



**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 (22)

2201- L'agressivité du glioblastome, une tumeur cérébrale de haut grade chez l'homme, est corrélée positivement à la présence de cellules cancéreuses souches et à leur vascularisation. De manière intéressante, les cellules souches cancéreuses sont situées dans une niche où elles établissent des interactions privilégiées avec les cellules vasculaires, qui modifient leurs propriétés de manière réciproque.

Des données récentes de notre laboratoire ont permis de montrer que bloquer la communication entre cellules cancéreuses souches et cellules vasculaires réduit les propriétés agressives tumorales in vitro. Il est nécessaire de valider ces résultats dans un modèle expérimental animal qui reproduit au mieux les conditions pathologiques. Les expériences d'interaction de progression tumorale seront donc réalisées par implantation sous-cutanée et intracrânienne des cellules tumorales humaines chez la Souris (*Mus musculus*, BALB/c nude) avec un total de 275 animaux. De la même manière, des cellules tumorales de souris seront implantées chez la Souris (*Mus musculus*, C57BL/6) avec un total de 155 animaux.

Tout au long de ces études, des méthodes alternatives de culture de cellules seront utilisées pour disséquer les mécanismes moléculaires sous-jacents. En outre, un nombre de dix animaux par groupe permettra d'assurer la puissance statistique nécessaire à l'analyse des données expérimentales. Les groupes contrôles seront partagés entre plusieurs groupes expérimentaux et plusieurs paramètres seront mesurés par protocole. Ces dispositions permettront de réduire le nombre d'individus tout en assurant la qualité des résultats expérimentaux. La définition des points limites et la réduction de la douleur enfin contribueront au raffinement des protocoles. Les résultats obtenus in vivo devraient alors permettre d'apporter les preuves de concept nécessaires pour le développement futur d'outils thérapeutiques et/ou diagnostiques dans le cadre des tumeurs du cerveau.

2202- Les études récentes sur le stress chronique révèlent que tous les individus ne sont pas égaux face aux conséquences du stress. Ainsi, chez les mammifères, les animaux les plus anxieux développent plus rapidement un état pathologique de stress chronique. L'identification de marqueurs de prédisposition aux effets négatifs du stress chronique constitue donc un enjeu important pour les prochaines années. Nos travaux récents sur des lignées de cailles japonaises génétiquement sélectionnées révèlent que, chez l'oiseau, le niveau de réactivité émotionnelle de l'individu, potentialise les conséquences comportementales et physiologiques du stress chronique et constitue un facteur de prédisposition.

Notre projet vise donc à davantage caractériser si la réactivité émotionnelle de l'oiseau constitue bien un facteur de fragilité face aux conséquences du stress chronique. En particulier, nous examinerons l'impact de ce trait sur une des conséquences neurobiologiques importantes du stress chronique, l'altération de la neurogénèse hippocampique. Des études récentes ont en effet montré que le stress chronique affecte la neurogénèse hippocampique et qu'un traitement aux antidépresseurs restaure la neurogénèse hippocampique et supprime les désordres comportementaux associés. Ce projet est en adéquation avec les exigences de :

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

Réduction : 270 cailles mâles seront requises ce qui constitue un nombre minimal compte tenu des aléas expérimentaux pour tester statistiquement l'hypothèse.

Raffinement : Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales d'alimentation, de soins. Des enrichissements supplémentaires à la réglementation seront même utilisés pour favoriser le bien-être des animaux. Par exemple des tapis au sol seront ajoutés dans les cages afin que les oiseaux puissent exprimer des comportements de confort comme les bains de poussière.

2203- La transplantation représente un moyen thérapeutique efficace pour contrer le dysfonctionnement de certains organes ou pour traiter différentes pathologies (comme les cancers). Cependant, en absence de traitement du receveur, le greffon est rejeté par le système immunitaire de l'hôte. Aujourd'hui, le rejet de greffe est contrôlé par l'utilisation

d'immunosuppresseurs pharmacologiques. Ces drogues ont cependant des effets secondaires importants. C'est pourquoi la recherche en transplantation vise à trouver des traitements alternatifs à ces immunosuppresseurs. Une des stratégies les plus prometteuses consiste à injecter des cellules protectrices du greffon au receveur, on parle alors de thérapie cellulaire. Au sein de notre unité, nous travaillons sur des protocoles de thérapie cellulaire permettant la survie du greffon à l'aide de modèle de greffes chez l'animal.

Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons étudier les effets d'une population de cellules immunorégulatrices appelée CpG-ProB en transplantation de peau chez la souris. Ces cellules progénitrices de lymphocytes B issues de la moelle osseuse ont déjà montré leur efficacité pour contrôler le développement de maladies auto-immunes (modèles murins de diabète et de sclérose en plaque). Une fois l'effet de cette thérapie cellulaire démontrée en transplantation, nous rechercherons les mécanismes utilisées par ces cellules pour favoriser la survie du greffon.

La nature de notre projet ne permet pas de s'affranchir de l'utilisation d'animaux ; le même niveau d'information ne pouvant pas être apporté par des études *in vitro* ou *in silico*. La réalisation de greffes chez la souris est ainsi indispensable pour étudier l'efficacité des CpG-ProB en transplantation et comprendre les mécanismes liés à leur utilisation en transplantation. De plus, l'évaluation des CpG-ProB en transplantation n'a jamais été réalisée à ce jour. Nous estimons que ce projet nécessitera environ 765 souris afin d'avoir une bonne appréciation de l'efficacité des CpG-ProB en utilisant des tests statistiques adaptés aux petits échantillonnages. Nous réaliserons en moyenne un groupe de greffe tous les 15 jours. Nous pensons que les greffons seront rejetés dans une fenêtre d'environ 10-15 jours en l'absence de traitement. Si nos traitements n'ont pas d'effet, nous le saurons donc avant le prochain groupe d'animaux greffés.

Les animaux sont hébergés au sein d'une animalerie, à raison de 5 souris par cage. Les procédures expérimentales susceptibles d'être douloureuses ou entraîner toute sorte de souffrance (greffe de peau) seront réalisées sous anesthésie. Une surveillance quotidienne du greffon ainsi qu'un suivi clinique et comportemental des animaux (poils hérissés, dos voûté, agressivité...) sera réalisé.

2204- Le projet consiste en la réalisation de campagnes d'immunisation destinées à la production d'antisérum de mouton. Les anticorps de mouton anti-lapin ainsi produits sont poolés puis purifiés afin d'être utilisés dans la fabrication de deux kits de diagnostic *In Vitro* :

- un kit de dépistage néonatal de l'hyperplasie congénitale des surrénales.
 - un kit de dosage de la gastrine humaine en sérum ou plasma. Le dosage de la gastrine trouve son application principale dans le diagnostic précoce du syndrome de Zollinger-Ellison, tumeur gastrino-sécrétante le plus souvent d'origine pancréatique.
- Il n'existe pas à notre connaissance de modèle *in-vitro* satisfaisant permettant la production d'anticorps anti-lapin ayant l'affinité et la spécificité répondant à nos besoins.

Le projet utilisera un maximum de 18 animaux sur la période de 5 ans.

Avec l'expérience sur un grand nombre d'année, le protocole est établi sur un nombre d'animaux assez faible permettant néanmoins de minimiser l'effet « animal ».

Les animaux sont hébergés et soignés quotidiennement dans des conditions conformes à la réglementation (en groupes de quelques animaux) et adaptées au comportement grégaire de l'espèce.

L'expérience a aussi montré que cette immunisation ne conduit jamais à une détérioration de l'état général des animaux et n'a jamais nécessité la mise en œuvre de médication dans le but de réduire douleur, souffrance ou angoisse. La surveillance quotidienne permet en outre le déclenchement, si nécessaire, de soins locaux au niveau des sites d'injection de l'antigène.

Dans tous les cas, une dégradation de l'état général des animaux déclenche une demande de conseil auprès du vétérinaire.

2205- *Clostridium difficile* est une bactérie anaérobie stricte, première cause de diarrhée nosocomiale chez l'adulte dans les pays développés et en

particulier en France (> 24000 cas par an, 14 % de formes compliquées marquée par 3% de mortalité). La contamination se fait à partir des spores, forme de résistance et hautement contagieuse de la bactérie, largement présentes dans l'environnement des services de

soins hospitaliers. Les infections à *C. difficile* peuvent évoluer sur un mode épidémique (exemple de l'épidémie qui a touché tout le Nord de la France en 2006), et représentent un coût sanitaire important, en raison de l'augmentation des durées moyennes de séjours et du surcoût des soins associés. Malgré des traitements antibiotiques généralement efficaces, les récurrences des infections à *C. difficile* sont fréquentes (environ 20%) et des résistances aux antibiotiques apparaissent.

Notre laboratoire souhaite étudier la réponse globale de l'hôte à cette infection. Les microARN (miRNAs) jouent un rôle dans la régulation de l'expression de certains gènes. Ils sont de plus en plus décrits dans la réponse de l'hôte aux infections bactériennes et sont notamment retrouvés dans le sérum de l'hôte. Ils pourraient être fortement impliqués dans la réponse inflammatoire développée au niveau de l'intestin, lieu de l'infection par *C. difficile*. Ces microARN pourraient ainsi s'avérer des marqueurs fiables de l'infection à cette bactérie, mais également des nouvelles cibles thérapeutiques.

L'utilisation d'un modèle animal constitue donc l'étape incontournable afin de caractériser les miRNAs produits lors de l'infection par *C. difficile*.

L'exigence de réduction, raffinement, et remplacement des animaux sera respectée avec d'une part une souffrance animale résultant d'une diarrhée modérée spontanément résolutive extrêmement réduite et une intervention minimale sur l'animal jusqu'au point final et d'autre part la réduction au maximum du nombre d'animaux afin de conclure sur ces expériences sans avoir besoin de les renouveler. Ainsi, un minimum de 10 souris par groupe (6 groupes) est nécessaire pour obtenir suffisamment de puissance statistique soit 60 animaux sur l'ensemble des essais programmés.

Les résultats de cette étude permettront de mieux comprendre la physiopathologie de l'infection à C. difficile.

2206- La greffe d'îlots pancréatiques est aujourd'hui une thérapie prometteuse pour les diabétiques de type 1 présentant des épisodes d'hypoglycémie sévère. Cependant, le nombre de pancréas nécessaires pour obtenir suffisamment d'îlots permettant de restaurer l'insulino-indépendance est élevé et limite le nombre de patients y ayant accès. Une perte importante d'îlots est enregistrée pendant la procédure et est en partie due aux phénomènes d'ischémie reperfusion. L'objectif de ce projet est d'améliorer la survie des îlots pré et post-transplantation en préparant le pancréas du donneur en amont de la procédure par un pré-conditionnement ischémie/reperfusion à distance. Le pré-conditionnement consiste en l'habituation des cellules à un phénomène traumatique par une exposition répétée à ce même phénomène mais suffisamment courte (ici ischémie reperfusion) pour ne pas déclencher la mort cellulaire. Il peut se faire par clampage direct de l'organe ou à distance par clampage d'un autre organe ou par un garrot. Les cellules ainsi exposées vont se préparer à subir ce type de stress et mettre en place une défense adaptée (anti-oxydante, anti-inflammatoire). En activant les défenses intrinsèques de l'organe, il serait donc possible de protéger le pancréas et surtout les îlots pancréatiques d'optimiser la fonction du greffon. Le clampage local (artère mésentérique) a montré des résultats intéressants quant à la survie des îlots pancréatiques in vivo mais la transposition en clinique de cette technique semble compliquée. Ainsi, le but de cette étude est d'obtenir par clampage de la fémorale au moyen d'un garrot les mêmes effets que par clampage mésentérique. Les études combinées sur la survie des îlots in vitro et in vivo, la respiration mitochondriale et la métabolisme vont permettre de déterminer si le pré-conditionnement à distance permet de diminuer les dommages cellulaires, l'hypoxie, le stress oxydant et l'inflammation.

Le projet se déclinera en 2 étapes et sera mené chez le Rat. La première étape qui nécessitera 280 rats wistar, permettra de mettre en place le modèle de pré-conditionnement ischémique (PCI) du pancréas et de déterminer si le PCI permet d'augmenter le rendement et la survie des îlots pancréatiques in vitro. En parallèle, il sera vérifié que les PCI utilisés ne sont pas délétères sur d'autres organes. La deuxième étape, qui nécessitera 673 rats Lewis, aura pour objectif de confirmer les effets bénéfiques de PCI en étudiant cette fois in vivo la survie des îlots pancréatiques après transplantation intraportale chez le Rat diabétique.

La règle des 3R, soit réduire, raffiner, remplacer est respecté. Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaires pour obtenir des résultats statistiques et ne pas avoir à recommencer l'étude.

2207- Les maladies du système ostéoarticulaire, dont l'arthrose et les affections rachidiennes et discales, apparaissent comme la deuxième cause d'invalidité après les maladies cardiovasculaires. La hanche et le genou sont les principales articulations touchées par cette pathologie. La radiographie simple reste l'examen de première intention : elle permet de confirmer ou d'affiner le diagnostic de l'arthrose. En cas d'absence de signe radiologique, d'autres examens d'imagerie sont à la disposition du clinicien. Le projet s'inscrit dans une double problématique de santé publique concernant l'arthrose:

1. Le manque d'outils diagnostiques sensibles et spécifiques, particulièrement en imagerie
2. L'absence de traitements étiologiques de la maladie.

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

Le DPA 714 est un nouveau ligand spécifique de la protéine TSPO (Translocator protein). La TSPO est une protéine située dans la membrane extérieure des mitochondries qui est surexprimée par les macrophages activés lors d'un processus inflammatoire. Lorsque le DPA 714 est relié à un fluor 18 radioactif (18F), cette molécule est proposée comme nouveau radiotraceur de neuro inflammation du système nerveux central. Cependant nous aimerions étudier son marquage sur des inflammations périphériques comme l'arthrose. En effet, lors d'une inflammation arthritique les macrophages se concentrent dans l'articulation en particulier dans la synovie. Ainsi nous pouvons espérer un radiomarquage particulièrement précoce au niveau des articulations arthrosées.

Pour le modèle d'arthrose sur le rat, nous avons choisis deux inductions différentes afin de comparer l'efficacité du marquage du 18F-DPA 714 :

- Induction par injection intra articulaire d'un toxique du cartilage, le mono iodo acétate (MIA), dans le genou ;
- Modèle chirurgical par section du ligament croisé antérieur du genou.

Ces deux modèles ont fait l'objet d'une demande d'autorisation en octobre 2013, et ont été validé par le comité d'éthique de l'établissement utilisateur.

Le modèle chirurgical nécessite une certaine précision et doit se faire sous microscope. Afin de maîtriser totalement cette étape, nous avons choisis de consacrer 3 rats pour l'apprentissage de cette technique. Pour répondre à la problématique de ce projet nous avons besoin de 5 rats induits pour chacun des modèles.

Nous avons besoin d'un total de 13 rats pour ce projet.

Application des 3R :

L'arthrose n'est pas qu'une maladie du cartilage mais de l'ensemble de l'articulation : os sous-chondral, synoviale, ménisques et appareil musculo-ligamentaire. Il s'agit donc d'une pathologie complexe faisant intervenir des facteurs biologiques, biochimiques qui ne peuvent être reproduits par des systèmes cellulaires simplifiés. Ainsi l'impossibilité de suivre ces lésions dans le temps rend les modèles animaux indispensables à l'étude des mécanismes à l'origine des lésions arthrosiques et à la compréhension de leur progression.

Le nombre d'animaux utilisés est le plus bas possible pour avoir des résultats interprétables. En effet, pour chacun des modèles, seulement 5 seront suivis en imagerie durant tout le temps du développement de l'arthrose.

Les deux modèles utilisés sont déjà validés et connus par l'équipe de recherche, ce qui nous permet d'anticiper sur les points limites de l'étude. Nous savons que le moment délicat pour les animaux est le temps post opératoire ou post injection intra articulaire. Une couverture analgésique sera assurée et une surveillance particulière sera faite aux animaux.

2208- Ce projet a pour objectif l'amélioration des modalités de traitement de la fibrillation auriculaire (FA) par l'ablation guidée par cathéter de radiofréquence (RCFA).

