchent environ une personne sur 4 000 dans les pays occidentaux, et se caractérisent par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet puis à cône, entraînant une perte progressive de la vision ou une cécité.

Des études antérieures ont révélées une augmentation de l'expression d'un récepteur appelé Nr4a1 dans la couche des photorécepteurs à bâtonnet de la rétine avant leurs dégénérescences. Du fait que dans la littérature, Nr4a1 soit impliqué à la fois dans les mécanismes de survie et de mort cellulaire, nous envisageons dans ce projet d'analyser les conséquences d'une absence spécifique de Nr4a1 au niveau des photorécepteurs à bâtonnet dans les phases précoces de leur dégénérescence chez la souris rd1, [souris RhoCre:Nr4a1lox/lox;rd1]. La souris rd1 est un modèle murin de rétinite pigmentaire couramment étudié en science. Nous étudierons aussi le phénotype visuel des souris RhoCre:Nr4a1lox/lox au cours du vieillissement (une année).

L'activité des photorécepteurs à cône et à bâtonnet sera mesurée par un électrorétinogramme (ERG) et la structure des couches de la rétine sera visualisée par tomographie par cohérence optique (OCT). Au total, 40 animaux seront nécessaires pour cette étude. Les rétines seront ensuite récupérées pour analyses histologiques et biochimiques complémentaires. L'activité des photorécepteurs ne pouvant être enregistrée qu'in vivo, nous avons besoin de recourir à l'animal pour ce projet. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des carrés de cellulose et des bâtons à ronger. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

2058- Un certain nombre d'études ont mis en évidence que le mode de vie occidental (alimentation riche, consommation d'alcool, tabagisme) ne pouvait pas expliquer à lui seul l'augmentation de l'incidence des cancers et plus particulièrement le carcinome hépatocellulaire (CHC). En effet, des études ont également montré que l'obésité et le surpoids pouvait être impliqués dans certains cancers dont le CHC.

Ces deux pathologies sont des facteurs favorisant les troubles métaboliques notamment au niveau hépatique. Ainsi, le foie est un organe qui peut être atteint par un excès de lipides et développer une stéatose (accumulation de triglycérides). Bien que la stéatose soit une lésion bénigne à court terme, elle peut évoluer, à long terme, vers des maladies hépatiques chroniques plus sévères comme la stéatohépatite non alcoolique (stéatose avec nécroinflammation), la cirrhose et le CHC. Dans ce contexte, il y a un besoin social urgent d'identifier les facteurs (pouvant être en relation avec l'environnement) qui participent à cette évolution, dans le but de réduire l'incidence des pathologies hépatiques, notamment le CHC. L'élimination complète des contaminants environnementaux naturels ou de synthèse étant techniquement infaisable, l'exposition de l'Homme aux toxiques chimiques est inévitable, notamment par la nourriture. C'est pourquoi, il est nécessaire de développer des études sur les effets biologiques et toxicologiques de ces contaminants et d'accroître nos connaissances sur les mécanismes d'action, notamment en interaction avec le mode de vie et des facteurs préexistants comme des maladies métaboliques. De nos jours, l'impact de ces mélanges sur le développement de pathologies hépatiques chez les populations fragilisées reste à préciser.

Notre projet vise donc à analyser les effets d'un contaminant environnemental (Benzo[a]pyrène (B[a]P)) auquel nous sommes exposés quotidiennement et soupçonné d'induire des dommages au foie chez l'Homme. Les effets de ce contaminant seront également évalués lors d'une prise concomitante d'alcool, facteur connu pour induire des enzymes du métabolisme hépatique comme le CYP2E1, tout en tenant compte de la population présentant une stéatose hépatique. Afin d'étudier si des facteurs préexistants comme la stéatose ou la consommation d'alcool potentialisent l'évolution en stéatohépatite, nous prendrons comme modèle des souris mâles standards C57BL/6j. Ces dernières seront nourries avec un régime riche en lipides (régime hyperlipidique). L'alcool sera administré via l'eau de boisson et le B[a]P sera administré via la nourriture. Ce projet nécessitera un total de 70 animaux répartis en différents groupes de traitements.

Dans le respect de la règle des 3R : Réduire, Remplacer, Raffiner : nous avons réduit le nombre de groupe au minimum pour mener à bien notre étude et le nombre d'individu par groupe a été déterminée grâce à l'expertise que nous avons au sein du laboratoire et à des tests statistiques. De plus, nous aurons recours à des techniques in vivo peu invasive pour prélever des échantillons sanguins de manière mensuelle permettant de mesurer les taux de transaminases (ASAT et ALAT) et d'antioxydants totaux, ceci dans le but d'évaluer la toxicité hépatique au cours du temps sans sacrifier d'animaux supplémentaires. Ces prélèvements effectués sur la veine temporale ne sont pas source de souffrance et ne nécessitent pas l'usage d'anesthésiques ou d'antalgiques. De plus, l'administration d'un régime hyperlipidique durant quatre mois est couramment utilisée et n'est pas source de souffrance. Enfin, le B[a]P à faible dose (max 15mg/kg de poids corporel/jour) et l'alcool contenu dans l'eau de boisson ne devraient pas non plus être source de douleurs. Pour s'en assurer, un suivi attentif et quotidien basé sur l'observation du comportement et de l'aspect des animaux sera mené durant toute la durée du projet afin de déceler tout signe d'angoisse, de douleur ou de souffrance. Une grille d'évaluation de l'état de chaque animal sera utilisé pour déterminer un score qui décidera de la poursuite de l'expérimentation ou non. Au terme de l'expérimentation, le maximum d'échantillons seront recueillis : du sang, des tissus adipeux, hépatique et musculaire. En parallèle, afin de remplacer l'usage d'animaux, des expérimentations in vitro seront effectuées sur une lignée hépatique humaine (HepaRG) pour déterminer plus précisément les mécanismes impliqués dans la cytotoxicité de cette association stéatose/alcool/B[a]P ou individuellement et les modifications métaboliques et moléculaires associées.

2059- Le dosage d'hormones (cortisol et ocytocine) nécessite la fabrication de réactifs à partir de plasma d'ovins. Ce plasma est utilisé en qualité de support réactionnel du principe de l'analyse. Actuellement il n'existe pas de matrice synthétique en substitution du plasma. Il faut prélever 1 litre de sang. Pour ne pas impacter sur l'état de fatigue des agnelles nous répartissons cette quantité prélevée sur 5 agnelles de manière à ne prélever que 200 ml / agnelle. Les prélèvements seront réalisés à la jugulaire. Afin de minimiser le stress lors du prélèvement les animaux restent avec leurs congénères et sont maintenus debout la tête reposée sur la main du préleveur. La quantité de sang prélevée ne contraint l'animal que 2 à 3 minutes et n'a pas de conséquence sur sa santé.

2060- Avec la diminution continue des espèces de pêche, le recours à l'aquaculture se fait de plus en plus pressant pour satisfaire une demande mondiale sans cesse grandissante en poissons de qualité. Pourtant, les techniques d'élevage demeurent largement limitées par notre connaissance encore restreinte des mécanismes qui contrôlent la reproduction des poissons.

L'hypothalamus et l'hypophyse sont des acteurs essentiels de l'axe reproducteur chez les Vertébrés mais la relation entre les 2 n'est toujours pas très bien comprise. Nous proposons d'utiliser le modèle du poisson-zèbre (*Danio rerio*) pour disséquer les mécanismes permettant la régulation par l'hypothalamus des hormones hypophysaires de la reproduction.

Nous utiliserons des techniques d'imagerie à haute résolution sur des poissons exprimant des marqueurs fluorescents spécifiques des cellules de l'hypophyse impliquées dans la reproduction.

Il s'agit d'une étude terminale conduite sous anesthésie, sur un total de 160 poissons juvéniles (14 jours après fécondation) ou adultes des 2 sexes, répartis en groupes expérimentaux de 10 individus (le recours à des animaux exprimant plusieurs marqueurs fluorescents à la fois permettra de réduire le nombre d'animaux impliqués). La complexité du système hypothalamo-hypophysaire ne pouvant pas être reproduite in vitro, le recours à l'expérimentation animale est inévitable ici. Les animaux seront élevés dans des bacs appropriés, en tenant notamment compte des besoins spécifiques à la reproduction (boîtes de croisement, avec murs de séparation, et ajout de plantes en plastique).

Les résultats de ce projet permettront de mieux apprécier comment les différents stades de reproduction sont régulés chez les vertébrés. Plus spécifiquement un impact est attendu vers une amélioration des techniques d'aquaculture

2061- Les douleurs chroniques neuropathiques apparaissent suite à des lésions affectant le système somato-sensoriel induisant une sensibilisation des neurones nociceptifs primaires et des neurones de second ordre de la moelle épinière. Cet état de sensibilisation conduit à l'apparition de réponses anormales à des stimuli non nociceptifs (allodynie) et à des stimuli nociceptifs (hyperalgie). Bien qu'il existe des médicaments « anti-douleur », un certain nombre de ces syndromes de douleur neuropathique échappent complètement à ces thérapies. Une meilleure compréhension des mécanismes sous-tendant l'apparition et le maintien des douleurs chroniques neuropathiques permettrait donc d'explorer de nouvelles voies thérapeutiques. Dans ce but nous utiliserons le modèle de constriction chronique du nerf sciatique (modèle de Bennett, CCI) réalisé chez le rat mâle de souche Sprague Dawley (rat sauvage). Au total 2520 rats seront nécessaires dans cette étude.

Les rats seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Tous les rats ont à disposition dans leur cage un enrichissement (des lambeaux de papier Kraft et des bâtons à ronger). Le nombre

d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

2062- Un anévrisme est une dilatation localisée de la paroi d'une artère aboutissant à la formation d'une poche de taille variable et susceptible de se rompre avec un risque important de mortalité.

Dans la neuroradiologie interventionnelle, le traitement des anévrismes cérébraux constitue le chapitre le plus complexe car le geste est très précis et passe par une courbe d'apprentissage assez longue. Dans l'ensemble des procédures pour le traitement des anévrismes cérébraux, la pose de stent intracrânien du type « flow diverter » est considérée comme l'une des plus difficiles. La navigation dans les artères cérébrales exige une association de mouvements coordonnés ; la pose d'un stent nécessite aussi une séquence des mouvements pour être réussie. Le moindre problème dans la navigation ou la pose du stent peut amener à un déficit neurologique permanent chez le patient. L'apprentissage des nouveaux neuroradiologues doit passer par un entraînement chez un modèle animal similaire à l'homme en termes de tailles des artères générales et cérébrales.

Cette formation a été préparée de façon à respecter le principe des 3R :

Remplacement : Les chirurgiens accueillis au sein de cette formation sont déjà expérimentés à la pratique, ce sont de jeunes internes ou chefs de cliniques. La veille de la journée pratique, la journée est dédiée à la formation théorique et à un rappel sur la méthode de la pose de stents, les indications, le matériel, les précautions. Des photos sont montrées aux stagiaires pour bien détailler les approches techniques.

Il est envisagé de mettre à disposition des modèles d'entraînement en silicone : ces modèles, très onéreux, sont en phase de fabrication. Ils permettront de proposer une étape supplémentaire préalablement à l'entraînement sur modèle animal. Pour autant, cette chirurgie très délicate aux effets secondaires extrêmement délétères ne saurait être mise en pratique chez l'homme avant entraînement sérieux sur l'animal.

Réduction : Douze stagiaires sont attendus par session : un nombre de 2 porcs est jugé suffisant pour le passage à l'acte de chaque stagiaire en conditions réelles : ils auront accès chacun à une carotide de taille suffisante pour ce geste (carotide commune droite et gauche, carotide externe droite et gauche, carotide interne droite et gauche soit 6 artères). Ce projet sur 5 ans nécessitera donc 10 animaux au total pour un nombre de 60 personnes formées.

Raffinement : les animaux seront transférés directement de l'élevage à la salle d'anesthésie pour éviter tout stress durable. La procédure sera réalisée sous anesthésie générale avec un protocole analgésique adapté. La manipulation douce des animaux facilitera la qualité de l'anesthésie. Outre l'anesthésie, la seule procédure réalisée sera un cathétérisme de l'artère fémorale et suivi du trajet du cathéter par amplificateur de brillance.

2063- L'évaluation pré-clinique de l'immunotoxicologie est régie par des lignes directrices internationales. Cette évaluation est faite pour tout nouveau médicament en développement et permet d'apprécier le potentiel effet immunotoxique d'un produit correspondant à la diminution (ou suppression) ou l'augmentation de la réponse immunitaire.

Cette évaluation réalisée chez le rat comporte une analyse des sous-populations lymphocytaires ainsi qu'une évaluation de la production d'anticorps spécifiques suite à l'injection d'un antigène connu (réponse dépendante des lymphocytes T (TDAR)).

Ce projet concerne au maximum 3030 rats pour 5 ans.

Dans le cadre de ce projet, le recours à l'animal de laboratoire (rat) est requis par les lignes directrices (ICH S8). Il n'existe pas actuellement de méthode alternative réglementaire permettant d'évaluer la réponse immunitaire dans son ensemble. Cependant, la stratégie d'évaluation globale du potentiel immunotoxique d'un produit décrit dans la ligne directrice permet de limiter le nombre d'études réalisées et l'harmonisation des pratiques a permis de limiter les espèces utilisées au rat.

Les études réalisées au sein du centre de recherche, par du personnel formé et compétent, sont encadrées par des recommandations internes, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (éthique, hébergement, soins, manipulation, expérimentations), et ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal (utilisation d'anesthésiques et d'antalgiques). Un support en biostatistiques est apporté par des experts de la spécialité, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées, et réduire le nombre d'animaux utilisés. Tous ces éléments assurent l'application maximale du principe des 3R.

2064- Le vieillissement de la population engendre une constante augmentation du nombre de patients atteints de maladies neurodégénératives chroniques, telle que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson. Ce domaine médical souffre actuellement d'un manque de thérapeutiques capables de ralentir le développement de la maladie. Ce projet est destiné à mettre en œuvre des modèles animaux mimant les phénomènes mis en jeu dans ces pathologies, afin d'évaluer les traitements médicamenteux innovants issus de la recherche et d'identifier des biomarqueurs qui pourront être utilisés lors des essais cliniques. Ces modèles sont développés chez les rongeurs (rat et souris). Les rats et les souris sont les espèces les plus couramment utilisées dans le domaine des maladies neurodégénératives. Ces espèces présentent l'avantage de fournir des souches stables et bien caractérisées ce qui permet une bonne reproductibilité des modèles et donc une optimisation du nombre d'animaux à inclure dans les études. La nécessité d'utiliser ces 2 espèces est liée d'une part à des sensibilités différentes d'espèces aux différents modèles et tests comportementaux, et d'autre part au fait que la souris est l'espèce la plus couramment utilisée pour le développement d'animaux transgéniques.