La fibrillation auriculaire (FA) est l'arythmie du cœur adulte la plus fréquente. Elle s'accompagne de complications graves telles qu'AVC, insuffisance cardiaque et mortalité prématurée. Le traitement le plus efficace de la FA est la RCFA. Des cathéters sont utilisés pour cautériser les parties du cœur responsable de la FA. La RCFA elle-même est associée à un risque significatif de complications propres, (jusqu'à 3% : on relève des accidents vasculaires cérébraux, des stimulations cardiaque et auriculaire, la survenue de fistules œsophagiennes). A l'heure actuelle, jusqu'à 50% des patients requièrent de multiples procédures pour obtenir un résultat satisfaisant. Une importante cause d'échec thérapeutique ou de récurrence après une première procédure, est l'incapacité à obtenir une ligne ininterrompue de cautérisation lors du traitement de la paroi de l'oreillette.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'utilité d'un nouvel indice d'évaluation de l'efficacité des lésions, le « Lesion Size Index® » ou LSI, index qui prend en compte la force de contact, l'énergie administrée et durée d'application du traitement. L'objectif est d'établir la capacité du LSI à prédire la dimension des lésions atriales effectuées. Cet index pourrait alors prévoir de façon précise la distance avec laquelle un cathéter peut être déplacé après chaque application de radiofréquence afin de créer une lésion continue et suffisamment profonde.

16 cochons Yucatan seront utilisés. Toutes les procédures seront effectuées sous anesthésie générale. Tous les sujets bénéficieront d'une tomographie numérisée/scanner du cœur (cardiac computer tomography - CCT) pour évaluer de manière non invasive l'épaisseur de la paroi atriale, puis d'un cathétérisme cardiaque pour ablation de FA par RCFA.

Des applications successives de traitement par RCFA seront effectuées en se fiant au calcul de l'index composite (LSI). L'efficacité des lésions sera testée en utilisant la stimulation électrique et l'enregistrement à l'intérieur du cœur.

2 semaines plus tard, les sujets seront à nouveau anesthésiés. Chaque sujet effectuera une IRM cardiaque (cardiac magnetic résonance - CMR). Puis 8 animaux bénéficieront d'une nouvelle cartographie électro-anatomique sera effectuée avec répétition des stimulations électriques seront répétées ; et 8 animaux bénéficieront d'une CCT. Ensuite, les 16 sujets seront euthanasiés et les cœurs extraits pour analyse histologique

Ce projet remplit les conditions des 3R :

Remplacement : L'évaluation de l'efficacité d'un traitement par RCFA peut uniquement être effectuée sur un modèle in vivo pour simuler les conditions cliniques. Il n'est actuellement pas possible de reproduire les variables affectant la taille des lésions in vitro.

• Réduction : Le nombre d'animaux a été calculé afin d'avoir une puissance statistique suffisante pour transposer le système chez l'homme. Un échantillon minimum de 16 sujets a une puissance de 80% (seuil statistique de 5%).

Raffinement : Cette étude prévoit des procédures mini-invasives engendrant des douleurs post-opératoires minimales. Les animaux recevront un protocole de soins post-opératoire comprenant, entre les deux procédures interventionnelles, une évaluation clinique quotidienne, des antidouleurs/anti-inflammatoires et un régime standardisé. Des critères d'arrêt anticipés en cas de survenue d'une complication ont été définis.

2209- Avant la 1ère administration d'un nouveau candidat-médicament chez l'Homme, des études de pharmacologie de sécurité, recommandées par différentes directives internationales (ICH5A et S7B et ICHM3(R2)) permettent préalablement d'évaluer la présence ou non d'effets secondaires de cette nouvelle molécule sur les grandes fonctions vitales (cardiovasculaire, respiratoire et système nerveux central). Les résultats, obtenus déterminant le rapport bénéfice/risque et expliquant les effets observés, sont essentiels pour assurer la sécurité des patients.

Ces études sont réalisées tout au long des phases de développement d'un produit : du stade précoce (phase de recherche amont) au stade plus tardif (phase préclinique du développement) afin de sélectionner in fine un candidat-médicament.

Au stade précoce de la recherche d'efficacité et de sélectivité sur la cible thérapeutique, ces investigations permettent d'alerter rapidement sur d'éventuels effets indésirables en fournissant des informations cruciales :

- aux chimistes pour la synthèse d'autres structures chimiques présentant moins d'effets secondaires

- aux biologistes pour l'optimisation, si nécessaire, des modèles expérimentaux prenant en compte ces potentielles alertes,

Dans le cadre de ce projet seules les fonctions cardiovasculaires et respiratoires sont présentées. Plusieurs types de protocoles expérimentaux peuvent être conduits :

- Des procédures sur animaux vigils et libres de tout mouvement pour évaluer les paramètres cardiovasculaires et/ou respiratoires (télémétrie, pléthysmographie, échographie : technologies répondant aux critères de raffinement et de réduction).

- Des procédures sur animaux anesthésiés pour approfondir les mécanismes d'action des molécules testées.

Les 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...), ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal et d'appliquer, si possible, la règle des « 3R » : raffinement, remplacement et réduction.

Un support statistique est apporté par des biostatisticiens, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées et de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les expérimentateurs sont formés et habilités aux gestes techniques impliquant l'utilisation des animaux, et à l'observation des signes cliniques relatifs au bien-être de l'animal tout au long de son existence. Ce projet couvre l'utilisation maximale par an de : 142 primates non humains, 266 chiens, 620 lapins, 870 cobayes, 1626 rats et 550 souris correspondant à un total maximal de 4074 animaux (soit 20370 animaux sur 5 ans). Dans un objectif de réduction du nombre total d'animaux, ces effectifs maximalisés peuvent être réduits par la réutilisation, pour chaque espèce, des animaux dans plusieurs études après concertation avec le vétérinaire clinicien et des scientifiques concernés.

2210- Les études menées au sein de notre centre de recherche, suivant les demandes faites par nos clients, nous amènent périodiquement à devoir former et à entraîner notre personnel technique à diverses méthodes d'administration de traitements par voie orale ou par injections et à des prélèvements sanguins chez le rat.

Ces formations se font en interne, avec l'assistance ou non d'un formateur extérieur disposant de l'autorisation d'expérimenter, sous la responsabilité du vétérinaire et du responsable des animaleries du Centre de Boisbonne.

Ces formations concernent des actes de degré léger de sévérité : prélèvements sanguins à la jugulaire, administration de traitements (sous forme de solution buvable ou de poudre à mettre en suspension) par gavage, injection intra-péritonéale et intraveineuse (veine caudale ou veine péniennne).

Dans le cadre de ces projets de formation interne pour une durée totale de 5 ans, nous estimons avoir besoin en moyenne de 30 rats (Sprague Dawley) par an, soit 150 rats sur 5 ans.

L'application de la règle des 3R au cours de ce projet sera effectuée de la façon suivante :

1) Réduction :

- Le nombre minimum d'animaux est choisi en tenant compte du nombre nécessaire et suffisant à la mise en place de séances de formation adaptées pour une durée de 5 ans au sein de notre animalerie. Un maximum de 30 rats sera nécessaire par an. Aucun test statistique ne sera réalisé dans ce projet étant donné qu'il s'agit ici de formation à des gestes techniques.

- Les formations pour plusieurs techniques seront dans la mesure du possible regroupées afin de limiter le nombre d'animaux utilisés par séance ainsi que le nombre d'anesthésies éventuelles par animal.

2) Raffinement :

Au cours de ce projet, le souci du bien-être animal passera notamment par :

- une période d'acclimatation d'au minimum 7 jours au sein de l'animalerie avant l'entrée des animaux en "protocole"

- de bonnes conditions d'hébergement (soins, enrichissements du milieu)

- un suivi régulier des animaux (observations bi-quotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement)

- l'instauration de points limites pertinents et précoces

- la mise en place de mesures adaptées (anesthésie, analgésie si nécessaire : injection en sous cutanée de buprénorphine à 0.05mg/kg ou euthanasie par des méthodes reconnues : paragraphe 3.3.3)

Le respect du bien être animal au sein du Centre de Boisbonne passe par des conditions d'hébergement adéquates, un suivi par observation biquotidienne des animaux, l'instauration de points limites pertinents et précoces et la mise en place de mesures adaptées si nécessaire (anesthésies, traitements analgésiques ou euthanasie si pas d'autre alternative).

Afin d'améliorer la réactivité du personnel technique animalier, une grille de scoring de la douleur est mise en place dès que celle-ci s'avère nécessaire afin de pouvoir détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates. Cette grille est fournie en annexe à ce document de saisine.

2211- Lors d'une situation d'urgence médicale, il est souvent nécessaire de poser rapidement un catheter (voie veineuse) afin d'injecter les médicaments nécessaires au patient. En effet, cela permet au médicament de faire effet de façon quasi immédiate.

Or, il existe des cas rendant difficile voire impossible la pose de cette voie veineuse: environnement inadapté, bébés/enfants très jeunes, personnes obèses, sujets agités...

Notre projet a pour objectif d'utiliser un nouveau dispositif d'injection pour administrer des médicaments d'urgence par voie intradermique. Le derme est situé juste sous la surface de la peau, et contient de nombreux petits vaisseaux (capillaires), qui pourraient permettre la même efficacité que la voie intraveineuse, mais avec une mise en oeuvre beaucoup plus simple, et applicable à tous les patients.

La pharmacocinétique des produits sera évaluée, en comparant la voie intradermique et la voie intraveineuse, chez le Porc.

Durant le projet, au maximum 90 porcs seront utilisés: ce nombre est le minimum indispensable pour obtenir des résultats scientifiquement exploitables en testant 6 médicaments par an sur 5 ans. Cependant, le nombre total pourra être diminué en fonction du nombre de produits évalués, et des résultats obtenus.

L'utilisation d'animaux ne peut être évitée, car l'objectif est d'évaluer la diffusion de produits dans le sang après injection: il est donc nécessaire d'avoir un organisme entier et fonctionnel. Le Porc a été choisi car il est démontré que les propriétés de sa peau sont très proches de la peau humaine.

Les porcs seront hébergés dans des conditions adaptées à leur espèce, avec possibilité de contacts avec leurs congénères, et avec des jouets (ballons, jouets à mâcher)

2212- Les cyclodextrines (CDs) sont des sucres assemblés pour former des nanovecteurs capables de délivrer des médicaments. La modification de ces CDs par voie chimique ou enzymatique permet de leur conférer des propriétés

spécifiques (élimination rénale ou hépatique, plus ou moins rapide, spécificité d'organe...). Pour évaluer leur biodistribution et leur cinétique, ces CDs seront radiomarquées et injectées chez la souris afin de réaliser de l'imagerie in vivo non invasive SPECT/CT et des études de biodistribution ex vivo. Afin de s'assurer que ces CDs modifiées n'entraînent pas d'effet indésirable, une étude est également envisagée en testant des injections répétées des molécules non radioactives chez la souris.

Au total, 90 souris CD1 seront incluses dans ce protocole. Tout au long des protocoles in vivo, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme indispensables chez l'animal. Les animaux seront hébergés par groupe, avec enrichissement du milieu de vie. Un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé. Le protocole mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, stress ou souffrance en dehors du stress bref et modéré lié aux injections intra-péritonéales, réalisées selon les bonnes pratiques vétérinaires. Les éventuelles sessions d'imagerie seront réalisées sous anesthésie volatile (Isoflurane), supplémentée par un mélange Air - O₂. Les animaux seront placés sur un lit thermostaté le temps de l'imagerie et la fréquence respiratoire sera enregistrée en continu afin de contrôler le degré d'anesthésie et de l'ajuster si nécessaire (Small Animal Instrument, Inc).

2213- Les salmonelles sont fréquemment incriminées dans les toxi-infections alimentaires collectives dans les pays développés. C'est la seconde cause de zoonoses (maladies et infections qui se transmettent naturellement des animaux vertébrés à l'homme, et vice-versa) en Europe. Les animaux d'élevage, notamment les porcs, constituent des réservoirs de ces bactéries dont ils sont fréquemment porteurs sains. Le porc est considéré comme une source importante d'infection humaine à Salmonella. Dix à 20% des infections humaines à Salmonella dans l'Union Européenne aurait pour origine le porc. Salmonella ne provoque pas de maladie chez le porc, mais réduire la prévalence chez l'animal pourrait à terme permettre de mieux maîtriser le risque pour le consommateur. L'objectif de ce projet est d'acquérir des connaissances sur la colonisation des porcs par Salmonella et sur la persistance du portage après mono ou multi-infections. Un total de 28 animaux sera utilisé pour cette expérimentation. Trois fréquences d'inoculation seront réalisées afin d'évaluer si la colonisation diffère selon que l'animal est une fois ou plusieurs fois en contact avec la bactérie. Les animaux seront suivis pendant 9 semaines après la première inoculation. Chaque semaine, des analyses individuelles des fèces seront réalisées (détection et dénombrement de Salmonella) ainsi que des analyses sérologiques. Ces analyses nous permettront de suivre la colonisation par Salmonella et la réponse immunitaire des porcs, et ainsi de faire des liens entre le portage bactérien et la réponse sérologique. Toutes les 3 ou 4 semaines, des porcs seront euthanasiés et autopsiés pour réaliser des analyses bactériologiques de détection et de dénombrement de Salmonella sur des prélèvements représentant plusieurs localisations du tractus digestif et sur les ganglions mésentériques. Les connaissances acquises dans le cadre de cet essai nous permettront de mieux comprendre la dynamique d'infection de cette bactérie. Ces données sont importantes pour pouvoir proposer des moyens de luttés en élevage et ainsi diminuer le risque d'infections aux salmonelles pour l'homme.

Pour cet essai, voici comment ont été pris en considération les 3R :

Remplacement : Le porc étant l'espèce réservoir de la bactérie à étudier, ce travail ne peut se faire sans expérimentation animale sur des porcs.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisé est réduit au maximum compte tenu des trois fréquences d'inoculation à tester tout en gardant une puissance suffisante pour l'exploitation statistique.

Raffinement : Les animaux disposent d'une alimentation à volonté, d'objet manipulable, sont élevés en groupe et sont exposés à des cycles lumineux de 7 h 30 à 17 h 30. Même si ils sont porteurs sains de la maladie, la mise en place d'un suivi clinique régulier nous permettra de rapidement mettre en évidence toute situation anormale.

2214- Dans le contexte économique actuel, la nécessité de développer des études expérimentales sur de plus petits animaux et en particulier la souris prend toute sa place. Ceci permet ainsi de limiter les coûts des nouveaux traitements testés. L'étude des pathologies cardiaques chez l'animal a longtemps reposé sur l'analyse des images de l'échographie. Ceci dit, de nouvelles techniques d'imagerie se développent rapidement et se profilent comme des outils de diagnostic majeurs. En particulier, le développement de la tomographie par émission de positons (TEP) a ouvert un nouveau champ de recherche. Il s'agit d'un examen d'imagerie non invasif qui permet une étude du fonctionnement cardiaque. Actuellement de nombreux traitements de la pathologie cardiaque ont pour cible le métabolisme glucidique du cœur. Or, pour étudier ce métabolisme la TEP au 18F-fluorodesoxyglucose (18F-FDG) est un examen de choix. En effet, en raison de sa similarité avec le sucre, le 18F-FDG est soumis aux mêmes mécanismes de régulation. Pour la grande majorité des pathologies, les TEP au 18F-FDG doivent être réalisés à jeun afin de mieux visualiser les lésions recherchées. Pour l'étude du cœur, la problématique est quasiment inverse. Il faut au contraire augmenter la fixation musculaire du 18F-FDG pour bien visualiser le muscle cardiaque. Pour cela plusieurs alternatives sont proposées : Absence de jeun : il a déjà été montré que l'absence de jeun chez la souris a un impact sur l'augmentation de la captation du 18F-FDG par le cœur. Action de l'insuline : chez la souris, il a déjà été montré qu'une injection sous cutanée d'une petite quantité d'insuline (2 UI), permet également d'accélérer la fixation de l'ensemble des muscles squelettique. Or ceux-ci représentent chez la souris une importante proportion de la masse corporelle. Action de l'acipimox : le muscle cardiaque utilise comme substrat principal énergétique (60-70 %), les Acides Gras Libres (AGL). L'acipimox est un médicament anti-AGL, utilisé couramment chez l'homme avant les examens de TEP cardiaque. Chez le rat, l'administration d'une dose d'environ 25mg/kg d'acipimox, permet de d'améliorer considérablement la qualité de l'imagerie cardiaque. L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'effet d'une préparation métabolique par administration d'acipimox et/ou d'insuline sur l'optimisation de la qualité de l'imagerie cardiaque chez la souris. [a] En se basant sur notre expérience en imagerie cardiaque, nous avons réalisé une pré-étude statistique pour calculer au plus juste le nombre d'animaux nécessaire.