Ces modèles concernent des études soit de courte ou moyenne durée, soit de longue durée (plusieurs mois). Dans le premier cas il s'agira de modéliser des mécanismes physiopathologiques précis impliqués dans ces maladies afin de valider les cibles biologiques travaillées. Dans le second cas, il s'agira d'induire un développement progressif des phénomènes de neurodégénérescence afin de s'approcher au plus près du décours temporel de ces pathologies. Ces différents modèles font

appel soit à des techniques d'administration de neurotoxines, ou de protéines pathologiques par voie générale ou centrale, soit à des modifications génétiques (souris ou rats transgéniques). Pour préciser le profil des produits étudiés ce projet inclut aussi la possibilité de conduire des études de pharmacocinétique couplées à des évaluations d'activité sur les cibles biologiques et les différents biomarqueurs d'intérêt.

Notre établissement s'attache à réduire au maximum l'usage des animaux dans le développement de nouvelles thérapeutiques. Ainsi les candidats-médicaments ne sont évalués dans ce type de modèles qu'après un tri important via des méthodes de biochimie et biologie cellulaire *in vitro*, permettant de retenir les quelques candidats les plus prometteurs, qui présentent le meilleur index thérapeutique *in vitro* (rapport/activité/profil précoce ADME/toxicité potentielle). De plus ces modèles incluent à la fois des tests comportementaux et des mesures de paramètres biochimiques. Cela permet d'évaluer différents paramètres en parallèle réduisant ainsi le nombre d'études et permettant de corréliser ces différents marqueurs cliniques et biologiques. Ces informations sont nécessaires et indispensables pour la mise en œuvre des futurs essais cliniques de façon pertinente et sûre. Le cerveau est constitué de plusieurs types cellulaires différents qui interagissent pour la mise en œuvre des processus physiologiques mais aussi neurodégénératifs. Il présente de plus la particularité d'avoir une grande capacité de plasticité et d'être très dépendant de sa vascularisation. Cette dynamique du fonctionnement physiopathologique du cerveau et sa traduction en capacités mnésiques, associatives et motrices ainsi que le lien avec des biomarqueurs centraux et périphériques ne peuvent être évalués que par les études chez l'animal. Un support du service des biostatistiques est apporté aux expérimentateurs afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées, et réduire ainsi le nombre d'animaux utilisés dans les études tout en garantissant la validité des résultats.

Nous nous attachons à améliorer les conditions des études en optimisant les conditions d'hébergement (en particulier par l'enrichissement adapté aux besoins des rongeurs), en réduisant les contraintes de traitement par incorporation des produits dans la nourriture ou l'eau de boisson pour les études chroniques, en privilégiant les modèles transgéniques à phénotype non-dommageable, en utilisant les anesthésiques et analgésiques les mieux appropriés en cas de chirurgie (pour les administrations centrales) pour préserver la validité du modèle tout en réduisant les douleurs liées aux incisions de la peau. Les phénomènes de neurodégénérescence centrale ne produisent pas par eux-mêmes de phénomènes douloureux. Pour l'ensemble des procédures des points limites généraux et spécifiques sont identifiés. Cela permet au personnel en charge des expérimentations et des soins aux animaux (formé à l'observation des signes cliniques) d'identifier rapidement toute manifestation inattendue et de prendre les mesures nécessaires dans l'intérêt de l'animal.

Ces études sont conçues et mises en œuvre par des personnels experts scientifiques formés spécifiquement à l'observation des animaux, et en lien constant avec les personnels de soins aux animaux, et les vétérinaires de l'établissement. Ces procédures sont discutées et approuvées par le comité d'éthique avant leur mise en œuvre, et celle-ci se fait en lien avec la structure chargée du bien-être de l'animal, afin de permettre une amélioration constante des conditions de recours à l'animal. Le nombre maximal d'animaux utilisés dans le cadre de ces modèles est estimé à 50000 souris et 5000 rats par an.

2065- Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer les effets potentiellement bénéfiques d'un candidat médicament chez des rats dyskinétiques, complication motrice fréquemment observée chez des patients parkinsoniens suite à l'administration chronique de levodopa (L-DOPA).

Au cours de chaque étude, les animaux reçoivent deux injections intra-cérébrales de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) qui vont induire la perte sélective de neurones dopaminergiques dans les voies nigro-striées. Environ 2 semaines après chirurgie, les rats les plus atteints sont sélectionnés grâce à l'observation du comportement de rotation induit par l'administration d'amphétamine. Environ 4 semaines après chirurgie, ces rats sont traités pendant 3 semaines avec de la L-DOPA et de la benserazide (composé qui va ralentir la transformation de L-DOPA en dopamine et de ce fait favoriser la pénétration de la L-DOPA dans le cerveau). Pendant cette période, des dyskinésies vont apparaître qui seront quantifiées grâce à des échelles de scores. Une fois dyskinétiques, les rats sont traités selon un design en *cross-over* avec le produit testé à 3 doses différentes, un produit de référence ou le véhicule qui a servi à préparer la formulation du produit testé (nombre prévisionnel maximum de 720 animaux sur 5 ans).

Règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement.

Ce projet est réalisé sur le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences *in vitro*) pour évaluer les effets d'un candidat médicament sur les déficits moteurs dans le cadre de la maladie de Parkinson. A ce jour, le rat est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude. Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique. Dans ce projet, le raffinement est effectué par la mise au point de procédures rigoureuses, la formation du personnel, la recherche des points limites, le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

2066- Le projet vise à permettre la commercialisation d'une hormone de croissance destinée à optimiser la production des animaux de rente. L'usage zootechnique de cette hormone de croissance est autorisé dans la plupart des pays spécialisés en productions animales. La libération des lots de fabrication de cette hormone de croissance requiert un test biologique chez le rat qui, outre l'autorisation de commercialisation, permet aussi de contrôler la concentration active. Ce test biologique chez le rat s'effectue chez des femelles dont la fonction hypophysaire spontanée a été supprimée ; l'hormone de croissance administrée permet donc de compenser une carence induite. Il s'agit là d'un test très codifié et très précis qui répond pleinement aux exigences de la réglementation. Chaque concentration de chaque lot de production est évaluée sur un minimum de 15 rats femelles pour permettre une interprétation statistique discriminante. Compte tenu des besoins en productions animales, le nombre total de rats femelles utilisés est de l'ordre de 13600 animaux sur une période de 5 ans. Les

animaux sont hébergés dans un environnement enrichi et font l'objet d'une surveillance quotidienne par un personnel qualifié. En cas de signes cliniques, des mesures appropriées seront prises pour éviter la souffrance des animaux.

2067- L'hématopoïèse est le processus de production de l'ensemble des cellules immunitaires. Ce processus a lieu principalement dans la moelle osseuse chez le mammifère adulte à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

Or, la présence de CSH particulières a été récemment proposée dans d'autres tissus notamment le tissu adipeux, mais leur importance physiologique et physiopathologique reste à ce jour mal connue. Les études antérieures menées chez l'animal ont néanmoins montré que les CSH du tissu adipeux sont capables de générer dans ce tissu les cellules de l'immunité innée.

Ce projet consiste à étudier chez la souris le rôle physiopathologique des CSH du tissu adipeux et notamment leur capacité à générer des cellules immunitaires capables de participer aux réactions inflammatoires qui se produisent lors du développement des maladies métaboliques (obésité, diabète). Nous comparerons cette activité à l'activité hématopoïétique médullaire classique.

Pour suivre l'activité hématopoïétique de CSH in vivo, il est nécessaire de les injecter chez une souris préalablement irradiée.

La descendance des CSH est ensuite étudiée en conditions physiologiques ou pathologiques afin de déterminer

- dans quelles conditions les CSH sont capables de produire des cellules immunitaires

- quelles cellules immunitaires sont produites, dans quels organes sont-elles localisées, et quelle est leur fonction.

Nous transplanterons donc des CSH isolées à partir de souris donneuses saines ou obèses/diabétiques, chez des souris receveuses elles-mêmes saines ou obèses/diabétiques, afin de déterminer comment l'obésité ou le diabète modifient l'activité hématopoïétique des CSH de tissu adipeux et de moelle osseuse.

Compte tenu de la variabilité de la reconstitution hématopoïétique, des différentes conditions physiopathologiques, nous avons prévu d'utiliser un maximum de 3496 souris sur 5 ans.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet.

Remplacement : Pour ce projet, le recours à l'expérimentation sur des animaux est indispensable. En effet, un certain nombre d'études ont déjà été réalisées in vitro et ont montré que les CSH du tissu adipeux sont multipotentes. Cependant, les cellules immunitaires produites à partir des CSH sont des cellules circulantes, qui interviennent dans de nombreux organes, et il est donc nécessaire de travailler chez l'animal pour étudier la physiopathologie intégrée de ces cellules.

Réduction : Les effectifs des cohortes sont limités par l'outil statistique (test de Mann et Whitney). Les études antérieures effectuées nous ont permis de d'optimiser l'utilisation de ces modèles murins, permettant de ce fait d'en réduire le nombre.

Pour chaque expérience, le maximum d'échantillons sont extraits de l'animal afin d'éviter d'avoir à reproduire l'expérience par manque de matériel biologique.

Raffinement : L'expérimentation fait l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux adaptée à l'expérience et aux potentiels effets indésirables des procédures, sur l'état de santé global des animaux. De plus les protocoles sont réfléchis afin d'être le moins douloureux possible pour l'animal (mode et volume d'injection, durée du traitement...) et les études antérieures nous ont permis de mieux appréhender les points limites pour le bien-être des animaux.

Les différentes procédures décrites dans ce projet ont déjà obtenu l'accord d'un comité d'éthique pour l'expérimentation animale.

2068- L'épithélium rénal assure des fonctions structurales et métaboliques cruciales qui permettent de filtrer le plasma sanguin afin d'éliminer les déchets de l'organisme dans les urines. L'ultrafiltration rénale dépend de l'intégrité de cellules épithéliales du glomérule rénal nommées podocytes. Ces cellules hautement spécialisées sont lésées chez 90% des patients souffrant de maladies chroniques rénales et leur incapacité à se régénérer conduit à terme au développement d'insuffisance rénale terminale.

Les podocytes sont décrits comme des cellules quiescentes incapables de proliférer et ayant une capacité de régénération très limitée suite à une lésion ou en conditions homéostatiques. Malgré ce concept prépondérant, nous avons montré, par l'emploi de souris génétiquement modifiées, que l'induction de la surexpression d'un transgène dans le rein de souris adulte, induit une dédifférenciation et une prolifération massives des podocytes. De plus, nous avons montré que l'arrêt de la surexpression de ce transgène induit la régénération de podocytes quiescents et fonctionnels. Ces résultats nous ont amenés à émettre l'hypothèse que les podocytes possèdent une capacité de régénération latente, un potentiel révélé par l'activation d'une voie de signalisation faisant intervenir le transgène utilisé. En plus de cette régénération forcée observée dans notre modèle de souris transgéniques, nos résultats récents montrent que les podocytes possèdent un potentiel de régénération endogène qui est activé suite à l'induction d'une lésion podocytaire. Les objectifs de ce projet sont de (1) caractériser les mécanismes permettant une régénération efficace et endogène des podocytes, et (2) mettre en place un modèle d'insuffisance rénale chronique qui permettra, ultérieurement, de tester l'effet thérapeutique de notre transgène sur l'évolution de cette pathologie. La complétion du projet présenté ici permettra d'éclaircir les mécanismes responsables du renouvellement de l'épithélium rénal, et fournira des connaissances cruciales pour le développement de stratégies thérapeutiques permettant de traiter les patients atteints de maladies rénales.

Dans notre étude, nous allons utiliser un modèle de régénération endogène et d'insuffisance rénale pouvant présenter un phénotype dommageable. Ce modèle est associé à une élévation du taux de protéinurie reflétant une dysfonction de la filtration rénale dès 5 jours après injection d'une toxine podocytaire. Cette lésion est réversible mais doit être suivie régulièrement. Par ailleurs, nous allons induire deux lésions successives afin de mettre en place un modèle d'insuffisance rénale chronique. Les souris soumises à ce protocole seront suivies régulièrement.

Le processus biologique que nous souhaitons caractériser est complexe et dépend de la mobilisation simultanée de plusieurs populations cellulaires au sein d'un même organe. L'utilisation de systèmes de cultures cellulaires in vitro ne nous permettrait pas d'étudier les interactions cellulaires intervenant dans ce processus biologique, et il apparaît donc indispensable d'étudier ce processus in vivo. Pour limiter l'impact de nos expérimentations sur le bien-être des animaux, nous avons mis en place un suivi strict et régulier de la douleur et du stress potentiellement engendrés par les procédures expérimentales grâce à l'utilisation de grilles de scores. Le nombre de souris par groupe expérimental a été défini afin de permettre un bon suivi des animaux au cours de l'expérimentation, tout en permettant d'obtenir un nombre suffisant de données afin de réaliser des tests statistiques. Dans un objectif de raffinement, les souris incluses dans les procédures de ce PEA seront hébergées dans des cages avec un milieu enrichi. Pour réaliser ce projet sur 5 ans, nous utiliserons un maximum de 510 animaux. Parmi ces animaux, 20 souris serviront à la mise au point des techniques d'analyses, ce qui nous permettra d'optimiser et de réduire le nombre d'animaux des lots expérimentaux et témoins.

2069- En Europe comme aux Etats-Unis, le cancer est actuellement la seconde cause de mortalité derrière les maladies cardiovasculaires. En France, le cancer est la cause d'environ 33 % des décès chez les hommes et 23 % chez les femmes. L'utilisation de l'immunothérapie représente une avancée scientifique majeure dans la lutte contre le cancer. Une des techniques consiste à modifier des cellules immunes (globules blancs) afin qu'elles reconnaissent les cellules tumorales et les détruisent spécifiquement. Cette technologie a montré des résultats probants dans le traitement de cancers hématologiques humains. En revanche, le traitement de tumeurs solides par cette technologie n'a pas encore fait ses preuves.

L'objectif de notre projet est de tester l'efficacité anti-tumorale de ces cellules immunes modifiées, en combinaison ou non avec des agents activant la sécrétion de chemokines, chez des souris porteuses de tumeurs solides. Ces chemokines favorisent la migration des cellules immunes modifiées vers le site tumoral.

Au préalable de la mise en œuvre de ce projet une première phase de sélection in vitro va permettre d'identifier les cellules immunes modifiées les plus compatibles et efficaces avec le modèle de tumeur à étudier.

Les études in vivo réalisées dans le cadre de ce projet ont pour but de compléter les résultats in vitro en caractérisant l'efficacité de ces cellules immunes modifiées dans le contexte d'un organisme complexe entier plus proche des conditions pathologiques humaines.

Pour ce faire, nous utiliserons un modèle de souris immunodéficientes, communément utilisées dans ce type de recherches et qui par l'absence de système immunitaire vont permettre de recevoir des greffes de tumeurs et de cellules immunes modifiées humaines en réduisant les risques de rejet.

Nous réaliserons différentes étapes de mise au point afin d'affiner au fur et à mesure nos paramètres et conditions d'études. Chaque étape de mise au point conditionnera ainsi la mise en œuvre de l'étape suivante et permettra de définir, avec l'aide de notre service des biostatistiques, le nombre nécessaire et suffisant d'animaux à inclure pour obtenir un résultat exploitable.

Dans le but de limiter l'utilisation des animaux, nous utiliserons, dans la mesure du possible, des techniques non invasives comme l'imagerie optique qui nous permettra de suivre l'invasion des cellules immunes (cellules exprimant la luciférase) dans l'organisme animal au cours du temps. L'imagerie permet de faire plusieurs acquisitions sur un même animal pour avoir un suivi dans le temps et surtout pour limiter le nombre d'animaux à utiliser.

Ce projet comporte plusieurs phases de caractérisation des cellules immunes modifiées puis de tests d'efficacité anti-tumorales.

Dans un souci de bien-être animal, nos animaux seront stabulés en groupes sociaux tout au long de l'expérimentation et seront surveillés quotidiennement. Ils bénéficieront de plus, d'un enrichissement dédié, leur permettant de nidifier (tubes de coton « cocoon »).

Les expérimentateurs sont formés à la manipulation des animaux et sont capables :

i) d'évaluer une altération de l'état général de l'animal en s'appuyant sur la liste des points limites ii) de mettre en place les mesures nécessaires afin d'éviter toute souffrance de l'animal.

Ces études prévoient l'utilisation de 1600 animaux maximum pour l'ensemble du projet sur les cellules immunes modifiées sur une période de 18 mois.

2070- Ce projet vise à mieux comprendre les effets que peuvent avoir de fines particules de plastiques (microplastiques) s'accumulant dans le réseau trophique des écosystèmes marins, sur la physiologie des poissons.

Les larves de poissons marins, qui éclosent à un stade de développement très précoce et qui sont de fait très sensibles aux facteurs environnementaux, peuvent être naturellement exposées aux microplastiques qui contaminent le plancton. Les effets de cette exposition sur le développement et la physiologie de la larve et du futur juvénile sont, à ce jour, inconnus.

L'objectif de cette expérience est de vérifier si les microplastiques (absorbés par le zooplancton-copépodes) peuvent être transférés par voie trophique vers les larves de bar (*Dicentrarchus labrax*).

Maîtrisant l'élevage larvaire du bar ainsi que l'élevage de copépodes (zooplancton), nous nous proposons d'incuber des copépodes avec des particules de microplastiques et d'en vérifier l'ingestion. Ensuite, ces copépodes seront donnés en nourriture aux larves de bar.

Les tailles et les concentrations de particules ont été déterminées afin de mimer au mieux l'ingestion des microparticules présentes dans le zoo/phyto plancton dans le milieu naturel. Les propriétés fluorescentes des particules utilisées permettront de suivre le devenir des microparticules dans le tractus digestif de la larve. La croissance des larves et plusieurs autres paramètres physiologiques seront appréhendés au cours et à l'issue de l'élevage larvaire (36 000 larves élevées) afin de déterminer l'impact qu'a eu l'ingestion éventuelle des microplastiques sur la physiologie des animaux.

Le nombre de larves mis en expérience a été déterminé au minimum (Réduire) en tenant compte des contraintes zootechniques telles que la densité minimale d'animaux requise pour ne pas induire de perturbations physiologiques et permettre une croissance et un développement harmonieux des poissons (Raffiner). Des protocoles d'anesthésie seront aussi pratiqués avant les prélèvements (Raffiner). Le remplacement (par culture cellulaire, ou système in vitro) n'est pas possible dans le cas de l'étude d'impact d'une ingestion de microplastiques sur le développement larvaire.

Le nombre de bacs utilisés et de poissons prélevés ont été déterminés au minimum tout en permettant une analyse statistique rigoureuse. L'estimation a été faite à partir de données de variabilités obtenues dans des expériences préalables (calcul de la puissance statistique).

2071- Ce projet étudiera des cellules tumorales particulières, nommé "cellules souches cancéreuses" (CSC). Celles-ci, très mal connues, pourraient être les principaux responsables de la prolifération tumorale et des résistances aux traitements anticancéreux. Néanmoins, la difficulté à trouver des gènes spécifiques de ces CSC handicape la recherche. Identifier ces gènes, ou simplement mettre en évidence un gène important pour les CSC, permettrait de les suivre dans le développement tumoral pour comprendre leurs fonctions ou les cibler.

Nous étudierons l'expression et la fonction de Wip1 et de Dkk3, des marqueurs possibles de CSC, dans un contexte normal mais aussi dans un contexte de cancer intestinal. Nous utiliserons donc 2 modèles cancéreux, nommés APCminus et APCflox, caractérisés par une mutation du gène APC favorisant le développement de cancers intestinaux.

Les souris APCminus, développant spontanément des polypes intestinaux surtout entre la 8ème et la 15ème semaine, ont une durée de vie de 160 jours. Elles seront utilisées pour étudier Wip1 et Dkk3 dans les CSC de tumeurs déjà existantes.

Les souris APCflox auront le gène APC muté seulement après injection de tamoxifène (produit non toxique aux concentrations utilisées) et seulement dans les cellules exprimant Wip1 et Dkk3. Cette souche permettra d'étudier comment ces cellules deviendront des CSC créant des tumeurs intestinales. Les APCflox ne développent des tumeurs dommageables pour leur santé qu'après 3 mois, moment où elles seront sacrifiées.

Les questions du projet seront: Dans quelles cellules souches sont exprimés Wip1 et Dkk3? Quels types de cellules "différenciées" ou cancéreuses proviennent de ces cellules? Comment les CSC exprimant Wip1 et Dkk3 peuvent initier le développement tumoral ?

Pour répondre à ces questions nous utiliserons les techniques du "traçage cellulaire" et "d'oblitération de lignée cellulaire". Le traçage cellulaire consiste à marquer les cellules souches (avec une protéine fluorescente par exemple) exprimant les gènes d'intérêts (Wip1 et Dkk3). Cette marque sera conservée dans la descendance de la cellule. On déterminera ainsi quels types de cellules souche et CSC sont présentes, où elles sont situées dans les tissus et quelle est leur descendance. La technique de l'oblitération de lignée cellulaires éliminera les CSC/cellules souches exprimant Wip1 et Dkk3 grâce à l'expression d'un "gène tueur" nommé DTA pour étudier l'importance de ces CSC.

Nous avons pris en compte le respect des 3R en choisissant le nombre d'animaux reproducteurs et expérimentaux (1762). Nous l'avons réduit au maximum en utilisant les tests statistiques pour tirer le maximum de données exploitables à partir d'un effectif le plus réduit possible. D'autre part, nous développons une technique de culture de cellules souches intestinales in vitro. Ce système est coûteux et très artificiel, mais nous l'utiliserons pour vérifier nos résultats sans avoir à tuer de nouvelles souris. Nous utiliserons également des grilles de scores et des contrôles quotidiens pour évaluer le bien-être des animaux et les euthanasier rapidement si nécessaire. Nous utiliserons aussi des accessoires (abri en plastique, nestlets) pour diminuer le stress des animaux. Enfin nous éviterons de modifier les groupes de souris après sevrage afin de ne pas perturber leur cohésion sociale

2072- Ce projet s'inscrit dans le cadre de la recherche d'un antidiabétique efficace à long terme. Cette recherche fait appel à de nombreux tests in vitro permettant de sélectionner grâce à des critères stricts les meilleures molécules dont l'efficacité sera déterminée in vivo dans des modèles précliniques de diabète de type 2. Ces études d'efficacité à long terme de nos molécules in vivo sont majoritairement réalisées dans des modèles pathologiques rongeurs monogéniques ou induits sous régime obésogène. Néanmoins, une limitation majeure des modèles précliniques murins est l'absence du gène CETP qui code pour une protéine de transfert plasmatique essentielle à l'homéostasie du cholestérol chez les espèces supérieures. L'absence de ce gène chez les rongeurs ne permet pas de mesurer de manière fiable l'impact d'une molécule candidate sur le profil lipidique et donc de déterminer son influence sur le risque cardio-vasculaire au sens large. Le Hamster est une espèce qui exprime de manière constitutive la CETP et dont le profil lipidique est très proche de celui de l'homme. Soumis à un régime enrichi en graisse et en fructose, le hamster est considéré comme un modèle physiopathologique présentant toutes les caractéristiques du syndrome métabolique humain à savoir une dyslipidémie dite athérogène ainsi qu'une insulino-résistance marquée. Ce projet a donc pour but de confirmer les propriétés antidiabétiques d'une molécule, établies dans les modèles murins et d'approfondir l'impact du traitement pharmacologique sur l'homéostasie du cholestérol.

L'effet à long terme sur les métabolismes glucidique et lipidique ne peut être détecté qu'après un traitement chronique de plusieurs semaines chez l'animal et requiert la physiologie qui intègre toutes les interactions hormonales et neuronales, ce qui n'est pas le cas sur des cellules ou organes isolés. Il n'y a donc pas de méthode alternative. Le projet fait appel à des animaux sains (contrôle) ou pathologiques. Les hamsters sont hébergés en groupes sociaux dans des cages enrichies de litière adaptée, de bandelettes de papier pour nidifier et se cacher ainsi que de bâtonnets de bois à ronger. Tous ces éléments leur permettent d'exprimer leurs comportements naturels tels que le fouissage, l'exploration ou encore la nidification. Ils font de plus l'objet d'une observation visuelle, comportementale quotidienne, ainsi que d'un suivi de prise alimentaire et hydrique. Afin de le réduire au maximum, le nombre d'animaux utilisés pourra si besoin être réajusté suite à une estimation de la variabilité

statistique des paramètres mesurés sur quelques études pilotes. On estime à 60 le nombre d'animaux par étude et on pense réaliser 4 études par an soit environ 240 hamsters par an pour toute la durée du projet

2073- Les maladies neurodégénératives chez l'Homme, les plus connues étant la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et les démences vasculaires, sont un problème de santé publique majeur, compte-tenu de l'allongement de l'espérance de vie. Les conséquences de ces maladies pour la société sont considérables en raison des handicaps moteurs, intellectuels et psychiques qui en résultent. Ces altérations peuvent aussi s'accompagner de déficits sensoriels, tels que des troubles de l'odorat ou de la perception thermique.

L'évaluation de la perception thermique chez le rongeur permet d'étudier des phénomènes dégénératifs des circuits neuronaux tant périphériques que centraux et donne des indications sur certains mécanismes neurodégénératifs et sur leur modulation potentielle par des agents pharmacologiques.

Ce projet s'inscrit dans le cadre de la compréhension physiopathologique des troubles de la perception thermique et de la recherche de médicaments visant à lutter contre les processus neurodégénératifs. Ainsi, il s'agit de mesurer les réactions comportementales après un bref contact des animaux au chaud ou au froid, qui sont modulables par l'activité pharmacologique de nos molécules.

Les rongeurs utilisés pour ces études peuvent être des souris « sauvages » (fond génétique non modifié) ou bien des souris transgéniques, exprimant un ou plusieurs gènes d'intérêt, identifiés comme ayant une incidence sur l'apparition d'un phénotype modélisant une maladie, ou bien des souris n'exprimant plus une cible (knock-out pour l'expression d'un gène) afin, entre autre, de valider une cible. Ces souris sont des modèles précliniques, à forte valeur translationnelle à l'homme, qui permettent l'identification de nouveaux biomarqueurs et/ou de nouvelles cibles à l'origine de l'apparition de ces pathologies.

En fonction de la nature des recherches (validation d'une cible, compréhension d'un mécanisme physiopathologique ou études de sélection de molécules ayant un potentiel thérapeutique), la position du test dans le processus de recherche est soigneusement déterminée afin d'en tirer le maximum d'informations possible. D'une manière générale, dans le cas d'études pharmacologiques, le test est mis en œuvre après des informations obtenues sur les molécules via des tests *in vitro* et une première évaluation des doses d'intérêt à utiliser *in vivo*.

Les animaux sont soustraits au test dès qu'ils font une tentative d'évitement (saut) ou s'ils n'en font pas, au bout d'une minute d'exposition au stimulus. Les températures appliquées sont déterminées pour permettre a minima une réponse comportementale mais en aucun cas ne peuvent conduire à une atteinte physique dermique, telle qu'une brûlure.

Ce test, requérant des circuits de perception neuronale complets (neurones sensitifs et moteurs périphériques et ascendants au niveau central), est pratiqué sur l'animal entier et ne peut être remplacé par des conditions expérimentales partielles.

On peut estimer sur la durée du projet (5 ans) une utilisation de 3460 animaux par an (normaux ou transgéniques), chiffre qui sera modulé par un avis biostatistique. En effet, en fonction du type d'information recueillie (fonction sensorielle « pure » sur un animal transgénique ou réponse à un agent pharmacologique), le service biostatistique, avec une quantité pertinente de données générées expérimentalement qui révélera la variabilité du paramètre, déterminera le nombre nécessaire et suffisant d'animaux qui permettra de tirer une conclusion fiable.