Ainsi nous aurons besoin de 8 souris par groupe ce qui ramènera à un total de 48 à 64 souris réparties en 6 groupes: un groupe témoin sans préparation métabolique; 3 groupes de souris qui recevront respectivement 25, 50 et 100mg/Kg d'acipimox ; un groupe de souris qui recevra une injection de 2 UI d'insuline seul et/ou accompagnée d'une dose de 25mg/kg d'acipimox. Sur la base des résultats obtenus du dernier groupe, nous prendrons la décision de rajouter 1 ou 2 groupes de souris qui recevront respectivement 50 et 100 mg/kg en plus de l'insuline. Afin de valider notre TEP par une méthode de référence, le groupe de souris ayant permis d'obtenir la meilleure qualité d'image cardiaque aura également un examen échographique. De plus à la fin de cette étude, les animaux seront gardés en vie afin de réaliser des modèles de pathologies cardiaques pour tester certains de nos traitements en cours de développement (Réduction). [b] L'analyse objective des caractéristiques métaboliques du 18F-FDG au niveau du cœur ne peut être réalisée que sur un modèle animal permettant par la suite d'analyser le mécanisme physiologique global (Remplacement). Les animaux seront observés tout le long de l'étude, toute observation d'un signe de douleur intense et/ou détresse (animal recroquevillé à l'écart des autres, changement dans la posture, réticence à se déplacer, refus de se faire manipuler, grattage, morsure, léthargie, couinements, absence de toilettage,...); d'un refus de s'alimenter et /ou une perte de poids de 10 à 15% sur 3 jours, fera l'objet d'une mise à mort en accord avec notre structure de bien-être (Raffinement).

2215- La cécité ou la très grande malvoyance peut résulter de différentes pathologies rétiniennes comme les dystrophies rétiniennes héréditaires (DRH) caractérisées par la perte des photorécepteurs. Une des approches thérapeutiques envisagées pour traiter les DRH est la thérapie génique spécifique, c'est à dire le remplacement du gène défectueux par un gène sain. De nombreux travaux chez des gros modèles animaux de DRH ont démontré l'efficacité de la thérapie génique spécifique, et conduit au développement d'essais cliniques aux résultats encourageants. Cependant, bien qu'efficace, la thérapie génique spécifique n'est pas toujours applicable, en particulier quand la dégénérescence est trop avancée ou quand le gène muté n'est pas connu. Pour pouvoir traiter tous les cas de DRH, quelle que soit leur origine génétique et leur stade de progression, un nouvel axe de thérapie génique est envisagé : le transfert d'optogènes. Cette stratégie consiste à réactiver la rétine devenue aveugle par l'expression de protéines photosensibles dans les cellules résiduelles de la rétine. A ce jour, aucune approche optogénétique n'a été testée chez l'un de ces modèles gros animaux de DRH. Notre objectif est d'évaluer l'efficacité du transfert de 3 optogènes chez 2 modèles canins de DRH qui miment les grandes formes de DRH rencontrées chez l'homme. La rétine est une structure complexe composée de multiples couches de neurones et de cellules nourricières. Il n'est pas possible de reconstituer cet organe complexe in vitro. L'utilisation de modèles animaux atteints de DRH est donc la seule alternative pour étudier les effets du transfert de gènes dans la rétine. Nous souhaitons développer chez le chien une approche couramment utilisée chez l'homme permettant d'enregistrer les signaux électriques reçus au niveau du cortex visuel : La technique du potentiel évoqué visuel (PEV). Cette partie de l'étude sera réalisée en deux étapes : la mise au point de la technique du potentiel évoqué visuel chez le chien (n=2). Puis l'évaluation de l'efficacité du transfert d'optogène par PEV chez 2 modèles différents (n=8). C'est le minimum requis pour une interprétation fiable des résultats sachant qu'il existe une certaine variabilité individuelle après transfert de gènes dans la rétine. Tous les examens cliniques et les injections sont réalisés avec sédation et anesthésie appropriée en présence d'un vétérinaire anesthésiste. L'état général et l'alimentation des animaux (chiens et rats) sont surveillés quotidiennement par les animaliers et le vétérinaire référent du Centre de Boisbonne. Cette étude nous permettra de vérifier que cette approche peut être appliquée à plusieurs formes de dystrophies rétiniennes héréditaires liées à des mutations différentes et à progression variable. Nous pourrions ainsi déterminer quel est l'optogène au meilleur potentiel clinique pour un éventuel essai clinique de phase I-II chez des patients atteints de DRH à des stades très avancés.

2216- Les protéines constituent avec les glucides et les lipides l'un des 3 macronutriments apportés par l'alimentation et à partir desquels l'organisme tire son énergie. Cependant, les protéines ont aussi la caractéristique d'apporter les acides aminés, qui outre leur valeur énergétique, constituent les briques qui permettent la synthèse et le renouvellement des protéines corporelles ; protéines de structure, enzymes, protéines de transport etc. Dans ce contexte, certains acides aminés que l'organisme est incapable de synthétiser sont dits essentiels et doivent être apportés par l'alimentation. De ce fait, l'apport en protéine n'est pas contrôlé uniquement en fonction des besoins énergétiques, mais aussi du fait de la nécessité pour l'organisme d'obtenir les quantités nécessaires de ces acides aminés indispensables.

Dans le contexte général de développement de l'obésité dans nos sociétés, la compréhension de la régulation du poids et de la composition corporelle est essentielle. Il est maintenant bien établi que les régimes gras et/ou sucrés tendent à favoriser la prise de poids et de gras, notamment chez certains individus plus sensibles tandis que les régimes riches en protéines au contraire tendent à réduire l'adiposité en particulier par le biais d'une diminution de la prise alimentaire. Cependant, contrairement aux mécanismes induits par les glucides et les lipides qui sont maintenant assez précisément détaillés, on sait peu de choses sur les mécanismes par lesquels les acides aminés exercent un contrôle sur la prise alimentaire. On sait cependant, qu'une partie de leur action passe par un effet spécifique au niveau du foie. Le but de ce projet est de démontrer sur le plan fonctionnel, in vivo, l'importance effective de certaines voies de signalisation opérant à l'intérieur des cellules hépatiques, en étudiant les effets sur le comportement et la prise de poids induits par l'inactivation de ces voies métaboliques. L'objet de cette demande concerne les effets de l'inactivation de la voie dite GCN2, connue comme une des voies de signalisation importante dans les cellules hépatiques.

Le projet prévoit tout d'abord la génération du modèle de souris pour lesquelles le gène codant GCN2 est invalidé par « knock out » au niveau du foie (souris KO-GCN2 foie spécifique), modèle qui n'existe pas. L'isolement du modèle en question nécessitera l'utilisation de 52 animaux, il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaires afin d'avoir une forte probabilité

d'obtenir deux individus ayant le génotype recherché et qui se reproduiront ensemble pour donner naissance aux animaux expérimentaux.

La prise alimentaire et la prise de poids, ainsi que les niveaux de dépense énergétique en réponse à des régimes hypo-normaux- et hyper-protéiques de ces souris seront étudiés (48 souris – 3 régimes, 2 types de souris (témoins vs KO), 8 souris par groupe : nombre minimal de souris par groupe sachant que le modèle sera utilisé pour la première fois. Au total ce projet utilisera un maximum de 74 souris.

La nécessité de mesurer les conséquences sur la dépense énergétique et le comportement alimentaire empêche de remplacer l'expérimentation animale par des modèles cellulaires ou moléculaires. Les procédures expérimentales n'entraîneront a priori aucune douleur. Néanmoins, un suivi quotidien des animaux sera réalisé afin d'agir dès le moindre signe de souffrance. Les animaux vivront en cages individuelles, enrichies (nid et tunnel), pour le suivi de leur consommation. Pour l'évaluation de leur composition corporelle, ils devront rester immobiles et seront donc légèrement anesthésiés.

Cette étude permettra de définir le rôle de la voie de signalisation GCN2 comme potentiel levier d'action contre la prise de poids en vue d'établir des stratégies contre le surpoids et l'obésité, bénéfiques justifiant le recours au modèle animal.

2217- L'utilisation de sang et/ou de sécrétions corporelles est routinière dans les laboratoires développeurs de vaccins d'utilisation vétérinaire et/ou de techniques de diagnostic de maladies animales. Ces produits organiques constituent des réactifs nécessaires pour l'évaluation de l'efficacité de vaccins, le développement de tests de diagnostic de maladies et l'établissement et/ou maintien de nouvelles lignées animales modèles pour les maladies animales étudiées. Dans ce cadre, ce projet vise à réaliser des prélèvements sanguins utilisés de façon routinière dans un laboratoire de recherche et diagnostic de maladies animales.

Les espèces animales choisies pour ce projet sont les espèces cibles ou les modèles animaux des maladies étudiées. Le nombre d'animaux utilisés sera adapté à l'activité (projets, nombre de personnels) et à la capacité d'hébergement de l'établissement utilisateur. C'est pourquoi, un maximum de 22 ovins, 22 caprins, 15 porcins, 15 volailles et 4 bovins sera utilisé pour les prélèvements de routine pendant la durée de ce projet (5 ans).

Le volume et fréquence des prélèvements sanguins seront le plus petit possible et dans les limites recommandées pour chaque espèce. Toutes les procédures seront adaptées à l'espèce animale choisie et réalisées par du personnel expérimenté.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur hébergement. Par exemple, pour réduire le stress, les porcs auront accès à des jouets type bidon en plastique, etc... Les bovins ont une partie de leur enclos à l'extérieur et des brosses pour gratter le dos.

2218- L'utilisation de sang et/ou de sécrétions corporelles est routinière dans les laboratoires développeurs de vaccins d'utilisation vétérinaire et/ou de techniques de diagnostic de maladies animales. Ces produits organiques constituent des réactifs nécessaires pour l'évaluation de l'efficacité de vaccins, le développement de tests de diagnostic de maladies et l'établissement et/ou maintien de nouvelles lignées animales modèles pour les maladies animales étudiées. Dans ce cadre, ce projet vise à réaliser des prélèvements sanguins et des écouvillonnages tous types confondus utilisés de façon routinière dans un laboratoire de recherche et diagnostic de maladies animales.

Les espèces animales choisies pour ce projet sont les espèces cibles ou les modèles animaux des maladies étudiées. Le nombre d'animaux utilisés sera adapté à l'activité (projets, nombre de personnels) et à la capacité d'hébergement de l'établissement utilisateur. C'est pourquoi, un maximum de 500 souris, 35 rats et 14 lapins sera utilisé pour les prélèvements de routine pendant la durée de ce projet (5 ans).

Le volume et fréquence des prélèvements sanguins seront le plus petit possible et dans les limites recommandées pour chaque espèce. Toutes les procédures seront adaptées à l'espèce animale choisie et réalisées par du personnel expérimenté.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur hébergement. Par exemple, pour réduire le stress, les souris et les rats seront hébergés en groupe et leur milieu enrichi par l'ajout de tunnel et/ou carré de cellulose ; celui des lapins sera enrichi par des bûchettes de bois à ronger (par exemple briquettes de peuplier).

2219- 15 à 25% des patients diabétiques développent une ulcération du pied. Cette plaie peut être le lit d'une infection bactérienne, le plus souvent plurimicrobienne, pouvant entraîner jusqu'à l'amputation du membre infecté. *Staphylococcus aureus* est une des bactéries majoritairement impliquées dans les infections de ces plaies de patients atteints de diabète. Ce pathogène se caractérise par des capacités d'adaptation à l'environnement et d'acquisition de résistances aux antibiotiques qui font que les cliniciens se retrouvent régulièrement confrontés à des bactéries multirésistantes vis-à-vis de l'arsenal antibiotique disponible. Cet arsenal n'est d'ailleurs quasiment plus alimenté depuis plusieurs décennies par l'apport de nouveaux antibiotiques, ce qui peut conduire à des situations d'impasse thérapeutique.

Face à cette situation, l'exploration de nouvelles stratégies thérapeutiques est cruciale : optimisations des régimes thérapeutiques avec les antibiotiques disponibles, autres thérapeutiques qui pourraient agir en complément ou en remplacement des antibiotiques, et qui permettraient de limiter la pression de sélection exercée par ceux-ci sur les flores microbiennes des patients, et par conséquent l'apparition de souches résistantes.

Dans la perspective d'étudier différentes stratégies thérapeutiques, il est tout d'abord nécessaire de mettre au point un modèle stable et reproductible de plaie diabétique infectée à *S. aureus*.

Objectifs principaux de l'étude :

Nous allons procéder en plusieurs étapes :

1- Déterminer un mode opératoire d'induction de diabète artificiel sur modèle murin. Nous avons choisi de travailler avec la streptozotocine (STZ), molécule pancréatotoxique diabéto-gène. L'objectif sera de déterminer quelle est la dose de STZ permettant d'induire ce diabète, tout en conservant une espérance de vie compatible avec la suite de l'étude.

2- Mettre au point un modèle de plaie proche des plaies du pied diabétique chez l'Homme, à l'aide de différentes techniques. Déterminer différentes tailles de plaies, ainsi que différentes méthodes permettant de maîtriser les temps de cicatrisation.

3- Infecter les plaies par des souches de *S. aureus* d'origines et de virulences différentes. Nous utiliserons des souches isolées de différents stades d'infection de pied diabétique chez l'Homme, ainsi que des souches de référence.

Le nombre de souris nécessaires à la réalisation de cette étude est de 256 souris Swiss.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Le nombre de souris par groupe a été réduit au minimum (n=8 par groupe) afin de garder une analyse statistique fiable et reproductible. Afin de limiter les sources d'angoisse ou de souffrance, la réalisation du modèle infectieux ainsi que l'euthanasie sont faites sous anesthésie générale. Les souris sont conservées dans des cages de taille suffisante dont la litière est changée une à deux fois par semaine et avec accès libre à l'eau et à la nourriture. Enfin le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude en évaluant l'état général des souris deux fois par jour avec analyse des signes généraux (poils hérissés, dos bossu, perte de poids, isolement) et des points limites seront mis en place. En cas d'éventuels signes de souffrance avec symptômes non réversibles, l'animal sera euthanasié après pré - anesthésie.

2220- Les cancers sont aujourd'hui la première cause de décès en France, et des modalités thérapeutiques innovantes doivent être proposées. Dans ce contexte, l'un des développements les plus intéressants dans le domaine des thérapies anticancéreuses est celui des anticorps monoclonaux dont l'efficacité clinique est maintenant prouvée depuis les années 80, conduisant à une large utilisation clinique de quelques anticorps. Compte tenu de la complexité des anticorps, il n'existe pas de méthodes substitutives à l'utilisation d'animaux permettant la production de novo d'anticorps dirigés contre un antigène précis. De plus, une attention particulière est apportée, au niveau du raffinement à travers les enrichissements apportés les hébergements fournis et les modalités d'administration et de prélèvement envisagées, de même qu'au niveau de la réduction du nombre d'animaux, un seul groupe n'étant utilisé par étude. Les anticorps monoclonaux ont de multiples applications en recherche et en diagnostic, clinique humaine et animale, exploitant la reconnaissance de protéines en biologie, ou encore peuvent être utilisés comme médicaments. Une étape d'immunisation chez l'animal est donc nécessaire. Le but de ce projet est donc de générer des anticorps monoclonaux chez la souris contre un antigène donné pour lequel il est impliqué dans un processus pathologique humain. Les anticorps générés chez l'animal seront ensuite testés dans des modèles *in vitro* pour valider la cible dans une approche d'immunothérapie.

750 souris seront utilisées pour la mise en œuvre de ce projet.

2221- La douleur est une sensation complexe qui implique de nombreux noyaux cérébraux appelés matrice de la douleur. Parmi ces structures, certains noyaux corticaux et sous-corticaux, qui participent activement à l'aspect émotionnel de la douleur, sont largement innervés par des projections axonales opyo-cinergiques (OT) originaires de l'hypothalamus. Ce projet, basé sur les nouvelles possibilités offertes par la manipulation des vecteurs viraux, consiste à identifier et caractériser les projections OT, vers les structures de la matrice de la douleur, qui sont recrutées lors d'un événement douloureux. Les résultats attendus permettront à la communauté scientifique de mieux comprendre la physiologie de la douleur et les mécanismes de mise en place des contrôles endogènes neuro-peptidergiques.

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. Le nombre d'animaux a été réduit au strict nécessaire pour permettre des analyses statistiques. Les animaux seront hébergés - sauf exception mentionnée - à 5 par cage avec eau et nourriture *ad libitum*. Les cages sont enrichies avec du matériel de nidation (frisures) et des bâtons à ronger. Les rats seront placés en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie contrôlée.

Nombre d'animaux total : 1056 sur 4 ans.

2222- En France, chaque année plus de 300 000 personnes déclarent un cancer. Parmi eux, le cancer du sein est la première cause de mortalité par cancer chez la femme et le cancer du poumon chez l'homme. Dans ce contexte, notre institut associé à 24 partenaires européens souhaite développer de nouveaux modèles pour ces 2 cancers. Les Modèles de souris transgéniques de cancer sont l'un des principaux outils utilisés dans l'étude du cancer, par les institutions académiques et l'industrie, à travers le monde. La contribution de ces modèles animaux pour la compréhension des processus biologiques fondamentaux, à la recherche sur le cancer et le développement de médicaments, a été énorme par le passé et reste actuellement indispensable, les techniques *in vitro* ne remplaçant pas encore les modèles vivants.

Ici, notre projet fera appel à de nouvelles méthodes de transgénèse plus rapides et plus sophistiquées qui permettront de développer des modèles encore plus proches de l'Homme.

Le projet se déroulera en 3 étapes :

-La création d'animaux génétiquement modifiés porteurs d'anomalies génétiques les prédisposant aux cancers étudiés.

-L'activation du développement de ces cancers

-L'étude et le suivi de ces cancers.

L'effectif d'animaux sera réduit au minimum indispensable en utilisant 10 animaux par groupe expérimental. Sachant que le projet étudiera 25 lignées cancéreuses à différents âges, il faudra un maximum de 16 850 souris sur toute la durée du projet.

De plus, afin de réduire tout stress ou souffrance, toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale et le développement des cancers fera l'objet d'un suivi très proche. Ainsi, des points limites éthiques seront établis afin d'arrêter les procédures en cas de douleur difficile à traiter à l'aide d'antidouleurs ou si le cancer devenait trop avancé.

A l'issue des études et grâce au partenariat européen ainsi constitué, les données obtenues seront traitées par plusieurs groupes, avec des expertises dans les technologies, y compris génétique de la souris, protéomique, génomique, transcriptomique, analyse bio-informatique, la biologie du cancer et la biologie des systèmes. Ces études à grande échelle permettront ainsi d'étudier de façon plus extensive le développement de ces cancers afin d'élaborer des outils permettant l'étude d'hypothèses thérapeutiques.

2223- Les maladies de Charcot-Marie-Tooth (CMT) sont des maladies génétiques héréditaires, neuromusculaires et évolutives. Elles atteignent les nerfs périphériques provoquant souvent une amyotrophie des mollets, des avant-bras et des mains. Il existe plusieurs formes de CMT qui se différencient par leur mode de transmission, leur localisation génétique et la partie du nerf affectée.

Dans ce projet nous nous intéressons au type dont la cause génétique est la duplication d'une partie du chromosome 17. Afin de modéliser cette pathologie chez l'animal, une souche de rat transgénique porteur de cette même anomalie du chromosome 17 a été développée (Phénotype n'engendrant pas de douleur). Comme l'Homme, ces rats présentent un dysfonctionnement de la transmission nerveuse, des troubles de la marche et de la force musculaire.

Cette souche de rat a été choisie afin de tester un nouveau traitement de la maladie. Les critères que nous utilisons dans ce projet pour évaluer les effets du traitement sont basés sur des mesures de conduction nerveuse et électromyographiques sur des animaux. Des échantillons post-mortem de nerf périphériques permettent d'apprécier les changements morphologiques des fibres nerveuses (histologie).

Dans le cadre du respect de la règle des 3R nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soins aux animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés (grâce notamment à un test statistique Anova). Dans le souci de réduire le nombre des animaux utilisés, il n'y aura pas production de cohort de rats spécifiquement pour ce projet. En effet des animaux impliqués dans le présent projet ont déjà été étudiés dans un cadre d'analyse comportementale mis en œuvre par un autre laboratoire de recherche. De plus, cette coordination entre les deux laboratoires permet de dégager de possibles corrélations entre les résultats comportementaux et les données neurophysiologiques et histologiques produites par notre équipe.

Notre plan d'étude compte 4 groupes d'animaux transgéniques comportant 20 animaux par groupe ainsi qu'un groupe de 15 animaux non-transgénique servant de référence. Ainsi dans ce projet nous utilisons 95 animaux.

2224- Une allergie alimentaire est une réaction exagérée du système immunitaire vis-à-vis d'un aliment, en principe sans danger pour l'homme. Dans la plupart des cas, l'allergie s'exprime dans les minutes qui suivent l'exposition. Elle se présente sous différentes formes : digestives, cutanées, respiratoires. Sa forme la plus grave appelée choc anaphylactique débute souvent par une sensation de malaise, avec démangeaisons et gêne respiratoire. Sans intervention médicale immédiate, peut survenir une perte de connaissance associée à une chute de tension pouvant aller jusqu'à l'arrêt cardiaque. Les aliments impliqués dépendent des habitudes de consommation et de l'âge des patients.

L'allergie à l'arachide est une pathologie qui touche près de 1% de la population, notamment les enfants. Il a été estimé que chaque année près de 150 décès sont causés par cette allergie. Il faut savoir que contrairement à l'allergie au lait, cette allergie perdure même à l'âge adulte pour 80% des personnes allergiques. Actuellement, le seul moyen d'éviter de provoquer une allergie chez un sujet allergique est une totale éviction d'arachide, de ce fait, la qualité de vie des personnes allergiques est altérée. Chez l'homme, le développement naturel de la maladie allergique se déroule en deux étapes : la sensibilisation, qui correspond à la fabrication d'anticorps de type IgE en réponse à l'exposition à un aliment allergisant, et la seconde étape est l'allergie proprement dite où la rencontre avec l'aliment allergisant provoque des symptômes cliniques plus ou moins sévères. Lors de nos précédentes études, nous avons pu optimiser la phase de sensibilisation, notre étude vise désormais à optimiser l'étape de la provocation allergique. Pour cela 4 quantités de protéines d'arachide seront administrées chez la souris Balbc afin de déterminer la quantité qui nous permet de discriminer les souris allergiques des souris non allergiques à l'arachide.

Dans de prochaines études, nous testerons différents protocoles de désensibilisation des souris à l'arachide. Les expériences mises en place viseront à apporter la preuve que la méthodologie choisie pourra être une piste de désensibilisation à explorer chez l'homme.

Pour cette étude 48 souris Balbc femelles âgées de 4 semaines seront utilisées et divisées en 8 groupes de 6 souris. Une surveillance quotidienne des souris sera effectuée y compris les weekend et jours fériés. Les souris seront hébergées par groupe de 6 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 exempte d'arachide et d'eau ad libitum.

Les souris subiront 7 procédures classées légères ou modérées. Après 7 jours de quarantaine, les souris seront identifiées grâce à l'implantation d'une bague à l'oreille. Elles seront sensibilisées à l'arachide par voie intragastrique une fois par semaine pendant 6 semaines. Deux prélèvements de sang seront effectués, cela nous permettra de récolter du sérum dans lequel nous pourrions doser et ainsi suivre l'évolution de la production d'anticorps dirigés contre l'arachide. A la fin de la phase de sensibilisation, l'équivalent d'un prick test sera réalisé à l'oreille afin de vérifier que la sensibilisation a été efficace.

Enfin, lors de l'étape de provocation à l'arachide par voie intrapéritonéale, les signes cliniques (grattements, piloérection, prostration...), la fréquence respiratoire et la température seront suivis.

Les animaux ne présenteront aucun signe de souffrance, mais dans le cas où l'un des points limites que nous avons défini serait atteint, la souris serait mise à mort selon une méthode réglementaire. De précédentes expériences nous ont permis d'optimiser notre protocole de sensibilisation (dose, voie d'administration, durée) (Raffinement). Notre étude statistique nous indique qu'utiliser 48 souris est nécessaire et suffisant (Réduction). Le dosage d'anticorps est possible in vitro, mais il ne renseigne que sur la quantité et non sur la fonctionnalité de ces anticorps face à un allergène défini (Remplacement). A la fin de l'étude, toutes les souris seront mises à mort suivant une méthode réglementaire.

2225- Avec plus de 220 millions de malades dans le monde à l'heure actuelle, et plus de 360 millions d'ici 2030, le diabète est un réel problème de santé publique. La diminution de la masse fonctionnelle des cellules bêta pancréatiques (MCB) qui produisent l'insuline est une caractéristique commune aux diabètes de type 1 et de type 2. Pouvoir estimer cette MCB in vivo, de manière non invasive, permettrait aux cliniciens d'évaluer l'état anatomique et fonctionnel du pancréas du patient et ainsi d'orienter son traitement. De plus, un tel outil pourrait permettre le suivi d'une greffe d'îlots, traitement de plus en plus envisagé dans les cas de diabète de type 1.

Des tests métaboliques ont été développés pour tenter d'évaluer la fonctionnalité des cellules bêta pancréatiques. Le clamp hyperglycémique, qui consiste à perfuser du glucose en continu à un individu afin de maintenir une hyperglycémie et à mesurer parallèlement son insulïnémie à intervalles réguliers, demeure la technique de référence pour mesurer la fonctionnalité de la MCB, bien que longue et fastidieuse à mettre en œuvre et par conséquent inapplicable en routine clinique. De nombreux tests métaboliques plus simples permettant d'évaluer cette fonctionnalité ont donc été proposés. Ils reposent sur des mesures de glycémie et d'insulïnémie en conditions basales et/ou en conditions stimulées, mais ces tests restent peu sensibles. Il est par conséquent important de développer une nouvelle méthode permettant une mesure non invasive et fiable de la MCB.

L'imagerie est a priori le meilleur moyen de mesurer la MCB in vivo ; cependant, elle est relativement compliquée compte tenu du fait que les cellules bêta représentent seulement 1 à 2% de la masse totale du pancréas. De nombreux outils sont en cours de développement pour l'IRM, l'imagerie optique et l'imagerie nucléaire, mais aucun à ce jour ne s'est révélé concluant.

Le transporteur du zinc ZnT8 exprimé spécifiquement par les cellules β pancréatiques au niveau de la membrane des vésicules contenant l'insuline, est une cible potentiellement intéressante pour l'imagerie fonctionnelle de la MCB. Le transporteur ZnT8 permet un efflux de zinc du cytoplasme vers les vésicules contenant l'insuline, celui-ci étant en effet impliqué dans la synthèse, le stockage et la régulation de la sécrétion de l'insuline.

L'objectif majeur de ce projet est le développement d'un marqueur des cellules bêta pancréatiques ciblant ZnT8 pour l'imagerie nucléaire.

Une sélection in vitro de molécules ciblant ZnT8 sera effectuée dans un premier temps afin de ne conserver que les plus prometteuses. La biodistribution des traceurs retenus, leur passage à travers l'endothélium vasculaire et la reconnaissance spécifique des cellules bêta pancréatiques in vivo ne peuvent être évalués que par imagerie de l'organe dans un organisme vivant (qui devra être confirmé par les études de la biodistribution des molécules par prélèvement des organes après euthanasie des animaux) ainsi que par l'examen du pancréas (coupes de tissus).

Les molécules sélectionnées seront évaluées chez des souris saines et dans un modèle murin de diabète de type 1. Au total 196 souris seront utilisées pour cette étude. Ces animaux seront hébergés par groupe, en cages avec enrichissement du milieu de vie.

Le protocole d'imagerie qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse en dehors d'un stress bref et modéré lié aux injections selon les bonnes pratiques vétérinaires.

2226- Apprentissage des gestes et techniques de chirurgie mini-invasive laparoscopiques, chirurgie par un trocart unique, chirurgie par les orifices naturels, chirurgie par endoscopie flexible, chirurgie assistée par le télémanipulateur robotique, interventions endovasculaires et percutanées sous guidage de l'imagerie (fluoroscopie, résonance magnétique, scanner, ultrasons, fluorescence).

Utilité et nécessité des expériences sur l'animal :

L'apprentissage des gestes de base pour effectuer des procédures interventionnelles s'effectue aujourd'hui sur mannequin, simulateur et compagnonnage. Toutefois, dès qu'il est nécessaire d'acquérir une pratique avancée et spécialisée, on se heurte à l'absence de simulateur permettant de reproduire des situations cliniques complexes de façon réaliste.

Il n'existe aujourd'hui, aucun moyen autre que l'expérimentation sur le vivant, pour l'apprentissage des gestes chirurgicaux avancés utilisant les nouvelles techniques et approches chirurgicales.

La formation se fait habituellement par compagnonnage, pas toujours accessible et en tous cas insuffisant pour l'apprentissage de gestuelle et techniques nouvelles et complexes, l'apprentissage sur l'homme n'étant plus acceptable ni accepté.

Les simulateurs, actuellement en développement, ne permettent pas une éducation satisfaisante.

Justification du choix de l'espèce, et du modèle :

Le porc fermier est l'animal de référence pour différentes raisons : son anatomie présente tous les éléments nécessaires à la reproduction des procédures humaines ; l'approche chirurgicale est très réaliste par rapport aux conditions de la chirurgie humaine, son coût est raisonnable par rapport aux bénéfices escomptés.

Dans certaines situations, comme la microchirurgie, le rat et parfois la souris offre des solutions anatomiques réalistes.

Le lapin peut être utilisé comme modèle d'intubation normale et sélective en reproduisant le idéalement le modèle de la chirurgie pédiatrique du petit enfant et permet d'entraîner les anesthésistes à des intubations difficiles.

Au total, plus de 70 cours sont organisés par an et utilisent 2.000 porcs, 30 rats, 20 souris et 5 lapins, soit 2.055 animaux.

Ce projet remplit les conditions des 3R :

- Remplacement : les simulateurs et les pièces anatomiques sont utilisés pour les apprentissages élémentaires. L'animal permet seul de contrôler la vitalité et l'efficacité chirurgicale d'une procédure évoluée. Il s'y sera substitué chaque fois qu'un simulateur permettra de valider un apprentissage.

- Réduction : Un animal est utilisé de façon prolongée par deux chirurgiens, pour optimiser le nombre de procédures effectuées au cours de chaque séance. Si une même procédure peut-être répétée chez le même animal au cours de la même séance, le nombre d'intervenants sera augmenté pour limiter le nombre d'animaux utilisés.

- Raffinement : Cette étude prévoit des procédures mini-invasives effectuées exclusivement sous anesthésie. Le sacrifice après apprentissage est effectué sans réveil pour ne pas engendrer de souffrances animales

2227- L'insulinorésistance (IR) se définit comme une diminution de la réponse cellulaire et tissulaire à l'insuline, qui a pour conséquence une incapacité de l'insuline à réguler les métabolismes glucidique et lipidique. Les principales caractéristiques de l'IR sont des défauts d'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux et de la néoglucogenèse hépatique ainsi qu'un défaut de transport du glucose dans le cœur, les muscles squelettiques et le tissu adipeux. Les mécanismes à l'origine de l'IR sont mal connus, mais l'hypothèse principale implique un phénomène de lipotoxicité induit par des accumulations ectopiques de lipides. Ces désordres métaboliques sont associés à une réponse inflammatoire chronique dans les tissus adipeux caractérisée par une production anormale d'adipokines et de l'activation de divers processus pro-inflammatoires. De la même façon la présence d'une IR hépatique, associée à un processus inflammatoire, conduit au développement de NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Diseases, maladies hépatiques non alcooliques). Ainsi processus inflammatoires, l'IR, obésité, diabète de type 2, NAFLD sont intimement liés.

La forte prévalence des NAFLD n'a fait qu'accentuer l'intérêt porté à cette pathologie ces dernières années. Ainsi différentes méthodes d'imagerie de la pathologie se sont développées afin notamment d'identifier son stade de développement. Toutefois si le diagnostic de la fibrose ou de la stéatose est aujourd'hui réalisable grâce à différentes modalités, le suivi de l'inflammation hépatique de manière non invasive est aujourd'hui impossible. L'inflammation étant au cœur des mécanismes de développement des NAFLD, et ce dès ses stades les plus précoces, il semble pourtant primordial d'être capable de l'évaluer.