2074- La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une dégénérescence progressive de la macula, partie centrale de la rétine, qui apparaît le plus souvent à partir de 65 ans. En France, environ 1,3 millions de personnes seraient atteintes de DMLA dont 12 % de la population entre 65 ans et 75 ans. C'est la principale cause de cécité non corrigeable chez les personnes âgées dans le monde occidental.

On ne connaît pas les causes précises de cette maladie et on ne sait pas la guérir. Il existe deux formes : la forme atrophique et la forme exsudative. Elles peuvent toutes deux coexister sur le même œil. La forme exsudative (ou "humide") correspond à l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins au niveau de la choroïde qui, à terme, peuvent provoquer des hémorragies sous-rétiniennes et accélérer l'évolution vers la cécité. Les traitements existants permettent seulement de ralentir son évolution. Pour trouver de nouveaux traitements efficaces et préventifs nous devons comprendre davantage les mécanismes cellulaires et moléculaires de la DMLA en général, et de la forme humide en particulier. Cette maladie, résultat d'une interaction complexe entre différents types cellulaires juxtaposés, elle ne peut être modélisée dans des systèmes *in vitro*. L'apparition de nouveaux vaisseaux sous-rétiniens peut être expérimentalement induite par photocoagulation provoquée par laser surdosé. La photocoagulation laser chez le rongeur est le modèle le plus utilisé à travers le monde pour « mimer » la DMLA exsudative et est aussi la résultante d'interactions complexes entre différents types cellulaires. Afin d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires en amont ainsi qu'en aval de la néo-vascularisation choroïdienne (NVC), nous soumettons nos modèles animaux à des impacts laser afin de déclencher la NVC. Quarante-huit heures après photocoagulation, les animaux subissent un traitement par injection intra-vitréenne (IVT) de molécules modulant l'activité de voies moléculaires d'intérêt. Les souris sont ensuite sacrifiées à différents temps pour analyses. Nous analysons l'implication des différents acteurs cellulaires impliqués dans la DMLA, leurs médiateurs chimiques et, une fois le mécanisme résolu, les animaux sont traités avec des inhibiteurs spécifiques pour développer une thérapie sur ce modèle.

L'utilisation du modèle animal est indispensable pour notre étude. Un total de 852 souris seront nécessaires à ce projet.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les conditions d'hébergements seront adaptées au modèle expérimental. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé cidessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

2075- Le monoxyde d'azote permet de diminuer la pression artérielle car il dilate les vaisseaux. Lors de nombreuses pathologies (diabète, hypertension, athérosclérose, ...), l'organisme produit moins de monoxyde d'azote. Il faut donc en administrer en plus. Le monoxyde d'azote ne peut pas être administré directement comme médicament car il est dégradé en moins d'une seconde. On peut utiliser des médicaments « donneurs de monoxyde d'azote », comme les S-nitrosothiols qui stabilisent le monoxyde d'azote et lui permettent une action plus longue.

L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets d'un nouveau S-nitrosothiol sur la pression artérielle : la S,S'-dinitrosobucillamine (BUC(NO)₂). Cette nouvelle substance peut libérer 2 fois plus de monoxyde d'azote, ce qui permettrait de diminuer les doses de médicament à administrer. Elle sera comparée à d'autres S-nitrosothiols : la S-nitroso-N-acétylcystéine, ou NACNO, et la S-Nitroso-N-acétylpénicillamine, ou SNAP. Les effets de NACNO, SNAP et BUC(NO)₂ seront étudiés en utilisant la télémétrie.

La télémétrie nécessite de positionner des capteurs (reliés à l'aorte) dans l'abdomen de rats mâles Wistar adultes. La première procédure consiste en une implantation de capteurs par chirurgie aseptique sous anesthésie gazeuse ; à la suite de cette opération, les animaux récupéreront pendant minimum 15 jours avec traitement antalgique pendant minimum 48h. Une fois implantés, ces capteurs permettent de mesurer la pression artérielle en continu sur plus de 1 an en maintenant les animaux dans leur cage de vie, ce qui limite leur manipulation et leur stress (raffinement). Elle permet également de réduire le nombre d'animaux car chacun peut recevoir plusieurs substances, chacune séparée par 2 jours de récupération. Il n'y a pas de remplacement possible pour l'étude des effets d'une substance sur la pression artérielle.

La seconde procédure consiste en la mesure de pression artérielle et fréquence cardiaque après administrations sous cutanées de BUC(NO)₂ à 3 doses (étant attendues plus efficace, les doses les plus fortes ne seront pas testées pour ne pas provoquer une chute de pression trop importante). Les résultats seront comparés aux effets d'une solution neutre, puis de 5 doses de NACNO, SNAP et du mélange à part égale NACNO+SNAP. Les administrations seront réalisées sous anesthésie gazeuse transitoire de 5 min. Afin de limiter le nombre total d'injections par rat, 2 séries de 8 rats seront utilisées.

Les points limites (diminution ou arrêt de consommation alimentaire ou hydrique, perte de poids de plus de 10% en 3 jours, irritation, rougeur, lésions de grattage au niveau du site d'injection) seront vérifiés régulièrement et de façon plus rapprochée :

- pendant 1 semaine après la chirurgie d'implantation des capteurs de télémétrie
- pendant les 2 heures suivant l'administration des substances

2076- Les glioblastomes (GBM) sont des tumeurs primitives singulièrement agressives du système nerveux central. Malgré la mise en place d'un arsenal thérapeutique incluant la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie, leur pronostic demeure dramatique.

Si la radiothérapie externe constitue la base incontournable de leur approche, son efficacité demeure largement limitée par des mécanismes de résistance non complètement élucidés combinant l'action de facteurs biologiques intrinsèques à l'influence du microenvironnement dans lequel les cellules tumorales se développent.

Dans ce contexte, le recours aux nanomédicaments vise à développer des dispositifs submicrométriques permettant d'acheminer une molécule bioactive à proximité immédiate de sa cible et ainsi de renforcer l'action de la radiothérapie externe et de réduire les effets secondaires du traitement administré.

Ce travail de doctorat a pour objectif de développer et d'évaluer au niveau préclinique, dans des modèles de xéno greffes (de l'homme à la souris) de cellules de GBM humaines implantées chez la souris immunodéprimée (n = 327), des nanodispositifs multifonctionnels capables de combiner le transport d'un agent de contraste à celui d'un agent chimiothérapeutique radiosensibilisant. L'agent de contraste à la surface du copolymère permet d'une part de suivre in vivo par IRM, de façon non invasive, l'infusion de la nanomédecine dans le système nerveux central, d'autre part d'amplifier l'effet de la radiothérapie externe. Les agents alkylants utilisés visent eux à maximiser les dommages causés à l'ADN des cellules tumorales résistantes en synergie avec la radiothérapie externe.

Une fois les copolymères synthétisés, leurs propriétés physicochimiques et biologiques seront évaluées. La possibilité de greffer à ces nanodispositifs un ligand, les rendant ainsi susceptibles de reconnaître un déterminant cellulaire, est également envisagée. Ils seront alors validés en préclinique sur un modèle murin de GBM.

Les résultats obtenus lors de la thèse doivent permettre : i) d'étendre notre savoir sur les signaux contribuant à la radorésistance dans le GBM ; ii) de mettre en place une nouvelle stratégie de chimiothérapie radiosensibilisante ; iii) de définir un rationnel entre l'efficacité du médicament véhiculé et sa distribution pendant le temps d'exposition aux radiations ; iv) le cas échéant de transférer vers la clinique la technologie développée.

Par ses aspects transversaux, ce travail offre ainsi la perspective d'appliquer en clinique une nanomédecine pertinente pour le traitement du GBM mais également d'autres types de cancers, tout en respectant la règle des 3R. Ainsi, de premiers tests de cytotoxicité et de contrôle de la prolifération cellulaire seront réalisés in vitro avant de passer sur l'animal, qui reste incontournable pour la validation de ce type d'étude. Une attention toute particulière sera accordée à réduire le nombre d'animaux tout en s'assurant de la significativité des résultats scientifiques. Enfin, les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi de façon à respecter l'exigence de raffinement.

2077- Le but de ce projet est de vérifier et valider les paramètres d'un nouvel appareil OCT (tomographie par cohérence optique) en ophtalmologie. Le développement de ce nouvel appareil OCT est déjà validé pour l'observation de la peau. Un nouveau développement en ophtalmologie pour l'observation de la rétine est possible avec une résolution inférieure à 15 µm. Comme il s'agit d'une première approche pour cet appareil en ophtalmologie nous n'utiliserons que 10 souris et 10 rats d'âges et de souches différentes. Il s'agit d'un examen non invasif, externe et très rapide.

Dans le respect de la règle des 3Rs les animaux seront réintégrés dans d'autres protocoles après les examens. Aucun animal ne sera sacrifié. Pour une première approche avec ce nouvel appareil il apparaît que le nombre de 20 animaux soit le maximum pour valider la technique mais il n'est pas possible de remplacer les animaux.

2078- Les cancers sont la première cause de décès chez l'homme et la deuxième chez la femme. La forte mortalité peut s'expliquer par un défaut dans un diagnostic précoce et à la faible réponse des patients aux traitements actuels (chirurgie et chimiothérapie). La recherche médicale s'oriente ainsi vers de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi celles-ci l'immunothérapie, utilisée seule ou en combinaison avec d'autres thérapies plus conventionnelles (chimiothérapie, radiothérapie) présente un intérêt indéniable. Cette stratégie, basée sur la restimulation in situ du système immunitaire, permet d'envisager une réponse immunitaire capable d'induire le rejet de la tumeur, tout en préservant le tissu sain, et de doter le patient d'une mémoire immunitaire antitumorale, prévenant ainsi des récurrences.

Nous avons développé un vecteur vaccinal qui peut être couplé à n'importe quel antigène tumoral pour induire une réponse immunitaire spécifique de chaque tumeur. Ce vecteur pourra ainsi trouver une application clinique dans de nombreux cancers et s'inscrit dans une évolution vers des traitements personnalisés selon chaque patient. Avant de proposer ce vaccin thérapeutique en phase clinique, nous devons réaliser une preuve de concept de notre vecteur in vivo. En effet, seul le test de ce vecteur dans un modèle in vivo nous assure de l'effet antitumoral recherché dans des conditions physiopathologiques proches de la réalité clinique.

Aussi, l'utilisation des animaux est indispensable, les modèles tumoraux seront réalisés sur un nombre nécessaire et suffisant d'animaux (640 souris de fond génétique C57BL/6J). Ce nombre a été défini afin d'exploiter des résultats statistiquement fiables. Le protocole expérimental comprend un suivi quotidien des animaux. Pour éviter toute souffrance de l'animal au cours du protocole expérimental, des indicateurs comportementaux et physiques prédéfinis (état général, prostration, poil hérissé, masse de l'animal) seront évalués quotidiennement, et constitueront les points limites de l'expérience (mise à mort de l'animal). Notre démarche expérimentale tient ainsi en compte la règle des 3R (réduction du nombre d'animaux par l'utilisation du nombre minimum permettant des statistiques fiables, raffinement du protocole expérimental, pour éviter le stress de l'animal, de la musique est également mise dans la pièce et remplacement des animaux au maximum par des expériences in vitro préalablement réalisées : tous les tests de cytotoxicité et d'activation cellulaire ont été fait in vitro). Ce projet s'inscrit ainsi dans une gestion éthique de l'expérimentation animale et est donc en accord avec les réglementations européennes et françaises de bonnes pratiques de laboratoire.

2079- L'obésité est devenue depuis 20 ans une pandémie mondiale et la prise en charge de celle-ci et de ses pathologies associées (dyslipidémie, diabète, stéatose hépatique, hypertension artérielle, etc..) constitue un enjeu majeur en santé publique. L'obésité maternelle pendant la grossesse a un impact très fort sur le risque d'obésité précoce de la descendance et sur le développement ultérieur de pathologies cardiovasculaires et métaboliques avec, à terme, une augmentation de la morbi-mortalité. La chirurgie bariatrique s'est progressivement placée au premier rang des traitements efficaces en termes de perte de poids et de résolution des comorbidités, mais il n'existe actuellement aucune donnée clinique ou expérimentale concernant son impact sur la descendance de mères obèses opérées.

Le but de cette expérimentation animale chez la souris est d'apporter des preuves de l'efficacité de la chirurgie bariatrique dans l'amélioration du pronostic pondéral et métabolique des descendants de mères obèses opérées.

Pour cela, un modèle de souris obèses ayant subi une chirurgie bariatrique sera utilisé. Après 4 semaines d'amaigrissement, les souris opérées seront mises en accouplement et suivies quotidiennement durant leur gestation. Après le sevrage des portées, les altérations métaboliques, hépatiques et cardio-vasculaires seront évaluées chez les mères après sacrifice des animaux. Ces mêmes altérations seront étudiées chez les descendants (mâles et femelles) de ces mères à l'âge de 3, 6, 12 et 18 mois.

Ce protocole, évaluant les effets d'une intervention chirurgicale et rendant donc un modèle animal indispensable, a été conçu dans le respect de la règle des trois R pour utiliser au maximum 500 animaux (tous groupes confondus), nombre minimal permettant d'obtenir des résultats statistiquement différents pour répondre aux questions posées. Les animaux non utilisés seront utilisés dans l'animalerie centrale à des fins d'enseignement. Les traitements antalgiques ont été optimisés pour prévenir toute douleur, et les animaux seront placés en cages non individuelles contenant des objets de stimulation.

2080- L'objectif de ces expériences est de comprendre comment le cerveau forme une représentation du temps. Afin d'atteindre cet objectif, l'activité électrique de neurones dans le cerveau de singes macaques entraînés sera enregistrée et perturbée par injections pharmacologiques et/ou micro-stimulation électrique. Comprendre comment le cerveau forme une représentation du temps chez le primate non-humain doit permettre d'offrir une meilleure compréhension du fonctionnement du cerveau chez l'homme. Plus précisément, le but du présent projet est de tester l'hypothèse que l'expectation temporelle repose sur le fonctionnement normal d'un type de récepteur particulier (les récepteurs NMDA) et du cortex frontal dorsomédian. En cas de fonctionnement anormal de ces récepteurs, l'organisation temporelle des mouvements et de la cognition seraient fortement perturbés.