2228- Cette étude a pour objectif de mettre au point une méthode de suivi des maladies hépatiques par le biais de l'évaluation de l'inflammation grâce à un radiotracer en imagerie TEMP (Tomographie par Emission MonoPhotonique ou SPECT en anglais). Un marqueur spécifique de VCAM1, marqueur de l'inflammation, proposé comme traceur de la plaque d'athérome vulnérable a été développé. Il s'agit d'un nanobody anti-VCAM1 marqué au technétium 99m. Par un protocole d'imagerie simple, non invasive, il s'est déjà montré très efficace dans la détection des plaques d'athérome vulnérables chez la souris.

Nous proposons ici d'évaluer l'efficacité de ce même traceur pour le suivi de l'évolution de l'inflammation hépatique dans un modèle murin de NAFLD. Une telle méthodologie pourrait alors permettre d'améliorer la compréhension de cette pathologie mais aussi de participer à la mise au point et à l'évaluation de l'efficacité des traitements dans ce domaine.

Au total 72 souris seront utilisées.

Tout au long des études in vivo, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal. Ces animaux seront hébergés par groupe, en cages avec enrichissement du milieu de vie. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de contrôler leur bien-être. Le régime particulier mis en œuvre dans cette étude entraînera une perte de poids des animaux, toutefois, la mise en place de points limites adaptés permettra de limiter la souffrance de ces animaux. Le protocole d'imagerie qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse en dehors d'un stress bref et modéré lié aux injections du radiotracer selon les bonnes pratiques vétérinaires.

2229- Les angiomes caverneux ou CCM sont des malformations vasculaires localisées principalement dans le cerveau des patients mais aussi dans la rétine. Cette pathologie touche de 0.1 à 0.5% de la population. Dans 20% des cas, la maladie est héréditaire, causée par la mutation d'un des 3 gènes identifiés, « CCM1/2/3 ». Les lésions CCM sont semblables quelque soit le gène CCM affecté mais une plus forte sévérité a été observée chez les patients CCM3 avec un nombre plus important d'enfants atteints. La maladie est évolutive, puisque le nombre et la taille des lésions augmentent au cours de la vie. Les angiomes caverneux peuvent entraîner des crises d'épilepsie et/ou des déficits neurologiques dus à des hémorragies cérébrales répétées. L'unique traitement possible est l'ablation de l'angiome (neurochirurgie), qui se révèle impossible si la malformation est trop profonde (risque vital). L'absence de traitement est donc un problème majeur pour les enfants porteurs d'une mutation CCM3 et pour les patients non opérables. Il est urgent de réussir à définir des approches thérapeutiques visant à la fois à prévenir le développement de nouvelles lésions (traitement préventif) mais aussi à empêcher le grossissement des lésions existantes voire à entraîner leur régression et diminuer le risque hémorragique (traitement curatif).

La souris est un modèle animal qui possède toute la complexité du réseau vasculaire cérébral trouvé chez l'homme. Les outils nécessaires pour induire une mutation dans l'un des gènes CCM chez la souris sont disponibles. Nous avons développé plusieurs modèles CCM chez la souris, qui reproduisent fidèlement les malformations CCM du cerveau et de la rétine des patients. Il n'existe pas d'équivalent aujourd'hui en dehors de ces modèles CCM chez la souris pour pouvoir réaliser des tests

précliniques. Nous avons caractérisé de façon précise un modèle dit « sévère », obtenu après invalidation d'un des gènes CCM au premier jour de vie chez le souriceau. Dans ce modèle, la maladie se développe très rapidement puisqu'une semaine après l'invalidation du gène la totalité des animaux montrent des lésions dans le cerveau et la rétine. Malheureusement, les animaux ont une espérance de vie estimée à 17 jours. Ce modèle sévère ne pourra donc être utilisé que pour développer des essais thérapeutiques préventifs rapides. Nous avons aussi démontré que retarder l'invalidation d'un des gènes CCM de quelques jours chez la souris (au 4ème ou 8ème jour de vie) a un effet majeur sur la sévérité et la vitesse de développement des malformations vasculaires, permettant d'obtenir des modèles plus modérés et de permettre une survie prolongée des animaux. Ces différents modèles, sévères et modérés sont donc complémentaires, afin d'évaluer efficacement des stratégies thérapeutiques préventives et curatives.

Notre objectif est d'évaluer l'effet d'agents pharmacologiques candidats au cours d'essais thérapeutiques dans les modèles de la maladie CCM chez la souris. Nos premiers essais seront réalisés dans le modèle sévère bien caractérisé, pour tester l'effet préventif de composés. En parallèle, nous caractériserons le développement des lésions dans les modèles modérés pour permettre leur utilisation ultérieure au cours d'essais curatifs.

Toutes les procédures expérimentales sont mises en œuvres par des personnes expérimentées. La procédure n°1 concernera la totalité des animaux du projet puisqu'elle permet d'invalider l'un des gènes CCM et de déclencher le développement de la maladie chez la souris (total de 232 à 296 souris). Notre projet s'inscrit dans le cadre d'un réseau européen collaboratif visant à définir des approches thérapeutiques pour la maladie CCM. Un nombre de composés thérapeutiques limité à 5 sera présélectionné pour être testé chez la souris. Un premier composé candidat prometteur a déjà été présélectionné et son efficacité sur la prévention du développement des lésions sera analysée dans notre modèle CCM sévère (12 lots d'animaux, 136 à 168 souris). Tous les animaux concernés par l'essai thérapeutique seront analysés à un stade où nous n'avons décelé aucun signe de souffrance lors de nos précédentes études (1 semaine après l'invalidation du gène). Ce stade est parfaitement caractérisé, ce qui nous permet de définir au plus juste le nombre d'animaux nécessaire à nos analyses, grâce à des calculs de puissance statistique.

Nous caractériserons les modèles modérés de la maladie (96-128 souris) sur des animaux âgés de 1, 2, 4 et 6 mois grâce (1) à l'analyse par imagerie microscopique des lésions CCM dans le cerveau et la rétine, (2) aux dosages de marqueurs dans le sérum (marqueurs d'inflammation, de coagulation) au cours du développement de la maladie.

Nos résultats seront interprétés grâce à une analyse statistique classique (tests anova).

Nous veillons au bien-être de nos souris par des gestes simples (isolement des mères gestantes, mise à disposition de mouchoir en papier pour la confection d'un nid, mise des gants dans la litière avant préhension des petits ...). Tous les animaux concernés par les procédures décrites seront surveillés cinq fois par semaine par une personne responsable du bien-être du projet.

Nous observerons l'aspect de l'animal (qualité du poil, absence de larmoiements des yeux) et son comportement (déplacement dans la cage, absence de prostration, de tremblements, d'agressivité). Un suivi du poids hebdomadaire sera notre principal critère pour détecter la souffrance. Dès 5% de perte de son poids, l'animal sera repesé 3 jours plus tard. En cas de nouvelle perte de poids (>10%) ou en cas d'association d'une perte de poids (5-10%) à d'autres signes de souffrance (prostration, tremblements...) nous procéderons à la mise à mort de l'animal et à son analyse.

2230- Le but de cette expérimentation est de mettre en évidence des différences individuelles dans les capacités à imiter chez des oiseaux. L'espèce cible est l'étourneau sansonnet. Vingt individus mâles seront utilisés dans cette étude. Le principe sera de conditionner les oiseaux à imiter des sons à l'aide de renforcements alimentaires très appétants. Chaque oiseau sera placé dans des cages grillagées et isolé le temps des tests (quelques minutes par jours). Le nombre d'oiseaux utilisé ici est le minimum nécessaire pour obtenir des résultats significatifs (réduction). Il n'est pas possible de remplacer les oiseaux par des modèles alternatifs car notre but est précisément l'étude des capacités cognitives chez les oiseaux (Remplacement). Nous veillons cependant à raffiner les méthodes de façon limiter toute souffrance pour les animaux. Hors des périodes de tests les oiseaux sont maintenus en cage mais les cages sont placées les unes à côté des autres et les oiseaux peuvent donc se voir et communiquer. Il n'y a donc pas d'isolement social (Raffinement). De plus aucune méthode invasive n'est ici employée.

2231- Une allergie alimentaire est une réaction exagérée du système immunitaire vis-à-vis d'un aliment, en principe sans danger pour l'homme. Dans la plupart des cas, l'allergie s'exprime dans les minutes qui suivent l'exposition. Elle se présente sous différentes formes : digestives, cutanées, respiratoires. Sa forme la plus grave appelée choc anaphylactique débute souvent par une sensation de malaise, avec démangeaisons et gêne respiratoire. Sans intervention médicale immédiate, peut survenir une perte de connaissance associée à une chute de tension pouvant aller jusqu'à l'arrêt cardiaque. Les aliments impliqués dépendent des habitudes de consommation et de l'âge des patients.

L'allergie à l'arachide est une pathologie qui touche près de 1% de la population, notamment les enfants. Il a été estimé que chaque année près de 150 décès sont causés par cette allergie. Il faut savoir que contrairement à l'allergie au lait, cette allergie perdure même à l'âge adulte pour 80% des personnes allergiques. Actuellement, le seul moyen d'éviter de provoquer une allergie chez un sujet allergique est une totale éviction d'arachide, de ce fait, la qualité de vie des personnes allergiques est altérée.

Lors de nos précédentes études nous avons pu déterminer la souche la plus adaptée à ce type de protocole ainsi que la voie et la solution d'arachide à utiliser. C'est dans ce cadre que nous souhaitons, dans un premier temps, optimiser ce protocole de sensibilisation à l'arachide chez la souris. Précédemment, nous avons pu remarquer que dès la 3ème semaine de sensibilisation, les souris montraient un caractère allergique à l'arachide. Nous souhaitons donc vérifier par ce protocole si

une sensibilisation à l'arachide de 3 semaines est aussi efficace qu'une sensibilisation de 6 semaines. Dans un second temps, nous testerons différents protocoles de désensibilisation des souris à l'arachide. Les expériences mises en place viseront à apporter la preuve que la méthodologie choisie pourra être une piste de désensibilisation à explorer chez l'homme.

Pour cette étude 48 souris femelles Balbc âgées de 4 semaines seront utilisées et divisées en 8 groupes de 6 souris. Une surveillance quotidienne des souris sera effectuée. Les souris seront hébergées par groupe de 6 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 exempte d'arachide et d'eau ad libitum.

Aucune des procédures n'entraînera de douleur pour les souris, mais dans le cas où l'un des points limites que nous avons défini serait atteint, la souris serait mise à mort selon une méthode réglementaire. De précédentes expériences nous ont permis de sélectionner cette souche de souris comme étant la mieux adaptée à notre protocole (Raffinement). Notre étude statistique nous indique qu'utiliser 48 souris est nécessaire et suffisant (Réduction). Le dosage d'anticorps est possible in vitro, mais il ne renseigne que sur la quantité et non sur la fonctionnalité de ces anticorps face à un allergène défini (Remplacement). Les souris seront mises à mort à la fin de ce protocole selon une méthode réglementaire.

2232- Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un suivi à long terme d'une population de marmottes alpines sauvages. Les données collectées sont indispensables pour décrypter les réponses des organismes vivants aux contraintes de leur environnement et permettent : (1) de comprendre les conséquences potentiellement désastreuses des activités humaines, comme le changement climatique, (2) de lutter contre ces conséquences, (3) de proposer des solutions pratiques à des problèmes de société (protection et/ou restauration des espèces et des milieux,...).

La marmotte alpine est un modèle idéal car vivant dans un environnement extrême et y présentant des stratégies évolutives originales. Son étude est relativement aisée car il s'agit d'une espèce diurne, territoriale, sédentaire et de taille moyenne. Elle constitue le modèle vertébré « sauvage » le plus répandu en milieu alpin et ne représente pas une espèce menacée d'extinction (statut IUCN : préoccupation mineure, LC).

La population étudiée se compose d'environ 300 marmottes, mâles et femelles, du stade « jeune sevré » à « adulte ». Le nombre d'individus suivis dans le cadre de notre étude est déterminé afin d'optimiser la puissance statistique tout en minimisant l'effectif impliqué. Néanmoins, le but de notre étude étant d'étudier la variabilité individuelle et de réaliser un suivi démographique, le nombre d'animaux impliqués est plus important que dans des études « en conditions contrôlées ».

Grâce à un protocole de capture-marquage-recapture, les individus sont capturés annuellement, manipulés, puis relâchés sur leur lieu de capture. Ils sont identifiés à l'aide d'un transpondeur et de marques auriculaires de manière à pouvoir les reconnaître durant toute leur vie. Les individus sont par la suite recapturés annuellement. Les paramètres physiologiques, morphologiques, comportementaux et démographiques (survie et reproduction) de chaque individu sont alors suivis de leur naissance à leur mort. Notre objectif principal étant d'étudier des processus naturels, tout est mis en œuvre pour perturber le moins possible et réduire au maximum l'impact sur les individus que pourrait avoir notre étude. Le temps de manipulation est réduit au strict minimum et les individus sont relâchés le plus rapidement possible dans le terrier le plus proche de l'endroit exact de leur capture (moins de 30 minutes entre la capture et le relâché).

2233- Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est une maladie infectieuse d'origine virale se traduisant par un déficit profond de l'immunité cellulaire. Deux types de virus ont été isolés des lymphocytes de patients atteints de SIDA ou de ses prodromes. Le premier nommé VIH1, le second nommé VIH2.

Le diagnostic de l'infection VIH est réalisé aujourd'hui à l'aide de tests sérologiques permettant le dépistage et la confirmation de l'infection basés sur le principe de l'ELISA (tests de screening ou tests rapides d'orientation diagnostique, TROD) ou de tests moléculaires. En France, suite au décret du 28 mai 2010 les tests de 4ème génération sont utilisés pour le sérodiagnostic. Ces tests permettent la détection simultanée de l'antigène P24 circulant et des anticorps anti HIV-1 et anti HIV-2. Bio-Rad propose depuis 2005 un test de détection simultanée Ag/Ac unitaire en microplaques, avec ses propres biologiques.

L'intérêt de la détection de l'antigène P24 réside dans le fait qu'il apparaît avant les anticorps et donc permet une réduction de la fenêtre sérologique. De ce fait le risque transfusionnel est largement diminué.

Bio-Rad travaille aujourd'hui sur la mise au point d'un nouveau test de dépistage simultané de l'antigène P24 VIH-1 et des anticorps anti-VIH1 et anti-VIH2. Le dépistage des antigènes VIH se fait à l'aide d'anticorps monoclonaux et/ou polyclonaux. L'utilisation d'anticorps polyclonaux présente l'avantage de couvrir tous les sites antigéniques présents sur l'antigène P24 alors qu'un anticorps monoclonal ne reconnaîtra qu'un seul site pouvant induire une erreur de diagnostic. C'est dans ce contexte que Bio-Rad soumet un protocole d'immunisation pour approbation. Ce protocole conduira à l'obtention d'un immusérum qui, une fois purifié, fournira les anticorps polyclonaux qui seront utilisés dans le test. Le choix des animaux (1 lot de 5 moutons) l'immunogène et le protocole ont été définis de manière à minimiser le nombre d'injections et à obtenir la meilleure réponse immunitaire possible. Les 5 animaux sélectionnés devraient permettre de constituer un stock d'anticorps suffisant pour couvrir de nombreuses années de production.

Les moutons, animaux grégaires, sont stabulés en petits groupes dans des conditions adaptées à l'espèce et conformes à la réglementation.

2234- Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux...) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès à de meilleurs soins.

Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation : des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit être efficace lors de son utilisation clinique.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (directive 2007/47/CE, 21CFR820...) de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulations d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Chaque animal bénéficie d'une attention et des soins de qualité en post-opératoire afin d'assurer un bien être optimal. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (analgésie).

Les animaux arrivent dans l'EU (Etablissement Utilisateur) après la période post-opératoire réalisé dans l'EU concepteur (conception des protocoles, interventions chirurgicales et suivi post-opératoire). Notre EU assure, sous la responsabilité de L'EU concepteur, l'hébergement et le suivi clinique des animaux, réceptionné en bon état clinique, sanitaire et comportemental.

Par ailleurs, les ruminants sont hébergés en groupes sociaux harmonieux dès que le protocole le permet et bénéficient d'un suivi quotidien par des animaliers qualifiés. La structure "Bien-être animal" et les vétérinaires des sites veillent à l'application du meilleur niveau de soins.