Au total 6 animaux seront nécessaires pour mener à bien ces études (6 animaux pour les 3 protocoles). Protocole 1) enregistrements électrophysiologiques, 2) microstimulation, 3) modulations pharmacologiques.

Réduction:

Afin de réduire à 6 le nombre d'animaux, ceux-ci participeront à tous les protocoles. En effet, ces protocoles ne provoquent pas de lésions irréversibles et rien ne s'oppose à ce que le même animal participe à plusieurs protocoles.

Raffinement:

Les critères d'interruptions des expériences seront les suivants: comportement anormal des animaux suggérant un inconfort majeur et/ou de la douleur pendant la réalisation des protocoles.

Remplacer:

L'utilisation de modèles mathématiques nous permettra également de tester de nouvelles hypothèses avant d'avoir recours à la validation expérimentale et/ou à perfectionner ces modèles prédictifs. A long terme, ceci réduira l'utilisation d'animaux.

Les retombées de ce projet sont doubles. 1. Au niveau physiologique, cette étude devrait révéler les mécanismes intimes impliqués dans la cognition temporelle. 2. Au niveau clinique, nos investigations pharmacologiques devraient améliorer notre compréhension des troubles résultant de perturbations de la cognition temporelle et suggérer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des patients chez lesquels la désorganisation de la cognition temporelle est responsable d'une part importante de la symptomatologie (e.g. schizophrénie, ADHD).

Le choix du singe Rhésus est justifié étant donné l'organisation générale de leur cerveau qui est similaire à celle de l'homme. Plus particulièrement, de nombreuses études ont suggéré que des fonctions cognitives supérieures comme la perception temporelle ne peuvent s'étudier que chez des animaux possédant un cortex frontal développé.

2081- L'objectif du projet est de tester, in vivo, des approches thérapeutiques innovantes pour réduire l'infarctus cérébral à la phase aiguë de l'ischémie/reperfusion ainsi que les complications hémorragiques dans le but de l'appliquer chez l'homme. Les AVC représentent la 3ème cause de mortalité et la 1ère cause de handicap acquis chez l'adulte en France. La prévalence du diabète de type 2 à la Réunion est 3 à 4 fois plus importante qu'en métropole et la surmortalité associée y est 3,5 fois plus importante. L'augmentation des facteurs de risque (obésité, surpoids, sédentarité, mauvaise alimentation) laisse présager une augmentation de la prévalence du diabète à la Réunion. Plusieurs grandes études de population ont montré une augmentation de la prévalence des AVC dans la population diabétique. L'hyperglycémie à la phase aiguë de l'infarctus cérébral est un facteur reconnu de mauvais pronostic associé aux complications hémorragiques. Elle représente également une contre-indication (Glu>400mg/ml) à l'administration de thrombolyse en raison de ce risque de transformation hémorragique de la zone infarctée.

Le modèle au monofilament permet d'étudier le phénomène d'ischémie/reperfusion car le temps d'occlusion de l'artère peut être contrôlé (de 90 minutes à 4 heures en fonction de la taille d'infarctus voulue).

Nous avons déjà démontré dans notre précédente étude, que les HDL administrées à la phase de reperfusion en intra-carotidien permettent une diminution des complications hémorragiques cérébrale. Nous souhaitons tester l'efficacité des HDL enrichies en Curcumine (puissant agent anti-oxydant) dans ces mêmes conditions pathologiques.

La Curcumine a déjà démontré une efficacité sur les lésions cérébrales en cas d'AVC lorsqu'elle était administré par voie orale de façon préventive.

Grace à la mise en place du modèle (MCAO) dans une expérimentation précédente, le nombre de souris sera réduit (règle des 3 R) au minimum (10 souris par groupe soit 40 souris + 10 souris correspondant à la mortalité globale observée durant l'expérimentation de mise en place du modèle = 50 souris). En effet les expérimentateurs réalisent le modèle de façon reproductible et dans un délai réduit (<15 min) permettant la réalisation d'étude sur l'AVC. Pendant l'heure qui suit la chirurgie, l'animal sera observé : son comportement, son activité (s'il est isolé, passif), sa posture (s'il est prostré), son pelage (s'il est hérissé, s'il y a perte de poils), sa respiration (si le rythme est rapide ou saccadé), les mouvements qu'il effectue. En cas de signe de souffrance nous augmenterons la dose d'analgésique buprénorphine à 0.1mg/kg. Si le traitement ne suffit pas et qu'une souris est en décubitus latéral avec une détresse respiratoire, elle sera euthanasiée par dislocation cervicale.

Durant la phase de surveillance de 24 heures, chaque animal sera isolé dans une cage propre et bénéficiant de raffinement afin d'éviter de se blesser. Il bénéficie d'un accès facilité à la nourriture (directement dans la cage) et à l'eau (biberon avec bec allongé). Les salles d'hébergement sont contrôlées sur divers facteurs d'ambiance (hygrométrie, température, alternance jour/nuit).

2082- Le choc septique correspond à une infection grave ayant un retentissement sur l'ensemble de l'organisme et mettant en jeu le pronostic vital avec un taux de mortalité élevé. L'amélioration de sa prise en charge est donc un enjeu majeur. Les mécanismes de la progression d'une infection localisée, parfois banale, au choc septique puis au décès restent mal connus. Le choc septique est caractérisé par une défaillance cardiocirculatoire avec une hypotension artérielle, ne répondant pas au remplissage vasculaire et nécessitant un traitement par amines vaso-actives. La contractilité cardiaque peut être altérée, aggravant la défaillance circulatoire. L'hyperstimulation du système adrénergique joue probablement un rôle important dans cette dysfonction myocardique. Le blocage des récepteurs bêta1-adrénergique par bêta1-bloquants pourrait prévenir cette cardiopathie liée au sepsis.

L'objectif principal de notre étude est d'évaluer l'intérêt d'un traitement par bêta-bloquant pour améliorer la fonction cardiaque au cours du sepsis, chez des rats mâles (n=30) et femelles (n=30). La fonction cardiaque sera évaluée en utilisant l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), permettant ainsi une analyse dans les conditions réelles. L'objectif secondaire est de clarifier le métabolisme énergétique en analysant la consommation en oxygène au niveau des cellules cardiaques.

Grâce à cette étude, nous espérons montrer un bénéfice à l'utilisation d'un bêta-bloquant pour améliorer la fonction cardiaque au cours des infections graves. La contractilité cardiaque des rats traités par landiolol serait mieux préservée par rapport au groupe contrôle. Le bénéfice attendu serait plus important chez les mâles du fait d'une altération plus importante de leur contractilité cardiaque par le sepsis. Le but à long terme est de pouvoir utiliser ce traitement chez l'Homme pour améliorer leur prise en charge et donc leur devenir.

Les dommages prévisibles pour les animaux sont l'induction d'un sepsis dont l'évolution naturelle est la défaillance multiviscérale puis le décès des rats en quelques jours. L'euthanasie des rats à la 24^{ème} heure dans les conditions réglementaires évite la souffrance et la douleur engendrée par cette évolution naturelle.

L'espèce choisie est le rat car elle possède des caractéristiques hémodynamiques et métaboliques proches de l'Homme durant le choc septique. Notre approche expérimentale permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Grâce à l'IRM, nous pouvons évaluer les fonctions cardiaques sans sacrifice et ainsi pouvoir par la suite étudier le métabolisme énergétique sur les mêmes animaux. L'impact environnemental est pris en compte par une phase d'acclimatation des animaux de quelques jours. Les conditions d'hébergement visent à leur apporter le maximum de bien être et à satisfaire leurs besoins physiologiques. Les conditions de températures, lumière et humidité des cages sont contrôlées. L'eau et la nourriture sont mises à disposition en qualité et en quantité satisfaisantes. Une personne est chargée du bien-être des animaux. La douleur est limitée par une anesthésie inhalée des actes douloureux (cathéter veineux, injection intra-péritonéale). L'angoisse liée à la réalisation de l'IRM est limitée par une anesthésie inhalée. La température corporelle sera maintenue à 37°C pendant l'examen grâce à une couverture chauffante. L'euthanasie à la 24^{ème} heure se fera sous barbituriques. Ceci permet également de limiter les souffrances engendrées par l'évolution du sepsis.

2083- L'obésité s'accompagne d'une inflammation chronique dite de bas grade à l'origine d'un grand nombre de désordres métaboliques dont le diabète de type 2. Le tissu adipeux est un véritable organe endocrine qui sécrète de nombreuses molécules inflammatoires. Ces molécules sont à l'origine d'une inflammation localisée au niveau du tissu adipeux. Cependant, ces facteurs pro inflammatoires peuvent avoir une action plus systémique. Ainsi, la production et la circulation de ces molécules ont des conséquences néfastes sur le fonctionnement de divers organes tels que le foie ou le tissu adipeux entraînant une insulino-résistance qui pourra évoluer en un diabète de type 2.

De surcroît, le diabète de type 2 est à l'origine de nombreuses complications, notamment au niveau de l'appareil cardiovasculaire et du système nerveux central. En effet, les personnes diabétiques présentent une plus grande susceptibilité aux accidents vasculaires cérébraux et les dysfonctionnements centraux en résultant sont généralement plus importants que chez les personnes non-diabétiques. De plus, il semble que les personnes diabétiques, tout comme les modèles animaux de diabète, présentent des déficits cognitifs et une susceptibilité aux maladies neurodégénératives plus importants. Enfin, l'inflammation et l'hyperglycémie perturberaient l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et pourraient moduler l'activité neurogénique (genèse de nouveaux neurones).

De plus, la Réunion présente une biodiversité végétale avec de nombreuses plantes médicinales et aromatiques riches en polyphénols. Les activités biologiques des polyphénols font l'objet de nombreux articles scientifiques montrant les propriétés anti oxydantes ou encore anti inflammatoires de ces molécules. Entre autre, nous portons un intérêt particulier sur la curcumine, qui semble moduler les mécanismes inflammatoires et les processus nerveux centraux.

A travers ces expérimentations, nous souhaitons évaluer l'effet de l'injection de curcumine vectorisée par les HDL (lipoprotéines de haute densité) sur :

- 1) l'activité neurogénique.
- 2) la réparation cérébrale.
- 3) la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Ces expérimentations seront menées en conditions contrôle ou hyperglycémique, sur un nombre total maximum de 315 poissons zèbre. Parmi ces poissons :

- 90 seront utilisés pour étudier l'effet d'une injection contrôle (3x10), de HDL (3x10), HDL-curcumine (3x10) sur les mécanismes précédemment cités (activité neurogénique/BHE).

- 90 seront utilisés pour étudier l'effet d'une injection contrôle (3x10), de HDL (3x10), HDL-curcumine (3x10) sur les mécanismes précédemment cités dans des conditions de lésions cérébrales (réparation cérébrale/BHE).

- 135 seront utilisés pour étudier l'effet d'une injection contrôle (3x15), de HDL (3x15), HDL-curcumine (3x15) sur les mécanismes précisés précédemment dans des conditions hyperglycémique +/- lésions cérébrales (hyperglycémie/BHE/réparation cérébrale).

De part des mécanismes physiologiques fortement conservés au cours de l'évolution, le poisson zèbre présente l'avantage d'être un modèle simplifié pour la modélisation de maladies humaines, ainsi que pour la découverte et le développement de composés pharmaceutiques. Aujourd'hui, le poisson zèbre est reconnu pour sa pertinence dans l'étude d'un certain nombre de mécanismes physiologiques transposables à l'Homme.

Cette étude qui répond à la règle des 3R :

Remplacement : des études in vitro ont déjà été menées. Il semble indispensable de passer au modèle animal pour mieux comprendre les effets de l'hyperglycémie sur des paramètres physiologiques à l'échelle organique.

Réduction : les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible, tout en permettant de réaliser des études statistiques (student t-test et ANOVA).

Raffinement : les poissons seront placés dans des conditions optimales (cycle jour/nuit : 14h/10h ; température : 28.5°C ; oxygénation). Les animaux seront nourris plusieurs fois par jour, et toute manipulation invasive sera suivie d'une anesthésie générale.

2084- Un déficit des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale, moteur énergétique des cellules, aurait une implication importante dans plusieurs maladies neurodégénératives et dans le vieillissement cérébral.

Dans la maladie de Huntington (MH), le complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale (appelée succinate déshydrogénase ou SDH) jouerait un rôle central, mais est encore mal compris. L'étude des conséquences énergétiques d'un déficit de la SDH permettrait de mieux comprendre la physiopathologie de la MH et d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques. Cette maladie génétique qui se déclenche en général chez l'individu jeune est mortelle en 10-15 ans après la survenue des premiers symptômes moteurs. Il n'existe aucun traitement efficace pour la ralentir. Dans ce contexte, il est particulièrement important de pouvoir utiliser l'imagerie cérébrale pour caractériser quantitativement et de manière non-invasive l'atteinte énergétique chez les patients. Le projet ne pourra être mené à terme qu'au travers des développements techniques en imagerie dans des modèles rongeurs de la MH.

Un moyen de mimer chez l'animal les effets cellulaires produits par un blocage spécifique de la SDH est d'utiliser une neurotoxine, le 3NP (3-nitropropionate). Cette petite molécule est un inhibiteur très sélectif de la SDH. Le 3NP a été utilisé dans de nombreuses études chez les rongeurs pour tester de nouvelles approches thérapeutiques ou étudier les mécanismes physiopathologiques découlant d'une atteinte spécifique de la SDH. L'intérêt du modèle 3NP, tel qu'il a été développé au laboratoire, réside dans sa grande reproductibilité et la connaissance précise de la relation entre les doses de la toxine administrées de manière continue et l'effet moléculaire sur la SDH (son pourcentage d'inhibition). En particulier, le modèle 3NP (faibles doses) peut être utilisé pour produire une faible inhibition de la SDH, qui n'induit pas de lésions cérébrales mais seulement des troubles métaboliques.

Ainsi le modèle 3NP est un modèle de choix pour comprendre les conséquences métaboliques d'un blocage pharmacologique partielle de la SDH en utilisant de nouvelles méthodes d'imagerie cérébrale.