Il est prévu d'utiliser 750 ovins sur la période de 5 ans.

2235- Améliorer l'efficacité d'utilisation des ressources alimentaires est un pilier essentiel pour assurer la durabilité des systèmes d'élevage des animaux monogastriques. Dans ce cadre, réduire la teneur en phosphore dans l'aliment représente un enjeu majeur en assurant une réduction des coûts alimentaires et des rejets. Cet objectif ne doit pas venir s'opposer au maintien d'un bon niveau de minéralisation du squelette ainsi que d'une croissance optimale de l'animal. Il est important de trouver des stratégies nutritionnelles améliorant l'efficacité d'utilisation du phosphore. L'utilisation de phytase microbienne, largement répandue dans les pratiques actuelles, permet une épargne de phosphore minéral et une réduction significative des rejets de phosphore dans l'environnement. Toutefois, l'efficacité des phytases microbiennes peut être variable alors qu'il est essentiel de maintenir un bon niveau de minéralisation du squelette pour prévenir les troubles locomoteurs. Les objectifs du projet sont donc d'évaluer :

- l'effet d'une période d'adaptation de 5 jours, appliquée classiquement dans les protocoles d'évaluation des phytases microbiennes

- l'effet de la phytase microbienne sur les performances de croissance, de minéralisation osseuse et de digestibilité iléale (P et Ca)

- l'effet du régime sur la variabilité individuelle du critère de digestibilité Pour cela, 144 poulets mâles de souche Cobb500 seront suivis de manière individuelle, dès l'âge de un jour jusqu'à 19 jours. Deux périodes d'adaptation seront testées, 0j et 5 jours. Pour chaque période, 6 traitements alimentaires seront mis en place. Les aliments diffèrent par leur concentration en phosphore disponible, du moins concentrés au plus concentrés pour établir une droite de régression. La phytase microbienne sera ajoutée au régime le moins concentré en phosphore à deux niveaux différents. Ces 6 régimes seront distribués dès le démarrage ou après 5 jours d'adaptation avec un aliment démarrage standard. Tout au long de l'expérimentation, l'application de la règle des 3R sera considérée:

Remplacer : Ce type d'analyse nécessite l'utilisation d'animaux puisqu'à l'heure actuelle, aucun modèle de digestion in vitro n'est capable de représenter la complexité des mécanismes de digestion.

Réduire : Dans ces deux expérimentations, le nombre d'animaux a été réduit à son minimum mais reste suffisant pour mettre en évidence une différence notable sur le critère de digestibilité selon la littérature. Une puissance de 90% a été choisie de façon à faire ressortir une différence même minime mais qui reste pertinente en termes d'épargne de phosphate (ressource non-renouvelable) et de rejets dans l'environnement.

Raffiner : Les animaux seront placés en cage individuelle afin de pouvoir enregistrer leur consommation d'aliment. Il s'agit des cages contiguës et grillagées, avec un système d'abreuvement et d'alimentation adapté à l'espèce. Les animaux peuvent se voir. De plus, les cages seront enrichies en y plaçant un petit objet qui servira de jouet à picorer.

2236- Si les antibiotiques ont profondément transformé la médecine du 20^{ème} siècle, leur utilisation généralisée a conduit à l'apparition puis à la dissémination de bactéries résistantes. Dans le même temps, l'effort de recherche de nouveaux antibiotiques s'est effondré. Apparaissent ainsi aujourd'hui des bactéries résistantes à tous les antibiotiques disponibles. Les infections sont donc de plus en plus difficiles à contrôler, et les traitements standards de moins en moins efficaces. Dans ce contexte, la mise au point de nouveaux composés anti-infectieux est critique et encouragée par les organisations telles que l'OMS, et les Center for Disease Control and Prevention américain et européen.

Ce projet vise précisément à caractériser de nouveaux anti-infectieux ciblant les bactéries.

De tels composés sont préalablement conçus et caractérisés in vitro avec pour objectifs d'optimiser leur originalité, leur puissance, leur spectre d'action, et leur fenêtre de sécurité. Ces batteries de tests in vitro, utilisant des enzymes isolées, des bactéries et des cellules isolées permettent de ne retenir que les composés suffisamment puissants et les moins toxiques. Ces

données ne suffisent malheureusement pas pour envisager une administration chez l'homme : leur efficacité et leur toxicité éventuelle sont la résultante des interactions complexes dans un organisme vivant, entre autres, entre le médicament, la bactérie, le système immunitaire de l'hôte, son système de métabolisation et d'élimination. Cet ensemble complexe d'interactions doit être analysé chez l'animal avant une éventuelle administration chez l'homme.

La pharmacologie in vivo dans le domaine des antibiotiques a exploré de nombreux modèles animaux, permettant de modéliser différents types d'infections locales ou généralisées, et causées par différents types de bactéries. Il apparaît que la souris est un animal permettant de modéliser la plupart des infections et permet de générer des données d'efficacité très prédictives de celles qu'un antibiotique aura chez l'homme. L'avantage majeur de cet animal est sa petite taille qui permet, au stade recherche, de travailler avec des quantités de candidat médicament faibles, comme c'est souvent le cas. Dans certains cas, le rat peut être préféré, sa plus grande taille autorisant des analyses plus fines.

Afin d'évaluer l'effet thérapeutique de ces molécules, nous avons besoin de modèles d'infection chez le rongeur couvrant différentes voies d'infection (bactéries dépendantes), et différentes voies de traitement (composés dépendantes). Nous étudierons donc la toxicité et l'efficacité de nouveaux composés chez la souris et le rat adultes élevés en captivité et issus de deux fournisseurs agréés. Sur les 5 ans du projet, nous prévoyons d'utiliser au maximum 38 500 animaux à raison de 90% de souris et 10% de rat. La tolérance des rongeurs aux composés sera évaluée dans un premier temps sur un nombre minimal d'animaux (1000 sur 5 ans, 250 produits testés). A ce stade, les composés toxiques sont éliminés. L'efficacité des composés bien tolérés peut alors être évaluée dans des modèles d'infection dont l'objectif est de mesurer leur efficacité à réduire voire stopper la progression et les effets délétères de l'infection bactérienne. Afin de permettre une analyse statistique fiable, 5 à 15 animaux par groupe sont alors requis en fonction de la bactérie, de son mode d'infection, du type d'effet attendu. Nous prévoyons un maximum de 150 tests annuels, utilisant chacun au maximum 50 animaux par test.

Une analyse de puissance précise est difficile dans la mesure où nous travaillons dans un domaine exploratoire. Cet effectif est donc basé sur notre expérience en matière de recherche de composés anti-infectieux, la littérature dans ce domaine, et l'analyse statistique. Le nombre d'animaux par groupe et par procédure est réduit au minimum afin de pouvoir mesurer une différence entre les groupes avec une significativité $p < 0.05$. Le nombre total d'animaux utilisés doit permettre de caractériser sur les 5 années de la durée du projet les candidats antibactériens issus de notre recherche, et de sélectionner les meilleurs pour les faire progresser vers les phases cliniques.

Dans les trois procédures décrites dans notre projet nous ne pouvons pas utiliser de molécules anti-inflammatoires ou analgésiques car cela nuirait à l'analyse de l'efficacité de nos composés. Néanmoins, une grille d'observation des signes cliniques et l'arbre décisionnel correspondant est mis en place afin de limiter la douleur, d'optimiser le bien-être animal et de pratiquer au plus tôt un sacrifice éthique. A la fin de chaque procédure, les animaux ne seront pas réutilisés et seront euthanasiés selon les méthodes autorisées dans l'annexe IV de l'arrêté relatif à l'agrément des établissements du 1er février 2013.

2237- Si les antibiotiques ont profondément transformé la médecine du 20^{ème} siècle, leur utilisation généralisée a conduit à l'apparition puis à la dissémination de bactéries résistantes. Dans le même temps, l'effort de recherche de nouveaux antibiotiques s'est effondré. Apparaissent ainsi aujourd'hui des bactéries résistantes à tous les antibiotiques disponibles. Les infections sont donc de plus en plus difficiles à contrôler, et les traitements standards de moins en moins efficaces. Dans ce contexte, la mise au point de nouveaux composés anti-infectieux est critique et encouragée par les organisations telles que l'OMS, et les Center for Disease Control and Prevention américain et européen. De tels composés sont préalablement conçus et caractérisés in vitro afin de ne retenir que les composés suffisamment puissants et les moins toxiques. Mais ces données ne suffisent malheureusement pas pour prédire l'efficacité de ces composés chez l'homme.

Ce projet vise plus particulièrement à déterminer les paramètres pharmacocinétiques de ces nouveaux composés anti-infectieux chez l'animal, donc n'ayant pas déjà fait l'objet de telles études auparavant.

La pharmacocinétique (PK) c'est l'étude du devenir d'une substance active contenue dans un médicament dans l'organisme après son ingestion ou son administration. Ainsi, la détermination des paramètres pharmacocinétiques d'un médicament apporte les informations qui permettent de choisir les voies d'administration et d'adapter les posologies pour son utilisation future. L'étude de ces paramètres chez l'animal est très importante et ne peut pas être réalisée in vitro faute de modèle suffisamment complet pour prendre en compte les nombreux paramètres qui entrent en jeu dans l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination d'un composé chez un animal ou un homme.

Les études d'efficacité des antibiotiques étant réalisées principalement chez le rongeur (souris, rat ou hamster) nous avons besoin de modèles qui nous permettent de relier le devenir d'un composé anti-infectieux dans un organisme à son activité observée in vivo (pharmacodynamie).

Pour cela, nous étudierons donc la pharmacocinétique de nouveaux composés chez la souris, le rat ou encore le hamster adultes élevés en captivité et issus de deux fournisseurs agréés. Sur les 5 ans, nous prévoyons d'utiliser au maximum 5 350 animaux à raison de 80% de souris, 13% de rats et 7% de hamsters. Les paramètres pharmacocinétiques pourront être évalués dans trois cas distincts 1) un suivi des concentrations sanguines d'un composé sur 24 heures après administration, 2) un suivi des concentrations sanguines ainsi que dans les organes d'un composé sur 24 heures après administration, 3) un suivi des concentrations sanguines sur plusieurs jours dans le cas d'une administration répétée ou par perfusion continue. Afin de permettre une analyse fiable des données, 9 à 40 animaux seront utilisés suivant les cas et les paramètres analysés. Cet effectif est basé sur notre expérience en matière de recherche sur les composés anti-infectieux, la littérature dans ce domaine, et l'analyse statistique. Le nombre d'animaux par groupe est réduit au minimum et prend en compte la variabilité entre les animaux que l'on observe dans l'analyse des données pharmacocinétiques. Le nombre total d'animaux utilisés doit permettre

de caractériser sur les 5 années de la durée du projet les candidats antibactériens issus de notre recherche, et de sélectionner les meilleurs pour les faire progresser vers les phases cliniques.

Les animaux sont hébergés en fonction de leurs besoins en milieu enrichi et une grille d'observation des signes cliniques et l'arbre décisionnel correspondant sont mis en place afin de limiter la douleur, d'optimiser le bien-être animal. A la fin de chaque procédure, les animaux ne seront pas réutilisés et seront euthanasiés selon les méthodes autorisées dans l'annexe IV de l'arrêté relatif à l'agrément des établissements du 1er février 2013.

2238- La tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie médicale non invasive qui repose sur l'utilisation de molécules radioactives (radiotraceurs) et qui contribue au diagnostic et/ou au suivi de nombreuses maladies cardio-vasculaires, cancéreuses, neurologiques, etc...

Les radiotraceurs sont obtenus suite à un assemblage moléculaire d'un marqueur radioactif (dans notre étude le Gallium-68) et d'une entité vectrice, spécifique d'un récepteur.

L'une des entités vectrices bien connue est le peptide RGD (Arg-Gly-Asp) qui cible spécifiquement l'intégrine $\alpha\beta3$. Cette intégrine $\alpha\beta3$, joue un rôle essentiel dans la prolifération des cellules cancéreuses et l'apparition des métastases. Elle est par conséquent une excellente cible pour l'imagerie des tumeurs. Le marquage du peptide RGD qui cible cette intégrine $\alpha\beta3$ par un marqueur radioactif permettrait d'améliorer nos connaissances et constituerait un outil essentiel dans l'amélioration de l'efficacité des thérapies contre le cancer.

Au vu de la littérature récente, il en ressort que le peptide RGD marqué au Gallium-68, nommé [68Ga]NODAGA-RGD, serait des plus prometteurs en imagerie. La préparation de ce radiotraceur a été validée.

Le but de cette étude in vivo sera de déterminer le potentiel et les modalités d'utilisation du [68Ga]NODAGA-RGD dans la détection et le suivi de tumeurs exprimant l'intégrine $\alpha\beta3$.

Dans ce contexte, l'étude préclinique sera réalisée sur des modèles animaux de rats et de souris immunodéficients (nude) porteurs de tumeurs humaines implantées sous la peau (24 souris) ou dans le cerveau (24 rats). Ces modèles très bien documentés dans la littérature scientifique, sont des modèles de référence en oncologie pour les études sur les nouvelles molécules comme le RGD.

Dans ce cas d'étude, le remplacement des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas possible puisque l'utilité même d'un radiotraceur est de permettre un suivi in vivo.

Le potentiel diagnostique du [68Ga]NODAGA-RGD sera évalué en comparaison par rapport à une molécule de référence qui est le 18F-FDG (sucre radioactif) sur les mêmes animaux en effectuant un double examen, ce qui permettra de diminuer de moitié le nombre d'animaux (Réduction). Les techniques d'imagerie non invasive que nous utiliserons permettent de réduire les souffrances de l'animal (Raffinement), et de pouvoir réaliser différents types d'examen.

De plus, il faudra confronter les images obtenues à des analyses histologiques : à des temps différents après injection du [68Ga]NODAGA-RGD (entre 2min et 120min), seront réalisés chez tous les animaux, des prélèvements sanguins (sous anesthésie gazeuse), et des prélèvements de tumeurs et d'organes (après mise à mort).

Pour cette étude, nous aurons besoin de 4 rats et 4 souris pour chaque temps de prélèvements, ce qui ramènera à un total de 24 rats et 24 souris.

Les points limites considérés seront la perte de poids (> 20% pendant 72h) , l'état général et le comportement modifié de l'animal. De plus, pour les souris, une taille de tumeur > 1200 mm³ ou pour le rat, un dysfonctionnement moteur mis en évidence par le test d'éviction d'obstacles conduiraient à la mise à mort des animaux.

2239- Au cours des quinze dernières années, l'identification de cellules souches au sein de tissus adultes et la démonstration de leur contribution à la régénération musculaire ont conduit à de nouvelles propositions thérapeutiques. Ainsi, la transplantation de populations progénitrices est aujourd'hui envisagée pour le traitement de maladies qu'elles soient d'origine génétique ou acquise pour lesquelles une atteinte de la fonction musculaire est avérée. C'est notamment le cas des dystrophies musculaires pour lesquelles nous avons présenté une preuve de concept avec une population de cellules souches résidentes du tissu musculaire (cellules MuStem) appliquée au modèle canin de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) dans un contexte de transplantation allogénique sous couverture immunosuppressive. Durant les deux dernières décennies, la prise en charge des maladies auto-immunes et des protocoles de transplantation d'organe comme de cellules a été hautement influencée par le développement de l'arsenal des molécules immunosuppressives. Si la cyclosporine (CsA) apparaît comme une des principales molécules immunosuppressives, son potentiel thérapeutique est limité par de nombreux effets indésirables parmi lesquels une toxicité à long-terme notamment musculaire avec une action délétère sur le potentiel régénératif. Ces limites empêchent son application clinique dans les thérapies au long cours. Avec des modalités distinctes, le Tacrolimus montre des résultats meilleurs en termes de taux de survie de précurseurs myogéniques dans les études précliniques et cliniques, suggérant un intérêt de son usage dans les protocoles de transplantation. Les immunosuppressions mises en place chez le petit animal ont été invariablement adaptées à partir de la médecine humaine et appliquées empiriquement sans démonstration préalable de leurs propriétés pharmacocinétiques. Chez le Chien, peu de données sont disponibles sur les protocoles d'immunosuppression mis en place lors des essais de thérapie cellulaire ou d'allogreffes rénales. L'objectif du présent projet est l'exploration de l'impact de molécules immunosuppressives sur le comportement des cellules MuStem, de sorte à définir un traitement immunosuppressif efficace dans le cadre d'une transplantation de cellules allogéniques sur un individu dystrophique. Les expérimentations développées auront pour finalité de dégager des notions sur la tolérance des traitements chez le Chien et de définir l'action de ces traitements sur les propriétés in vitro et in vivo des cellules MuStem candidates à la thérapie de la DMD. Ainsi, les résultats de ce programme auront un impact direct sur le champ

des connaissances autour de l'interaction des molécules immunosuppressives avec les cellules progénitrices ainsi que sur la présentation de données précliniques autour du potentiel thérapeutique de ces cellules dans un contexte de transplantation directement transposable pour la mise en place d'essai clinique. Les expérimentations seront réalisées chez le chien golden retriever sain et dystrophinopathe (GRMD). Pour mener à bien l'ensemble de ce programme, un besoin de 24 chiens (12 sains et 12 GRMD) est déterminé. Pour chaque expérimentation, nous mettrons en œuvre les procédures d'anesthésie pour toutes les manipulations qui le nécessitent et les règles d'élevage en accord avec la réglementation pour limiter la souffrance et le mal être des animaux.