L'objectif de ce projet est de valider de nouvelles méthodes de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) et d'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) afin d'accéder à des mesures dynamiques et quantitatives du métabolisme énergétique cérébral. Les méthodes seront utilisées *in vivo* chez le rongeur normal ou exprimant le gène muté de l'Huntingtine, pour détecter l'effet du 3NP sur le métabolisme cérébral. Ce projet permettra de mieux caractériser les défauts énergétiques partiels déclenchés par l'atteinte primaire de la SDH *in vivo*.

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

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet, sont nés et élevés en captivité. Ils proviennent d'un élevage autorisé ainsi que d'une colonie établie au sein de notre laboratoire. Le projet prévoit 168 rongeurs. Ce nombre correspond au minimum nécessaire pour pouvoir répondre à notre question scientifique.

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

2085- Ce projet vise à comprendre le rôle que joue l'inflammasome lors du déclenchement du syndrome d'activation macrophagique typique de la lymphohistiocytose hémophagocytaire. Le syndrome d'activation macrophagique (SAM) est un dérèglement immunitaire typique de la lymphohistiocytose familiale (HLH). Ce syndrome inflammatoire grave est particulièrement prévalent en France, affectant 1 naissance sur 50000. Les patients atteints de HLH sous sa forme la mieux connue meurent généralement dans les deux premières années de vie. De plus, de nombreux patients se présentent en clinique avec un SAM de cause inconnue. Là encore, la mortalité est très élevée (environ 50%) et la cause du déclenchement demeure inconnue. Récemment, une nouvelle cause de SAM a été décrite suite à l'identification d'un patient ayant une mutation dans une composante du système immunitaire appelée l'inflammasome. Nous souhaitons comprendre si cette composante est nécessaire au déclenchement d'un SAM. Pour cela, nous avons élaboré un protocole expérimental dans lequel l'implication de l'inflammasome sera testée. Ce dernier nécessitera 936 souris. À terme, la clarification de l'implication de l'inflammasome dans le SAM a le potentiel d'élargir le spectre des interventions thérapeutiques chez les patients souffrant de HLH.

Ce projet ne peut être mené sans l'utilisation d'animaux car le système immunitaire est un organe extrêmement complexe comportant un nombre important de cellules en mouvement, ce qui est impossible à reproduire *in vitro*. Le nombre de souris nécessaire au projet a été calculé au plus juste afin d'apporter des réponses fiables tout en évitant des mises à mort inutiles. Le projet impliquera différentes procédures visant toutes à analyser l'impact de l'inflammasome dans le déclenchement du SAM. Par ailleurs, l'ensemble des procédures décrites dans ce projet sont réfléchies dans l'optique de minimiser la douleur et l'anxiété pour les souris. Des personnes qualifiées seront en charge de l'expérimentation et du suivi des animaux.

2086- La période du développement préimplantatoire est une période exceptionnelle en terme de régulation de l'expression génétique: elle implique une reprogrammation épigénétique des génomes parentaux pour former un embryon dont les cellules sont initialement totipotentes (capables pour chacune d'entre elles de donner lieu au développement d'un individu entier).

Au cours des premières divisions de clivage, ces cellules vont perdre leur totipotence et le génome embryonnaire va acquérir progressivement une activité transcriptionnelle indispensable à la poursuite du développement.

Alors que chez la plupart des mammifères (et en particulier chez les espèces domestiques et chez l'homme), le développement préimplantatoire peut-être obtenu *in vitro*, laissant penser dans un premier temps que l'embryon s'accommode facilement

d'environnements variés, il apparaît dans la littérature que les variations de l'environnement embryonnaire à ces stades ont en fait des effets à long terme sur le phénotype (et la santé) de l'individu à naître.

L'objectif du projet sur lequel nous travaillons depuis plusieurs années est donc de caractériser le programme d'expression génique de l'embryon de lapin au cours de cette période fondamentale du développement et d'appréhender comment des modifications de son environnement in vitro affectent ce programme d'expression génique.

Nous étudions au cours de la période, les modifications épigénétiques qui président aux altérations d'expression génique survenant naturellement au cours du développement, ou induites par les modifications de l'environnement embryonnaire.

Ce projet comporte donc un aspect de recherche cognitive pour la compréhension des premières étapes de développement, et un aspect appliqué puisqu'il contribue à analyser comment les différents environnements in vitro auxquels peut être confronté l'embryon affectent l'expression précoce de son génome avec des effets à long terme médiés par des altérations épigénétiques. Cet aspect appliqué intéresse autant l'agronome que le médecin puisqu'en fécondation in vitro humaine, l'embryon connaît la même phase de développement in vitro.

Ce projet portant sur le développement embryonnaire, il nous est impossible de remplacer l'animal par un modèle cellulaire ou in silico. Le nombre d'animaux impliqués dans chaque groupe expérimental a été réduit au maximum grâce aux techniques de superovulations maîtrisées chez cette espèce et à la mutualisation des embryons entrant en analyse par différentes techniques. Nous nous engageons également à travailler au perfectionnement des techniques utilisées, en fonction de l'amélioration des technologies, de façon à réduire le nombre d'embryons nécessaires aux études et ainsi réduire le nombre d'animaux impliqués. Les conditions d'hébergements seront enrichies car des cages équipées de mezzanine sont mises à disposition pour optimiser l'espace de vie. Quelques jours avant le début des expérimentations, les animaux sont hébergés dans une salle d'élevage dans le but de les accoutumer aux passages plus réguliers d'expérimentateurs ce qui limitera leur stress pendant la durée de l'expérimentation.

Le nombre de lapin impliqués dans ce projet a également été calculé de façon à en réduire au maximum le nombre tout en restant compatible avec l'utilisation des tests statistiques non paramétriques permettant l'interprétation des résultats. Ce nombre est de 320 à 360 par an.

2087- La dépendance aux drogues est une pathologie chronique du système nerveux central caractérisée par une consommation compulsive, un taux de rechute élevé, même après une longue période d'abstinence et implique une forte plasticité synaptique. Ce besoin non contrôlé malgré la conscience ou la connaissance des conséquences négatives de la drogue, a de lourdes conséquences à la fois sur le plan humain, social et économique. Les mécanismes mis en jeu dans les comportements addictifs restent toutefois peu connus et il n'existe que peu de traitements, ces derniers se limitant principalement à des molécules de substitution. Parmi les drogues, nous nous intéressons à la cocaïne, un psychostimulant qui, comme les renforçateurs naturels de type nourriture ou sucre, activent des structures cérébrales communes du système de récompense mésocorticolimbique.

Des études récentes par imagerie cérébrale et par des approches en électrophysiologie suggèrent toutefois que les circuits et les structures cérébrales activés par les deux types de renforçateurs ne se chevauchent pas complètement et notre objectif est de différencier les mécanismes neurobiologiques induits par chacun d'eux. Dans ce contexte, nous accordons une importance particulière au rôle de modifications épigénétiques dont l'implication dans l'acquisition de certains comportements est de plus en plus documentée, ainsi qu'aux interactions existant entre le système de récompense et les rythmes circadiens. Parmi les modifications épigénétiques induites par la cocaïne, la méthylation de l'ADN est peu abordée. Notre hypothèse de travail est que cette modification relativement stable résultant d'une liaison covalente sur des CpG de certains gènes est susceptible de rendre compte de changements comportementaux progressifs et durables et que les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les effets de chaque renforçateur sont différents.

Notre étude portera sur des rats mâles jeunes adultes (d'environ 9 semaines) et nous estimons devoir utiliser un nombre maximum de 612 animaux qui seront soumis soit à une prise passive non contingente de renforçateurs, soit à une prise volontaire contingente en utilisant des techniques maîtrisées au laboratoire.

Les précisions relatives à la règle des 3R sont les suivantes :

a) **REMPACEMENT**: Notre étude portant sur l'analyse de plusieurs structures cérébrales interagissant et reconnues comme impliquées dans les effets des drogues, l'intégralité du cerveau d'animaux vivants est nécessaire. Ceci n'exclut pas pour autant l'utilisation occasionnelle de cultures cellulaires pour répondre à d'autres questions.

b) **RAFFINEMENT** : Les administrations passives chroniques de drogues sont optimisées pour limiter le nombre total d'injections i.p. dont les sites sont particulièrement suivies. Par ailleurs, un certain nombre d'animaux contrôles communs sont utilisés pour l'étude des deux renforçateurs afin de limiter leur nombre.

c) **REDUCTION** : Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum pour permettre des analyses statistiques. 5 rats par groupe sont utilisés pour la procédure d'administration passive de cocaïne ou de sucre avec un groupe contrôle commun pour analyser l'effet des 2 renforçateurs en fonction du temps et selon 4 approches moléculaires (tableau 1 annexé/total 300 rats). La seconde approche est comportementale et permet de mesurer soit l'effet renforçateur et la prise volontaire de cocaïne ou de sucre (tableau 2 annexé/total 156 rats), soit la motivation pour chacun (tableau 3 annexé/total 156 rats). Dans les deux cas, des groupes de 6 sont prévus pour 4 analyses moléculaires des effets du sucre et de 7 pour ceux de la cocaïne qui nécessitent une chirurgie avec possibilité de perte d'animaux.

Nous anticipons un nombre total de rats de 612 pour ce projet qui comporte deux procédures expérimentales.

2088- Depuis plusieurs années, la demande en produits carnés et notamment en viande de porc au niveau mondial augmente pour nourrir la population. Cela induit une forte pression de production pour les professionnels de l'industrie porcine. Cependant, les productions porcines sont responsables de rejets d'effluents néfastes pour l'environnement. Un des leviers d'action pour répondre à ces enjeux est d'augmenter la productivité des truies ainsi que la survie et la croissance des porcelets entre la naissance et le sevrage. Les objectifs de ce projet de recherche sont d'élaborer des stratégies nutritionnelles pour à la fois augmenter le nombre de porcelets nés vivants par truie par an (prolificité des truies) mais aussi pour améliorer la survie et la croissance des porcelets pendant le développement utérin, la lactation mais également sur le long terme. Ces stratégies devront être envisageables sur le terrain, que ce soit d'un point de vue technique ou d'un point de vue financier. Une procédure expérimentale sera mise en place pour étudier l'influence de divers facteurs sur la prolificité des truies, leurs performances de lactation ou la capacité de survie des porcelets. Ces facteurs comprendront notamment la modulation de la composition des aliments donnés aux truies et aux porcelets sous la mère, mais aussi la mise en application de différentes techniques d'élevage liées à la distribution de l'aliment ou aux conditions environnementales. Ce projet sera réalisé chez la truie et le porcelet puisque le porc est l'espèce cible du projet et la truie et le porcelet les stades physiologique d'intérêt. En effet, des spécificités d'espèce ainsi que de stade physiologique existent notamment sur les mécanismes de régulation physiologiques (endocrinologie, métabolisme), les besoins nutritionnels des animaux etc.... La complexité de ces paramètres et de leurs interactions ne permet pas d'utiliser des modèles alternatifs (modélisation, études in vitro...). Le projet qui aura une durée de 5 ans, inclura 15 essais (soit 3 par an) qui comprendront chacun en moyenne 60 truies. Au total 10 des 15 essais pourront impliquer des porcelets (environ 120 porcelets par essai). Cela représentera 900 truies et 1200 porcelets pour la totalité du projet. Une seule procédure expérimentale sera mise en place. Les animaux seront placés dans des conditions similaires à celle des animaux de ferme élevés dans un but commercial et resteront dans la filière reproduction pour les truies et la filière de consommation pour les porcelets. Au cours de ce projet, les animaux pourront être placés dans les conditions nutritionnelles suboptimales et des prises de sang sur les animaux vivants pourront être effectuées. Pour chaque acte pouvant engendrer une souffrance le nombre d'animaux utilisés sera estimé afin de réaliser l'acte sur le nombre minimal d'individus. D'autre part, plusieurs méthodes seront mises en œuvre afin de réduire la souffrance ou le stress appliqué à ces animaux. Par exemple, le nombre de tentatives pour les prélèvements de sang sera limité à 3 par animal afin de limiter la douleur, le temps de contention et donc le stress ressenti par les animaux.

2089- *Trypanosoma cruzi*, agent causal de la trypanosomiase américaine (maladie de Chagas) est principalement transmis par les déjections infectées de triatomes hématophages (sorte de punaises). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2014), la lutte anti-vectorielle est la méthode la plus efficace pour prévenir la maladie chez l'homme.

A côté du réservoir naturel de *T.cruzi* (les marsupiaux et les édentés), les carnivores domestiques tels que le chien et le chat pourraient également être d'importants réservoirs de parasite. C'est pourquoi un traitement antiparasitaire efficace de ces animaux de compagnie va diminuer sans doute l'incidence des cas humains dans les zones d'endémie.

Le Vectra 3D® est un antiparasitaire dont l'efficacité a été validée contre certaines espèces de puces et de tiques, de moustiques et de phlébotomes. Notre projet s'inscrit dans la perspective de tester l'effet répulsif et insecticide du Vectra 3D® contre *Triatoma infestans*, vecteur de *T. cruzi*.

Pour ce faire, nous allons mener une étude comparative de type traités/non traités, dans laquelle deux lots de rats (lignée Sprague-Dawley) seront constitués. Tous les rats (N= 20) seront endormis et analgésiés puis exposés aux triatomes adultes et nymphes pendant 20 minutes. Les rats du « lot traité » (N= 10) seront auparavant imprégnés par le Vectra 3D®. Pour le confort des animaux, un enrichissement sera mis en place à l'aide des dômes.

2090- Le stress augmente les taux d'hormones glucocorticoïdes (cortisol de l'homme, corticostérone du rat) sanguins. Les hormones glucocorticoïdes agissent sur différents organes via leur fixation sur des récepteurs spécifiques. Si l'augmentation d'hormones glucocorticoïdes en réponse à un stress bénéficie à l'organisme à court terme, elle a des effets délétères dans le cas d'un stress chronique. On connaît les effets négatifs du stress sur l'hippocampe, une région du cerveau impliquée dans la mémoire. Pour mieux comprendre les effets délétères du stress sur le cerveau, nous utilisons l'olfaction comme modèle de fonction nerveuse. Chez le rongeur, le stress influence la perception olfactive. Dans le nez d'un rongeur stressé, la muqueuse olfactive répond moins bien à des stimulations par les odeurs. Notre projet vise à étudier les effets des glucocorticoïdes sur les neurones et les cellules gliales (cellules associées aux neurones) des circuits de l'olfaction. La dexaméthasone, connue et utilisée chez l'homme pour ses effets anti-inflammatoire et immunosuppresseur, est un agoniste (imite en général le messager qui se lie habituellement avec le récepteur en question) des récepteurs des glucocorticoïdes. Le RU486 est un antagoniste des récepteurs des glucocorticoïdes. Nous mesurerons la réponse de rongeurs à des odeurs avec ou sans traitement par la dexaméthasone et/ou le RU486.

Les approches expérimentales que nous utilisons incluent: le comportement de rongeurs exposés à des odeurs, l'enregistrement de l'activité de la muqueuse olfactive et de celle du cortex olfactif quand ils sont exposés aux mêmes odeurs, l'expression de marqueurs d'activation des neurones et des cellules gliales dans les circuits de l'olfaction.

Le projet s'inscrit dans le cadre d'enseignements réalisés pour un master 1 de biologie et santé. Des étudiants participeront aux protocoles décrits.

Le recours à l'animal est nécessaire pour ce projet car aucun milieu de culture ou aucune simulation numérique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité du recrutement des réseaux de neurones pendant le stress. Les rongeurs utilisés sont étudiés par un grand nombre de laboratoires dans le monde, par conséquent ils fournissent une base de données comparative

importante. D'autre part ils répondent au stress, comme l'homme et les animaux domestiques, par une production accrue d'hormones corticoïdes.

Le projet utilise 290 rongeurs nés et élevés dans un élevage agréé. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'emploi de tests statistiques pour analyser les résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies en accord avec le vétérinaire de l'installation pour éviter toute souffrance. Les animaux sont visités quotidiennement par du personnel agréé.

2091- Ce projet présente les différentes opérations réalisées pour tester les individus des lignées de cailles STI, CTI, LTI, HSR, CSR et LSR. Ils concernent 1200 cailleaux par génération, soit 200 animaux par lignée. Les tests utilisés sont l'immobilité tonique et le test de motivation sociale sur tapis roulant, ils sont utilisés pour connaître l'état des lignées.

Six lignées de cailles (*Coturnix japonica*) sont utilisées : les lignées STI (short tonic immobility) et LTI (long tonic immobility), sélectionnées de façon divergente sur un index de peur (durée d'immobilité tonique), les lignées HSR (high social reinstatement) et LSR (low social reinstatement), sélectionnées de façon divergente sur un index de sociabilité (test de motivation à rejoindre des congénères) et les deux lignées témoins correspondantes menées en parallèle CTI (control tonic immobility) et CSR (control social reinstatement). Ces six lignées constituent un matériel biologique unique pour étudier les facteurs génétiques et épigénétiques influençant la réactivité émotionnelle et les interactions sociales chez les oiseaux d'élevage.

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

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

REDUCTION : Pour maintenir une bonne estimation de la valeur de chaque mère et pouvoir éventuellement faire une sélection sur un des critères, nous utilisons 5 cailleaux par mère, ce qui est le minimum car dans ce cas nous n'obtenons parfois qu'un mâle ou qu'une femelle, or nous souhaitons avoir une information sur les deux sexes.

RAFFINEMENT : Les cailleaux seront hébergés sur des cages offrant un gradient de température et de luminosité, ce qui leur permet un certain choix pour ces conditions d'ambiance. Les animaux resteront en groupe et auront la possibilité d'explorer des bacs contenant des copeaux. Lors de la seconde semaine, des objets nouveaux (billes de verre, bacs de copeaux) seront placés dans la cage pour stimuler l'exploration et les bains de poussière. Les cailleaux seront visités deux fois par jour et toute manifestation de symptômes persistants tels que définis dans le point limite engendrera l'euthanasie des animaux par le personnel qualifié.

2092- Les études d'association génétique chez les malades permettent d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans les troubles neurologiques et psychiatriques, et de rechercher de meilleurs traitements. Dans ce cadre, le gène *Nxn12* a été identifié comme étant impliqué dans les mécanismes pathophysiologiques de la maladie d'Alzheimer. Cette maladie est caractérisée par des troubles cognitifs (notamment de la mémoire) et par la présence de lésions dans le cerveau des patients.

Dans le cadre de ce projet, des souris *Nxn12-KI* homozygotes et hétérozygotes ainsi que leurs contrôles vont être évaluées dans une batterie de tests comportementaux permettant l'évaluation des fonctions neurologiques et cognitives.

La souris est largement utilisée comme modèle animal pour l'évaluation des processus comportementaux en général et mnésique en particulier. Par ailleurs, il reste de nos jours le modèle de choix pour reproduire des mutations génétiques humaines afin d'en étudier les conséquences et de rechercher de nouveaux traitements pour les maladies neurologiques et psychiatriques.

Les personnes impliquées possèdent des autorisations d'expérimenter chez les rongeurs, et connaissent très bien les règles et appliquent les recommandations éthiques pour limiter la souffrance des animaux.

Nous utiliserons un ensemble de tests validés d'un point de vue scientifique et éthique, dans un ordre précis afin d'éviter tout effet d'un test comportemental sur le suivant. Ces tests permettront d'obtenir des informations se recoupant, afin d'obtenir un ensemble d'informations cohérent et statistiquement significatif ; tout en minimisant le nombre d'animaux utilisés.

Réduction

Nous utiliserons 36 souris en tout (12 animaux par génotype). Dans les études comportementales, cet effectif est suffisant pour montrer une différence statistique entre les groupes expérimentaux, si elle existe.

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. Aucun phénotype douloureux majeur n'est attendu.

Par ailleurs, des analyses statistiques appropriées seront utilisées pour optimiser l'utilisation des animaux. Nous utiliserons l'analyse de la variance à plusieurs facteurs (intergroupe, temps,...) pour éprouver les effets observés. Pour minimiser le nombre d'animaux utilisés, les différents tests seront réalisés sur les mêmes animaux.

Raffinement

Nous avons en place des conditions appropriées pour maintenir le bien-être des animaux. Les souris seront groupées de façon homogène pour réduire la variabilité qui pourrait résulter de conditions environnementales hétérogènes. Notre département est certifié ISO9001, donc avec des procédures expérimentales documentées et maîtrisées (bordereaux de travail standardisés, traçabilité, archivage,...).

Remplacement

En l'état actuel des connaissances, les processus comportementaux tels que l'apprentissage, la mémorisation, ou les comportements relevant de la psychiatrie ne peuvent pas être étudiés par des études in silico ou in vitro.

Les objectifs majeurs de ce projet est de montrer que le gène Nxn12 pourrait être une cible thérapeutique pour le traitement de troubles comportementaux tels que la maladie d'Alzheimer.

2093- Les succès récents obtenus en immunothérapie démontrent que la restauration d'une bonne immunité chez les sujets porteurs de tumeurs malignes est un élément essentiel et même pratiquement obligatoire pour obtenir la guérison de ces patients. Notre équipe a mis en évidence les effets délétères d'une protéine immunosuppressive (PI) dont les effets se font sentir dans plusieurs types de cancers humains ; par exemple dans les cancers du cavum (en arrière des fosses nasales) ainsi que dans les cancers du rein et du foie. Poursuivant à la fois des objectifs de recherche fondamentale et d'application thérapeutique, notre équipe a produit des anticorps monoclonaux qui sont capables in vitro de neutraliser les effets de la PI. Pour pouvoir envisager sérieusement l'utilisation d'agents thérapeutiques dérivés de ces anticorps monoclonaux, il est nécessaire d'avoir la preuve de leur capacité d'action et de l'absence d'effets secondaires inacceptables en les soumettant à des tests d'efficacité et de sécurité dans des organismes entiers. Comme la grande majorité des immuno-modulateurs, notre PI exerce ses effets sur un grand nombre de types cellulaires. Il est donc impossible d'anticiper la résultante de tous ces effets combinés dans un organisme humain sans passage par un mammifère entier. C'est la raison pour laquelle il n'existe pas actuellement d'alternative possible à des évaluations de nos anticorps sur des modèles murins de lignées tumorales riches en PI. Ceci doit nous permettre d'avoir des arguments solides pour ou contre la préparation d'un éventuel essai clinique. Un élément favorable dans ce contexte est le fait que nos anticorps monoclonaux anti-PI réagissent aussi bien avec la protéine humaine qu'avec la protéine de souris. Ceci valide a priori le modèle murin.

C'est pourquoi nous nous proposons d'utiliser une lignée de cancer de souris produisant de fortes quantités de PI qui seront inoculées à des souris syngéniques, c'est-à-dire de même groupe tissulaire (souris Balb-C). Ces souris seront de deux types : souris Balb-C non modifiées génétiquement ou souris modifiées génétiquement pour la PI. Après inoculation tumorale, les souris seront traitées soit avec des anticorps témoins soit avec des anticorps anti-PI et nous verrons si les anticorps anti-PI permettent de ralentir la croissance tumorale ou même de faire régresser ces tumeurs.

En termes de remplacement, notre équipe développe des outils biologiques qui devraient permettre à l'avenir de tirer le maximum d'informations lors des essais cliniques anti-PI chez l'homme et peut-être même chez des animaux domestiques victimes de tumeurs spontanées. Dans le futur, ceci devrait permettre de limiter le recours à l'expérimentation animale pour l'étude des anticorps anti-PI. Le caractère indispensable du recours à la souris pour ce projet est démontré ci-dessus.

En termes de réduction, nous prévoyons de limiter l'effectif des souris à traiter sans pour autant compromettre l'évaluation statistique des résultats. Cet objectif sera atteint en combinant l'étude des effets anti-tumoraux avec une étude des cellules du système immunitaire et de biomarqueurs biologiques. Nous prévoyons d'arriver à une preuve de concept avec un effectif de 120 souris.

En termes de raffinement, il faut noter que les tumeurs seront positionnées sur le flanc des animaux de façon à générer le moins possible d'inconfort. La surveillance clinique quotidienne des animaux permettra de dépister les tous les problèmes pour action immédiate. Des dispositifs d'enrichissement du milieu seront installés dans les cages. Tous les prélèvements sanguins ou tissulaires auront lieu dans des conditions d'absence totale de sensibilité, soit sous anesthésie profonde et irréversible soit après la mise à mort. Enfin, les souris modifiées génétiquement utilisées dans ce projet ne sont pas sujettes à des souffrances ou à des dysfonctionnements générateurs d'inconfort du fait de la manipulation génétique (phénotype non dommageable).

2094- Ce projet a pour objectif d'étudier l'efficacité anti-tumorale de l'association de vaccins peptidiques avec des anticorps immunomodulateurs.

Notre société développe des vaccins thérapeutiques innovants destinés aux patients atteints de cancer. Ils sont composés de plusieurs peptides dits « immunogènes » c'est-à-dire capables d'induire une réponse immunitaire qui sera spécifiquement dirigée contre les cellules tumorales. L'efficacité de ce type de produit est liée à l'expression par le patient vacciné, d'un déterminant particulier du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (ou CMH), système notamment impliqué dans la tolérance ou le rejet des greffes. Notre portfolio clinique se compose actuellement de 2 vaccins : l'un composé d'un peptide qui cible la télomérase actuellement en phase IIb et l'autre composé d'un polypeptide ciblant trois antigènes de tumeurs universels qui est en phase I.

Dans le domaine de l'immunothérapie antitumorale, les traitements innovants s'articulent autour de plusieurs axes. Parallèlement au développement des vaccins thérapeutiques, les anticorps immunomodulateurs développés depuis quelques années permettent d'entrevoir des pistes thérapeutiques prometteuses.

Ces anticorps tel que anti PD-1, anti PDL-1 et anti CTLA-4 agissent en supprimant les voies de régulation qui se mettent en place naturellement lors de l'induction d'une réponse immunitaire, notamment antitumorale, et qui conduisent à contrôler négativement la prolifération de cellules cytotoxiques spécifiques.

La combinaison de nos vaccins qui conduisent à l'expansion de lymphocytes cytotoxiques spécifiques des cellules tumorales, et l'atténuation des boucles de régulations de l'expansion de ces cellules via les anticorps immunomodulateurs est donc une approche très complémentaire dans le traitement du cancer. Cette double thérapie devrait permettre d'obtenir un effet synergique sur le traitement du cancer.

C'est précisément ce que nous souhaitons étudier dans le cadre de ce projet en utilisant un modèle de mélanome de souris murin de mélanome et d'anticorps immunomodulateurs.

En préalable à l'étude in vivo, une série de test in vitro ont été effectués pour valider le modèle cellulaire utilisé (vérification de l'expression des molécules cibles par mélanome murin B16). A l'issue de ces validations, le modèle in vivo de souris HLA-DR3 greffées en sous cutanée avec ces cellules B16-HHD seront utilisées.

Le recours au modèle animal HLA-DR3 est alors indispensable pour évaluer quantitativement et qualitativement la réponse immunitaire induite dans sa globalité ainsi que l'efficacité antitumorale des combinaisons thérapeutiques étudiées. Une attention particulière sera portée à grouper les expériences dans la mesure du raisonnable pour l'expérimentateur pour diminuer le nombre de souris utilisées dans le groupe contrôle nous permettant d'utiliser 393 souris au lieu de 457. Dans un souci de raffinement, les souris seront placées en cages collectives, lors de l'immunisation un massage sera effectué au point d'injection pour éviter l'accumulation local du produit qui pourrait être douloureux, en cas de plaie apparente un traitement quotidien à base de bétadine sera effectué.

2095- Le but du projet est de déterminer comment des changements dans la balance énergétique intracellulaire peuvent influencer le métabolisme des carbohydrates dans le muscle squelettique durant un test d'exercice ou une contraction musculaire. Il est notamment reconnu qu'un exercice ardu, de forte intensité, engendre un déficit énergétique dans le muscle squelettique, pouvant être détecté par des enzymes intracellulaires permettant de « détecter ou de mesurer » l'énergie. Ces enzymes jouent a priori un rôle dans le contrôle du réseau métabolique et compenseraient la perte d'énergie qui se produit lors d'un exercice musculaire. Afin de valider expérimentalement cette hypothèse, nous avons créé un modèle de souris génétiquement modifiée portant une mutation qui désactive une enzyme « sensible » à l'énergie fonctionnant dans le muscle, de telle manière qu'il pourrait potentiellement y avoir une perte du contrôle du métabolisme des carbohydrates durant un exercice. L'utilisation de l'animal est indispensable pour cette étude car les interactions entre tous les organes impliqués dans le métabolisme ne peuvent être remplacées par des techniques in vitro. De plus, la souris étant l'espèce dans laquelle les mutations génétiques sont les mieux maîtrisées à l'heure actuelle, nous pourrons étudier ce gène en particulier.