2240- La datation des plaies cutanées, c'est-à-dire la détermination du délai écoulé entre la survenue d'une blessure et l'arrêt cardio-circulatoire, reste l'une des plus grandes difficultés en pathologie médico-légale.

L'analyse histologique classique est particulièrement mise en défaut lorsqu'aucune cellule inflammatoire n'est visible. Il n'est alors pas possible de préciser avec certitude s'il s'agit d'une lésion pré-mortem ou post-mortem, élément pouvant avoir une importance capitale dans l'enquête judiciaire. L'évaluation du temps de survie de la victime est également une question souvent posée par les magistrats. La présence d'une infiltration hémorragique oriente plutôt vers une blessure pré-mortem, cependant plusieurs études ont décrit qu'une extravasation sanguine pouvait survenir après la mort. De multiples études ont été consacrées à la recherche de marqueurs permettant de déterminer de façon spécifique le caractère vital (pré-mortem) d'une blessure, et d'évaluer l'ancienneté d'une plaie, à l'aide de diverses techniques enzymatiques, de biologie moléculaire ou immunohistochimiques. Aucun marqueur n'a, à ce jour, été définitivement validé, en raison de performances diagnostiques insuffisantes et/ou d'une mauvaise reproductibilité aboutissant à des résultats contradictoires. Les études chez l'homme sont tout particulièrement délicates à mener, en particulier du fait de la difficulté d'obtenir des données fiables sur le temps de survie des victimes, mais aussi à cause de la variabilité de l'agent vulnérant. De plus, la littérature ne fournit que peu de données expérimentales dans ce domaine.

Le modèle porcin est un modèle expérimental particulièrement pertinent du fait de similitudes importantes entre le revêtement cutané de l'homme et du porc (règles des 3R : remplacement). Notre étude aura pour objectif de créer un modèle animal de plaies pré-mortem et post-mortem, dans lequel le délai entre la réalisation de la plaie et le décès sera précisément connu et contrôlé. Nous évaluerons le temps de survie minimal pour observer une réaction inflammatoire à l'examen histologique standard, mais également pour obtenir une expression de différentes molécules étant impliquées dans la réponse inflammatoire et les phénomènes précoces de réparation. La spécificité de ces marqueurs sera évaluée grâce à la réalisation chez les animaux de plaies post-mortem. Nous comparerons également différents types d'agent vulnérant, selon leur caractère stérile ou non, et contondant ou non, afin de déterminer la variabilité inhérente aux caractéristiques des armes utilisées.

Aucun animal ne sera spécifiquement mis à mort pour cette étude (réduction). En effet, les blessures seront infligées à des animaux (n=38) anesthésiés sous analgésie contrôlée (raffinement) et soumis avant notre expérimentation à des interventions chirurgicales ou endoscopiques dans le cadre de la formation des étudiants en médecine, systématiquement mis à mort dans ce contexte. Les expérimentations seront menées dans des régions non atteintes par le processus chirurgical (membres).

Cette approche expérimentale originale devrait ainsi permettre d'identifier différents marqueurs de datation, avant d'envisager une seconde phase de validation chez l'homme

2241- L'anastomose entre le nerf spinal accessoire et le nerf musculo-cutané pour traiter les lésions traumatiques du plexus brachial est une technique qui a été appliquée avec des résultats satisfaisants en médecine humaine, chez des blessés, qui auraient conservé une paralysie définitive sans cette intervention.

En établissant un parallèle entre les symptômes cliniques chez les patients victimes d'une lésion du plexus brachial et chez les patients atteints d'amyotrophie spinale (SMA), l'application de cette technique d'anastomose du nerf spinal accessoire au nerf musculo-cutané pour diminuer la progression de la maladie (déficit du muscle biceps) semble être une technique intéressante principalement sur les types III et IV de SMA, maladies pour lesquelles il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement disponible.

L'intérêt d'une telle anastomose termino-latérale est de préserver l'intégrité de la structure du nerf musculo-cutané afin de diriger la repousse axonale obtenue à partir du nerf spinal accessoire vers les muscles proximaux du membre atteint (biceps) et dans le même temps non seulement de préserver les axones résiduels dans les nerfs mais également de conserver la possibilité d'une réinnervation spontanée des motoneurons.

Le but de cette étude est de valider l'intérêt de cette technique dans un modèle de SMA chez le chat, qui développe une pathologie comparable à la pathologie humaine, et ce, à différents stades d'évolution de la maladie (c'est-à-dire en précoce et en chronique). Pour ce faire, ce projet prévoit d'inclure quinze chats SMA :

- un groupe contrôle non traité : 5 animaux
- un groupe traité SMA à un stade précoce : 5 animaux
- un groupe traité SMA à un stade plus évolué : 5 animaux

Le chiffre de 5 animaux par groupe semble être le minimum permettant de s'assurer de la robustesse des résultats (étant donné la difficulté de l'intervention chirurgicale envisagée notamment) sans qu'il soit excessif en terme d'animaux à inclure. Une étude statistique est prévue dans ce projet (Test 1-way Anova, T-test).

Au cours de ce projet, les chats seront surveillés et suivis quotidiennement (visite des techniciens animaliers et/ou du vétérinaire 2 fois par jour) à partir d'indicateurs de souffrance et/ou de détresse (changement de comportement, variation du poids de l'animal, etc.) clairement définis au préalable avec l'équipe des techniciens animaliers en charge de leur bien-être au

sein du Centre de Boisbonne. Un examen clinique vétérinaire sera réalisé de façon systématique chez les chats traités (opérés) à minima tous les 15 jours après intervention. Une pesée hebdomadaire systématique sera instaurée également chez les chats traités et les animaux seront pesés en plus à l'occasion de chaque anesthésie nécessaire au protocole.

La mise en œuvre de procédures (incluant des traitements analgésiques (anti-inflammatoires non stéroïdiens ou morphiniques en fonction des besoins) ou un retrait éventuel de l'expérience) adaptées aux éventuels signes de souffrance et de détresse s'ils persistaient chez des animaux sera réalisée.

2242- Ce projet de type répétitif concerne l'évaluation de la sécurité des produits pharmaceutiques, produits d'hygiène ou compléments alimentaires destinés à être administrés aux animaux.

Suivant la directive 2001/82/EC et amendements, la sécurité des produits pharmaceutiques vétérinaires doit être testée entre autres afin d'évaluer leur toxicité potentielle sur la ou les espèces cibles. Ces études prévoient l'évaluation de la tolérance systémique et/ou locale, en général suivant la voie d'administration et à la posologie préconisée, mais aussi en surdosage et/ou durant une période de traitement allongée de manière à évaluer la marge de sécurité du produit et les effets indésirables d'un surdosage.

De plus, des essais préliminaires de sélections de formulations ou de dosage pour des produits en développement ou des études sur des produits commercialisés peuvent être justifiés.

Lors de ces études, les animaux sont suivis sur le plan général et des examens ou analyses complémentaires peuvent être réalisés. L'espèce, le nombre d'animaux, la voie d'administration et la dose seront justifiées pour chaque étude. En l'absence de données sur le produit dans l'espèce cible, l'essai sera réalisé en séquentiel : un animal est traité en premier et si aucun effet indésirable n'est apparu, les autres animaux seront testés. Des points limites sont mis en place précocement et spécifiquement pour chaque étude. Les animaux auront accès à des enrichissements du milieu spécifiques à l'espèce.

Le nombre d'animaux estimé pour la période de 5 ans est de 8000. Les espèces pouvant être sélectionnées pour ces études sont des rongeurs et des carnivores domestiques.

2243- L'objectif de ce projet de recherche est de tester des stratégies alimentaires innovantes dans l'atelier de maternité permises par l'utilisation d'une alimentation séparée mère/jeunes avant le sevrage, dans un objectif finalisé de réduction de l'usage des antibiotiques en élevage cunicole.

Le programme scientifique est basé sur la réalisation de deux essais.

Dans l'essai 1, nous étudierons plus particulièrement les besoins nutritionnels des jeunes lapereaux (2700 lapereaux issus de 120 femelles faisant 3 cycles de reproduction). Notre objectif est de limiter l'apparition des troubles digestifs en proposant une stratégie alimentaire qui permette une maturation plus rapide de la fonction digestive afin que le lapereau soit plus résistant au stress au moment du sevrage.

Dans l'essai 2, nous étudierons plus particulièrement les besoins nutritionnels des femelles reproductrices (120 lapines lapines produisant 2700 lapereaux au cours de 3 cycles de reproduction). Pour les femelles, notre objectif est de proposer un aliment qui permette d'améliorer leur état corporel, leurs performances de reproduction et leur longévité.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, le nombre minimum d'animaux nécessaires a été calculé pour chacune des variables d'après la variabilité de ce critère, l'écart que l'on souhaite mettre en évidence entre le groupe témoin et les groupes expérimentaux. L'étude de la composition corporelle des femelles par dissection après sacrifice a été remplacée par une méthode de mesure in vivo indolore (la méthode TOBEC). Afin d'éviter toute forme de souffrance liée à la manipulation de l'animal pour cette mesure, le matériel est adapté à la taille de l'animal au moment de la mesure qui est réalisée par une personne formée, compétente et entraînée pour assurer une manipulation bienveillante de l'animal jusqu'à l'atteinte d'un état de calme permettant la mesure.

2244- Compte tenu des souffrances liées à la castration chirurgicale des porcelets mâles, la filière porcine s'est engagée dans une démarche d'abandon de cette pratique d'ici 2018. Une des alternatives proposées est l'élevage de mâles entiers. Cependant, l'élevage de mâles entiers soulève des inquiétudes concernant la qualité de la viande, liée à la présence de défauts d'odeurs (= odeurs sexuelles).

L'objectif de ce projet est de contribuer à mieux connaître l'origine de la variabilité des odeurs sexuelles pour ensuite réduire ces odeurs. Nous allons nous intéresser à l'effet de l'environnement sanitaire en fin d'élevage sur ces odeurs. Aux vues des connaissances obtenues chez les rongeurs et du peu d'informations présentes chez le porc, notre hypothèse est que l'état inflammatoire a un effet sur la fonction de reproduction (précocité sexuelle et/ou activité testiculaire pour même stade pubertaire), les activités intestinale et hépatique, et par conséquent sur la production des molécules à l'origine des odeurs sexuelles (androsténone dans les testicules, scatol dans le gros intestin), leur dégradation (dans le foie) et in fine leur stockage dans le tissu adipeux. Par ailleurs, il a déjà été montré, chez des porcelets âgés de 2 à 3 mois, qu'une modification de l'environnement sanitaire aboutit à des modifications de l'état inflammatoire, une réduction de la vitesse de croissance et à des modifications métaboliques. Actuellement, il n'existe aucune étude concernant l'effet de l'environnement sanitaire sur l'état inflammatoire des porcs mâles entiers âgés de 4 à 5 mois (= fin d'élevage des porcs charcutiers), leur développement sexuel et l'intensité des odeurs sexuelles.

Au total, 120 porcs seront mis en expérience. Une moitié sera élevée dans un milieu sanitaire très propre et désinfecté (salle "propre") et l'autre dans un milieu sanitaire non nettoyé (salle "sale") vers le 5ème mois d'âge. Les porcs des deux groupes seront abattus vers 110 kg de poids vif, ce qui correspond au poids classique d'abattage. Les mesures sur animal vivant concerneront l'état de santé (prises de sang, prises de salive), la concentration en odeurs sexuelles dans le tissu gras (biopsie).

A l'abattoir, les mesures concernent les odeurs sexuelles contenues dans le tissu adipeux, le développement sexuel, l'activité intestinale et hépatique.

Les 120 porcs seront élevés en groupes stables jusqu'à 69 jours d'âge afin de minimiser le stress lié à un regroupement avec des congénères inconnus, puis par binôme entre animaux familiers jusqu'à 104 jours d'âge, et enfin seul jusqu'à l'abattage. Cette pratique permet de réduire le nombre d'affrontements et de blessures potentielles, et par conséquent d'améliorer le bien-être des animaux.

Ce projet a été élaboré en se conformant à la règle des 3R. Premièrement, le porc est l'espèce cible du projet. Il n'est donc pas envisageable de remplacer cette espèce par une autre. Deuxièmement, une biopsie de gras dorsal sera réalisée à âge fixe pour permettre de s'affranchir d'un groupe expérimental à abattage précoce pour recueillir des données physiologiques à âge fixe. Le nombre de porcs (120) mis en expérience est ainsi réduit. Le nombre minimal de porcs par groupe expérimental a été calculé grâce à une approche statistique en prenant en compte l'effet attendu et la variabilité intra-groupe. Troisièmement, la biopsie sera faite à l'aide d'une nouvelle méthode élaborée par une équipe de chercheurs et déjà validée par leurs services vétérinaires. Par ailleurs, les procédures de prises de sang et de biopsie seront réalisées par du personnel qualifié en respectant les règles d'hygiène et de sécurité.

2245- Ce projet concerne deux maladies héréditaires de la rétine, la rétinopathie ponctuée albescente et la maladie de Stargardt. Les personnes porteuses de mutations dans les gènes responsables présentent des modifications métaboliques du cycle visuel dans les cellules rétiniques (modification des réactions biochimiques permettant aux cellules rétiniques d'être activées sous l'impact de la lumière) qui s'accompagnent d'une perte progressive des capacités visuelles. Aucun traitement médical n'est disponible actuellement pour ces deux maladies. La mise au point de solutions thérapeutiques nécessite une approche expérimentale sur l'animal. Dans cet objectif, nous utiliserons deux modèles de souris génétiquement modifiées qui reproduisent certains paramètres des deux pathologies humaines : modifications métaboliques du cycle visuel dans les cellules rétiniques ou ralentissement de la récupération du cycle visuel après éblouissement. Chez ces souris, nous testerons la possibilité de corriger ces anomalies par l'introduction *in situ* (sous la rétine) de gènes sains. Cette étude *in vivo* bénéficiera des résultats de travaux antérieurs *in vitro* qui nous ont permis de sélectionner des vecteurs thérapeutiques (gène sain et son élément transporteur) potentiellement efficaces. L'étude *in vivo* est nécessaire en tant que preuve de concept et c'est une étape préalable aux essais cliniques.

Le projet consiste à administrer dans l'œil des souris, par injection sous-rétinienne, des vecteurs thérapeutiques transportant des gènes sains pour contrebalancer l'effet des gènes déficients. Pour chacun des deux modèles expérimentaux, nous étudierons l'effet de deux doses du vecteur thérapeutique spécifique à chacune des deux maladies. L'impact des traitements sera étudié ensuite chez les souris avec des méthodes d'analyse utilisées en clinique humaine : observation du fond d'œil (fondoscopie), tomographie de cohérence optique et, pour une des deux lignées de souris, électrorétinographie. Ensuite les animaux seront mis à mort et les yeux seront prélevés pour effectuer des investigations histologiques et biochimiques.

Pour minimiser le nombre d'animaux utilisés, et pour renforcer la validité des conditions contrôles, les deux yeux de chaque souris entreront dans le protocole expérimental, chaque œil recevant un traitement différent. Soixante douze souris seront utilisées par lignée de souris, soit 144 souris au total, sur cinq ans. La vision n'étant pas le sens privilégié chez la souris, le handicap visuel temporaire, inévitable après les injections des vecteurs, n'aura pas d'impact important sur leur comportement. Aucune douleur importante n'est prévisible car les procédures expérimentales prévues sont dérivées de techniques cliniques considérées comme indolores en ophtalmologie humaine. Les souris seront hébergées dans un environnement enrichi (copeaux, abri, bâton de cellulose).