Pour cela, un protocole utilisant une cohorte de 20 animaux mâles (10 souris mutées pour le gène d'intérêt et 10 souris contrôles) consistera à étudier les paramètres sanguins, métaboliques et musculaires. Afin d'éviter tout stress, les prises de sang seront effectuées sous anesthésie générale et un analgésique local sera administré.

Cet effectif de 20 animaux sera utilisé afin d'obtenir une puissance statistique suffisante à l'étude. Ainsi, les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter toute redondance dans l'étude des phénotypes engendrés par la mutation.

Nous n'attendons pas de symptômes dommageables chez ces souris. Cependant, le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état général des animaux.

2096- La thérapie génique consiste à corriger une maladie héréditaire par un transfert de gène à l'intérieur des cellules malades, ce qui permettra à l'organisme de fabriquer ses propres médicaments pour lutter contre la maladie.

Ce transfert de gène est réalisé à l'aide d'un véhicule ou vecteur issu d'un virus qui a été modifié pour ne plus être pathogène (vecteur recombinant).

Les vecteurs viraux recombinants dérivés du virus adeno-associé (rAAV) sont des vecteurs de choix pour le transfert de gène à long terme dans différents tissus.

Cependant, l'homme est naturellement exposé au virus et développe une immunité médiée par les anticorps contre la structure externe du virus (la capsid). Ces anticorps neutralisants sont capables de reconnaître des structures similaires sur les vecteurs rAAV et d'entraîner la neutralisation des vecteurs injectés qui ne peuvent donc plus atteindre leur cible et permettre un transfert de gène efficace.

Ce problème empêche 2/3 des individus de bénéficier de la thérapie génique par administration directe. Par ailleurs, l'injection unique d'un vecteur rAAV chez un hôte séronégatif induit aussi le développement d'anticorps neutralisants et empêche la réadministration de ce même vecteur ; limitant les approches thérapeutiques. Ainsi, même si des études antérieures se sont préoccupées de ce problème, elles n'apportent pas de solutions face à une forte immunité ; il est donc absolument indispensable de développer de nouvelles stratégies pour traiter les individus séropositifs pour l'AAV.

Par cette étude, nous souhaitons identifier des traitements pharmacologiques sûrs et réversibles, ce qui nous permettra de réduire voire de bloquer le rejet de la thérapie génique médiée par le vecteur rAAV et ainsi donner accès à un plus grand nombre à ce traitement prometteur.

Dans le respect de la règle des 3R, une pré-évaluation des agents pharmacologiques et des différents vecteurs rAAV sera réalisée in vitro et/ou sur la base d'études cliniques chez l'homme (Remplacement), et seuls les traitements ayant montrés un transfert optimale de gène seront retenus pour les expérimentations in vivo.

En vue de réaliser ce projet, nous souhaiterions étudier un total de 1110 souris, ce nombre a été calculé et réduit à l'aide d'un test statistique afin d'obtenir des résultats les plus robustes (Réduction).

L'utilisation de la souris nous permettra l'évaluation indépendante des différents traitements afin d'estimer les conditions optimales à leur efficacité. L'avantage de ce modèle est qu'il a la capacité de développer des anticorps neutralisants contre la capsid suite à l'administration des vecteurs rAAV.

Chaque animale présentera un tableau de suivi afin de s'assurer de l'absence de souffrance de nos souris. Nous nous attacherons également, dans un souci d'application de ces principes, à faire en sorte d'optimiser l'utilisation combinée d'analgésiques et d'anesthésiques lors des différents prélèvements (sang et tissus). Enfin nous optimiserons l'utilisation des animaux entre procédures chaque fois où cela s'avère possible.

2097- Notre projet de recherche consiste à utiliser un modèle de néovascularisation de la cornée chez le rat. Ce modèle permet d'évaluer des molécules à visée thérapeutique dont les anticorps monoclonaux possédant des propriétés antiangiogéniques. Environ 135 rats sont prévus pour la mise en œuvre de ce projet. 20 groupes de rats sont prévus pour l'évaluation d'efficacité de 7 anticorps monoclonaux ayant des propriétés anti-angiogéniques. Des tests statistiques sont utilisés afin d'obtenir des résultats exploitables. Les animaux auront recours à l'anesthésie, à l'analgésie et à des soins pré, per et post-opératoires. Il est à noter que des méthodes alternatives validées ne sont pas encore disponibles pour évaluer les anticorps monoclonaux thérapeutiques à visée antiangiogénique. Ainsi, cette approche serait une porte ouverte dans le traitement des pathologies oculaires ayant pour cause le développement de néovaisseaux (angiogenèse). Ces pathologies telles que la néovascularisation de la cornée, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) sont à l'origine de troubles et de la perte de la vision dans le monde. La DMLA est fréquente après 75 ans et touche 12% à 14% de la population .

2098- Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer un potentiel effet anxiolytique ou anxiogénique d'un candidat-médicament chez le rongeur (rat et souris) soumis au test du labyrinthe en croix surélevé.

Les troubles anxieux sont un groupe de problèmes psychologiques et dont les symptômes sont notamment une anxiété excessive, un sentiment de peur, d'inquiétude et des comportements d'évitement et de compulsivité. Chez l'homme, ils comprennent : les crises de panique, la névrose obsessionnelle compulsive, les phobies, le trouble d'anxiété généralisée, le syndrome de stress post-traumatique (peur à la suite d'un événement traumatisant).

Les rongeurs ont peur du vide et ont une tendance naturelle à chercher la sécurité dans des endroits sombres. Le test du test du labyrinthe en croix surélevé consiste à placer les rongeurs dans un labyrinthe surélevé par rapport au sol d'environ 60 cm et constitué de 4 bras en forme de croix (2 bras fermés avec des parois hautes et opaques, 2 bras ouverts) pendant 5 minutes. Les rongeurs vont avoir tendance à se réfugier dans les bras fermés (plus sombres, donc plus sécurisants) et à rester peu de temps dans les bras ouverts, dans lesquels leur curiosité naturelle les pousse. Les conditions de luminosité de la pièce expérimentale (pièce soit très lumineuse soit faiblement illuminée) vont influencer directement sur le niveau d'anxiété des animaux. Ces conditions expérimentales sont destinées soit à augmenter soit à réduire (selon le protocole utilisé) l'anxiété naturelle des rongeurs. Le niveau d'anxiété des animaux est évalué par le temps passé et le nombre d'entrées effectuées dans les bras ouverts pendant les 5 minutes du test.

Au cours de chaque étude, les rats ou les souris (10 par groupe) sont traités avec le candidat-médicament testé à 3 doses différentes, un produit de référence ou le véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée (total de 5 groupes par étude, soit un nombre prévisionnel maximum de 9000 animaux sur 5 ans).

Ce projet est réalisé sur le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences in vitro) pour évaluer les effets les effets anxiolytiques ou anxiogéniques d'un candidat-médicament. A ce jour, le rongeur est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude. Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique. Dans ce projet, le raffinement est effectué par la mise au point de procédures rigoureuses, la formation du personnel et le recours à des procédures peu invasives (Règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement).

2099- Le virus du chikungunya circule régulièrement sous le mode endémique en Afrique, et sous le mode épidémique en Asie du Sud Est et en Inde. Le vecteur est un moustique du genre *Aedes*. En 2004-2008 il a été responsable de flambées épidémiques importantes dans les îles de l'océan Indien. En 2013, le virus a gagné les Antilles puis l'Amérique latine et la Polynésie française en 2014, où *Aedes* est bien implanté. Fin 2014, un cluster d'une dizaine de cas autochtones a été rapporté dans le sud de la France.

Classiquement les symptômes sont une forte fièvre accompagnée de myalgies et poly-arthralgies. L'évolution spontanée après une phase symptomatique de 7-10 jours est le plus souvent favorable. Dans 10-20% des cas on assiste cependant à la persistance d'arthralgies invalidantes, en particulier chez les personnes de plus de 60 ans. Chez les femmes enceintes, le virus peut être transmis au fœtus et provoquer une encéphalite néo-natale avec séquelles et/ou un avortement. Lors des importantes épidémies de 2006, des formes graves de la maladie sont apparues avec des atteintes d'organes (méningoencéphalites, polyradiculonévrites, hépatites fulminantes, myocardites...) voire des décès chez des personnes âgées ou présentant des comorbidités.

Le diagnostic du chikungunya est basé sur la RT-PCR et/ou la recherche d'IgM spécifiques suivant si les symptômes sont présents depuis moins ou plus de 5 jours. Les IgG sont détectables à partir du quinzième jour. L'OMS préconise la co-détection du virus et des IgM. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de solution diagnostique robuste permettant de détecter les antigènes viraux lors de la phase aiguë de la maladie.

Nous désirons développer un test microfluidique permettant une détection rapide, à coûts raisonnables, des antigènes viraux chikungunya dans le sang. Ce test, basé sur la réaction anticorps-antigène, nécessite de disposer d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux très sensibles.

Des immunisations préalables réalisées chez la souris ont permis d'obtenir des anticorps monoclonaux dirigés uniquement contre les protéines d'enveloppe E1 et E2 du virus.

Les anticorps polyclonaux sont connus et utilisés pour apporter la sensibilité faisant parfois défaut aux anticorps monoclonaux. Si ils sont induits par des éléments qui miment la particule virale, comme par exemple les VLP (Viral-Like Particles), ils peuvent potentiellement détecter toutes les protéines virales.

A notre connaissance, il n'existe pas actuellement d'anticorps polyclonaux disponibles ayant la qualité répondant à nos besoins.

L'immunisation d'animaux permettra d'obtenir un immun sérum qui, une fois purifié, fournira les anticorps polyclonaux qui seront évalués dans nos tests. Le choix des animaux, le nombre d'animaux par série, les immunogènes et le protocole ont été définis de manière à minimiser le nombre d'injections et à obtenir la meilleure réponse immunitaire possible. Il est prévu pour notre projet d'immuniser plusieurs séries de 2 ou 4 lapins. Le nombre total de lapins immunisés sera le plus faible possible pour développer les anticorps dont nous avons besoin, en aucun cas, il ne sera supérieur à 10. La stabulation des animaux sera réalisée dans des conditions conformes à la réglementation et adaptées au bien-être des animaux (ambiance musicale...)

2100- Notre société développe des vaccins thérapeutiques innovants destinés aux patients atteints de cancer. Ils sont composés de peptides dits « immunogènes » c'est-à-dire capables d'induire une réponse immunitaire qui sera spécifiquement dirigée contre les cellules tumorales. L'efficacité de ce type de produit est liée à l'expression par le patient vacciné, d'un déterminant particulier du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (ou CMH), système notamment impliqué dans la tolérance ou le rejet des greffes. Notre portefeuille clinique se compose actuellement de 2 vaccins : l'un composé d'un peptide qui cible la télomérase actuellement en phase IIb et l'autre composé d'un polypeptide ciblant trois antigènes de tumeurs universels qui est en phase I. Ces 2 vaccins sont restreints par la molécule HLA- A*0201.

Ce nouveau projet basé sur la même technologie que le premier vaccin vise à développer deux nouveaux vaccins : un vaccin spécifique des patients HLA-A24 (soit 25% de la population et jusqu'à 40% de la population asiatique) et un vaccin spécifique des patients HLA-B7 (soit 25% de la population). Le développement de ces deux nouvelles molécules, en plus des vaccins que nous avons développé pour le HLA-A2, nous permettrait d'augmenter considérablement la proportion des malades atteints de cancer qui pourront bénéficier de nos traitements.

Chaque candidat vaccin est composé de deux peptides : un peptide dit natif, naturellement exprimé par les cellules tumorales mais trop peu pour générer une réponse immunitaire efficace (il est dit non immunogène), et un peptide optimisé dit immunogène, qui lui permet de stimuler une réponse immunitaire forte dirigée spécifiquement contre les cellules tumorales. En préalable à l'étude in vivo, une série de tests in vitro (test de « binding » et culture de PBMC humain) ont été effectués pour réduire le nombre de cibles à tester in vivo.

Concernant la conception du vaccin TERT restreint HLA-B*0702, sur 22 couples candidats désignés au départ nous n'en avons retenu que 10 pour être finalement testés en étude in vivo. Dans un but de raffinement notre approche in vivo sera séquentielle : nous testerons dans un premier temps l'ensemble des peptides natifs. Cette première étape devrait nous permettre d'identifier 2 ou 3 natifs immunogènes qui seront donc exclus. Dans un second temps nous testerons les peptides optimisés correspondant aux peptides natifs retenus, parmi ceux-là nous éliminerons les moins immunogènes. Au regard de l'ensemble des résultats obtenus in vitro et in vivo nous retiendrons 2 couples que nous testerons pour le protocole clinique avec 2 séquences possibles de traitement soit 6 injections de peptides modifiés ou 2 injections de modifiés et 4 injections de peptides natifs.

Concernant la conception du vaccin TERT restreint HLA- A*2402, sur 20 couples désignés au départ nous n'en n'avons retenu que 8 pour passer en étude in vivo. Comme pour le vaccin HLA-B*0702, nous testerons dans un premier temps l'ensemble des natifs. Puis dans un second temps nous testerons les peptides optimisés correspondant aux peptides natifs retenus. Au regard de l'ensemble des résultats obtenus in vitro et in vivo nous retiendrons 2 couples que nous testerons pour le protocole clinique avec 2 séquences possibles de traitement soit 6 injections de peptides modifiés ou 2 injections de modifiés et 4 injections de peptides natifs.

Le recours aux modèles animaux HLA-B*0702 et HLA-A*2402 est indispensable pour évaluer quantitativement et qualitativement la réponse immunitaire induite dans sa globalité. L'approche séquentielle utilisée in vivo ainsi que l'ensemble des expérimentations in vitro permettent de réduire le nombre de souris de 504 souris à 228 souris. Dans un souci de raffinement, les souris sont placées en cages collectives, lors de l'immunisation un massage est effectué au point d'injection pour éviter l'accumulation local du produit qui pourrait être douloureux, en cas de plaie apparente un traitement quotidien à base de bétadine sera effectué.