2246- La mucoviscidose est la maladie génétique humaine la plus fréquente et dont la médiane de survie des malades n'a pas encore atteint 30 ans. Cette maladie est caractérisée par une anomalie du gène CFTR et une production de mucus altérée. Chez les personnes atteintes, l'absence de gène CFTR fonctionnel entraîne des pathologies telles que bronchite et complications infectieuses pulmonaires, insuffisance pancréatique, obstruction digestive... dont le traitement est aujourd'hui seulement palliatif et symptomatique. Le mucus tapissant les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose est un mucus différent de celui retrouvé chez les individus sains. Il est plus visqueux, plus épais et surtout il permet à des bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* (PA) de coloniser les poumons sans ensuite pouvoir être éradiqué par les antibiotiques. Cette bactérie provoque une inflammation pulmonaire massive entraînant une insuffisance respiratoire sévère, cause majeure du décès des patients atteints de mucoviscidose. Des études précédentes ont permis de caractériser finement les modifications biochimiques de ce mucus. Cependant, l'origine de ces modifications et sa relation avec la colonisation des voies aériennes par PA n'a toujours pas été déterminée, principalement dû au fait qu'aucun modèle animal recréant la pathologie respiratoire de la mucoviscidose n'est disponible. Très récemment, un nouveau modèle porcin de mucoviscidose a été développé dans le cadre d'une collaboration internationale franco-allemande. Ce modèle de porcelets CF développe des signes cliniques de mucoviscidose très semblables à ceux observés chez les patients humains et nous a permis de démontrer pour la première fois que les modifications du mucus pulmonaire se déroulent « *in utero* », avant l'apparition d'une inflammation délétère ou d'une infection bactérienne.

Nos objectifs sont maintenant de comprendre les mécanismes qui conduisent à ces modifications du mucus. En parallèle, nous évaluerons l'impact de ces changements sur la colonisation par *P. aeruginosa*, la réponse immunitaire et sur la prédisposition des patients atteints de mucoviscidose à contracter des infections bactériennes chroniques. A partir du noyau d'élevage des porcs hétérozygotes, il est prévu environ 5 mises-bas par an afin d'obtenir en moyenne une vingtaine de jeunes porcelets CFTR -/- et CFTR +/- pour répondre aux questions scientifiques (n= 250 sur l'ensemble du projet). Remplacement : Aucune méthode alternative ne peut remplacer ce modèle *in vivo* mimant une maladie humaine. Réduction : tous les porcelets

(dépendant des données zootechniques d'élevage) seront utilisés soit pour étudier l'inflammation pulmonaire (CFTR -/- et +/-), soit pour maintenir le noyau d'élevage (CFTR +/-). Raffinement : Les porcelets nouveau-nés homozygotes (CFTR -/-) et hétérozygotes (CFTR +/-) sont alimentés sous la mère durant la première heure, puis maternés heure par heure par les animaliers durant toute la phase expérimentale afin d'en assurer le bien-être (enrichissement social) et maintenus sous-anesthésie durant la phase expérimentale pour contrôler la douleur.

2247- Les thérapies médicamenteuses conventionnelles exploitent les propriétés toxiques d'agents anticancéreux. Ils agissent principalement sur les cellules tumorales mais parfois sur les cellules saines, provoquant des effets secondaires responsables de l'arrêt des traitements chez les patients. Depuis quelques années, des stratégies de chimiothérapies ciblant les cellules tumorales ont émergé afin de véhiculer un agent anticancéreux vers la tumeur sous la forme d'un médicament non-toxique, puis de régénérer son activité toxique au niveau de la tumeur. De tels agents sont appelés vecteurs anticancéreux ou médicaments anticancéreux. Ainsi, nous créons des médicaments capables d'activer leur activité toxique uniquement après reconnaissance d'enzymes présentes dans le microenvironnement tumoral. Lors de précédentes études, notre laboratoire a démontré l'activité d'une nouvelle génération de vecteur anticancéreux *in vivo* chez la souris. Ce vecteur est capable de faire régresser efficacement et durablement des tumeurs du pancréas, du sein ou encore du larynx.

Dans le présent projet, nous souhaitons utiliser ce même vecteur dans la lutte contre le cancer du colon. En effet, bien que les traitements évoluent beaucoup pour traiter ce cancer, il reste le 3^e plus mortel pour l'homme. Il convient donc de trouver de nouvelles stratégies pour améliorer l'arsenal thérapeutique mis à disposition des médecins pour traiter ce cancer. Nous comparerons l'efficacité de notre médicament vectorisé au traitement classiquement utilisé en clinique pour traiter les patients. Afin de chercher une potentielle synergie d'activité cytotoxique sur les cellules tumorales, l'étude inclura également des tests en présence et en absence d'un inhibiteur de l'angiogenèse également utilisé en clinique pour le traitement du cancer du colon. Pour mener à bien cette étude comparative, 96 souris seront nécessaires pour chacun des 3 modèles cancéreux que nous souhaitons étudier afin d'appréhender l'efficacité de notre médicament vectorisé sur la tumeur primaire et sur les métastases. Un total de 288 souris sera donc nécessaire pour mener à bien l'ensemble du projet.

Comme mentionné plus haut, le vecteur anticancéreux a déjà été évalué sur des animaux. Les données recueillies lors de ces précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales.

Par une approche statistique (Snedecor et Cochran), la « Règle des 3 R » établie par Russel et Burch, a été prise en compte afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude convaincante qui ne nécessitera pas de reproduire ces expériences. Les conditions d'expérimentation et d'élevage sont optimisées au mieux (groupe de 3 à 4 souris, nid, jouets etc...) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales (raffinement). Compte tenu des avancées de nos travaux *in vitro*, nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives *in vitro*. Par ailleurs, l'action combinée d'un agent anticancéreux vectorisé et d'un agent inhibiteur de l'angiogenèse ne peut pas être abordée *in vitro*. Ces expériences nécessitent obligatoirement l'usage de modèles animaux.

A terme, ces expériences nous permettront de comparer l'efficacité de notre médicament vectorisé à celle des traitements utilisés en clinique afin de pouvoir envisager de l'accompagner dans une étude clinique de phase 1 chez l'homme.

2248- Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) sont définies comme des cellules caractérisées par l'expression de marqueurs phénotypiques non spécifiques et leur potentiel de différenciation en cellules de la voie mésodermique. Les sources disponibles de cellules stromales mésenchymateuses sont multiples, incluant les tissus fœtaux et les tissus adultes tels que la moelle osseuse et le tissu adipeux. L'intérêt de leur utilisation chez l'homme est en cours d'évaluation dans des pathologies dysimmunitaires comme la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD : Graft versus Host Disease), mais aussi inflammatoires comme l'infarctus du myocarde, le diabète ou des affections neurodégénératives. Les CSM ont une action immunosuppressive sur le système immunitaire qui a été démontrée dans certains modèles animaux. Les mécanismes pertinents pour leur efficacité thérapeutique ne sont pas encore bien définis. Pour cela, nous souhaitons étudier l'effet immunomodulateur des CSM et chercher un mécanisme responsable de cet effet.

L'objectif de ce travail est de mieux définir les rôles joués par les CSM dans le traitement d'une maladie dysimmunitaire grave, la GvHD, notamment leurs interactions avec les différents types de cellules immunitaires, le(s) mécanisme(s) impliqué(s) et leur biodistribution dans les organes.

Les conformités avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement est bien appliquées :

- Remplacement: En biologie immunologique, il est impossible de récapituler l'ensemble des événements conduisant la réaction immunitaire dans un système cellulaire. Plusieurs processus régissant les interactions immunitaires ne sont pas analysables *in vitro*. Il est donc nécessaire d'établir si les CSM sont efficaces dans le contexte de l'animal entier portant une maladie. De plus, la validation de résultats obtenus *in vitro* sur un ou plusieurs modèles animaux est indispensable en vue d'une application clinique. La souris est un petit mammifère et possède donc de nombreuses caractéristiques physiopathologiques communes avec l'homme indispensable pour l'extrapolation des résultats. Nous avons choisi d'utiliser des souris profondément immunodéficientes pour favoriser la prise de xénogreffe de cellules immunitaires humaines.

- Réduction: Le choix des conditions expérimentales est fixé en lien avec les questions scientifiques du projet et les principes de réduction. Les différents paramètres sont pris en compte tels que les types de greffon humain, les types et les doses de CSM. Les procédures expérimentales sont rigoureusement planifiées afin de n'utiliser que le nombre d'animaux strictement nécessaire. Pour atteindre les objectifs scientifiques du projet, un nombre de 310 souris sera utilisé en ajoutant 40 souris reproductrices.

- Raffinement: Les points limites sont établis de façon à détecter le plus précocement possible les signes de souffrance des animaux en fonction de l'objectif de l'expérimentation. Ceux-ci sont basés sur les symptômes cliniques de la GvHD adaptés à la souris. Les animaux recevront une anesthésie et/ou analgésie adaptée à chaque procédure expérimentale.

2249- Notre projet est une évaluation d'un traitement du syndrome Crigler Najjar (CN). Ce syndrome est une maladie génétique héréditaire très rare. Elle touche environ une naissance sur un million. Aujourd'hui, une centaine de patients sont référencés en Europe, principalement aux Pays Bas, en France et en Italie.

Ce syndrome se manifeste dès la naissance par une jaunisse très sévère, provoquant des dommages neurologiques très graves, voire mortels. L'origine de cette maladie est une mutation de l'ADN qui a pour conséquence la défaillance d'une enzyme synthétisée par le foie. Cette enzyme, qui porte le nom de UGT1A1, permet normalement d'éliminer un composé jaune très toxique de notre sang, appelé bilirubine. Dans le cas Crigler Najjar, ce composé s'accumule dans la circulation sanguine et va provoquer une jaunisse et des dommages irréversibles au cerveau.

Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement pour guérir de cette maladie.

Notre projet est de mettre au point un traitement efficace pour cette maladie. Nous voulons développer un moyen de restaurer l'activité de l'enzyme hépatique défectueuse et ainsi dégrader la bilirubine sanguine.

Notre stratégie est une approche de thérapie génique : nous allons utiliser les Virus Associés aux Adénovirus (AAV) afin d'apporter aux cellules hépatiques un ADN capable de synthétiser l'enzyme UGT1A1.

Dans le but de tester l'efficacité de nos traitements et de réduire le nombre d'animaux utilisés, nos virus AAV seront dans un premier temps caractérisés in vitro : nous sélectionnerons ceux capables de synthétiser le plus efficacement dans des cellules de foie en culture, l'enzyme UGT1A1. Mais pour savoir si l'enzyme sera fonctionnelle ou non, aucun test vitro n'est aujourd'hui disponible pour répondre à cette question. Seules des conditions in vivo sont capables d'activer au niveau du foie la dégradation enzymatique de la bilirubine du sang.

Il existe un mutant naturel de rat, le rat GUNN, qui présente des homologies avec la maladie génétique humaine Crigler Najjar. Nous avons donc choisi ce modèle pour tester nos virus et l'activité de UGT1A1. Si nos traitements sont fonctionnels, le taux de bilirubine sanguine chutera, la jaunisse disparaîtra.

Afin de déterminer le nombre de rats nécessaires à notre étude et surtout de le limiter au maximum, selon la règle des 3 R, nous avons réalisé une étude statistique, par une approche standard de test de comparaison de moyennes : nous estimons à 5 le nombre de rats par groupe à analyser. Pour l'ensemble de notre projet, qui durera 3 ans, et compte-tenu des paramètres qui seront analysés, nous estimons à 240 le nombre de rats nécessaires à notre étude. Ce chiffre reflète notre effort pour limiter au maximum le nombre de rats utilisés pour notre étude.

Dans un souci de raffinement de nos techniques, nous utiliserons des analgésiques avant, pendant et après les manipulations douloureuses et ils seront prodigués à des doses, des durées et des fréquences adéquates pour contrôler la douleur.

Il est important de préciser que le rat GUNN est certes un rat malade mais il ne souffre pas des conséquences de sa maladie. Il n'est donc pas nécessaire d'adapter de soins spécifiques pour cette espèce. Cependant, afin de garantir le bien être animal, tous les animaux seront observés et suivis attentivement tout au long du projet. Nos expérimentateurs seront chargés de surveiller et garantir que tout sera mis en œuvre pour diminuer au maximum la douleur, la souffrance, ou l'angoisse éventuelles des rats. Ils sont familiarisés au comportement général des rats et habitués à détecter leurs signes de détresse.

2250- A l'heure actuelle, on pense que les pathologies neurodéveloppementale telles que l'autisme ou l'épilepsie sont dues en partie à des facteurs génétiques mais il reste encore à les caractériser et à préciser leurs rôles. Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés aux troubles du développement du cerveau caractéristiques de ces pathologies, l'étude chez l'animal est indispensable. Dans ce domaine l'utilisation de lignée de souris transgénique c'est-à-dire possédant la même mutation sur un gène impliquée dans les troubles du développement cérébral chez l'homme est un outil indispensable pour faire avancer la recherche.

Le cerveau est composé d'un ensemble de circuits neuronaux précis et complexes reliant de grands ensembles de neurones. Lors du développement, les neurones acquièrent très tôt des caractéristiques moléculaires et anatomiques distinctes. Ces dernières années nous avons identifiés deux gènes candidat: le gène mPins et le gène Gnai3. Ces gènes sont exprimés dans le cerveau des mammifères et nous soumettons ici l'hypothèse que mPins et Gnai3 contrôlent le développement des circuits de neurones au cours de la formation du cerveau, et participe à l'âge adulte au bon fonctionnement du cerveau.

Notre projet repose sur une approche intégrative nécessitant le fonctionnement du cerveau dans son intégrité ce qui reste encore impossible à modéliser. Par conséquent, nous pensons qu'il n'existe pas de remplacement disponible à notre modèle expérimental qui permettrait d'atteindre les objectifs scientifiques du travail proposé. Pour supprimer l'angoisse, la détresse ou la douleur subie par les animaux au cours de l'expérience, les animaux sont élevés en cage collective enrichie et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place. Pour de réduire le nombre d'animaux qui seront mis en reproduction, nous utiliserons à la fois les bébés mâles et femelles issus des croisements.

Enfin, pour n'utiliser que le nombre minimal d'animaux tout en garantissant la validité scientifique et statistique des résultats, nous considérons qu'un nombre minimum de 8 animaux est nécessaire pour chaque condition expérimentale. Nous utiliserons dans ce projet quatre lignées de souris transgéniques à quatre stades de développement et ceci pour deux études histologique différentes. Notre projet portera donc sur 32 lots de souris et nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 512 souris.

2251- Ce projet a comme but principal de mettre en évidence les mécanismes neurobiologiques impliqués dans la prise de décision. La prise de décision est un processus psychologique fondamental pour guider nos actions. De façon importante, il a été démontré que plusieurs désordres psychiatriques sont associés à des déficits de prise de décision. Ainsi la compréhension de ces processus peut amener à une amélioration de la prise en charge de psychopathologies chez l'Homme. Nous utiliserons deux modèles de prise de décision chez le rat (impulsivité et prise de risque) et nous allons les coupler avec des approches pharmacologiques, de lésion cérébrale et d'électrophysiologie pour étudier les neurotransmetteurs et les régions du cerveau qui participent au processus de prise de décision chez le rat. Notre principale hypothèse de travail est que l'interaction entre les systèmes impliqués dans la régulation des émotions et le cortex préfrontal jouent un rôle primordial dans la prise de décision.

Ce projet est constitué de 2 phases : une phase d'entraînement aux deux modèles (tests cognitifs ; procédure 1) et une phase d'intervention pharmacologique ou neurobiologique (procédures 2-4).

Tous les animaux seront exposés à la procédure 1 et seront ensuite distribués dans des groupes séparés qui seront exposés à une seule des phases suivantes (procédures 2-4).

La procédure 1 correspond à l'entraînement dans les modèles de prise de décision.

La procédure 2 correspond aux traitements avec des agents pharmacologiques.

La procédure 3 correspond à une chirurgie pour induire des lésions de régions cérébrales discrètes.

La procédure 4 correspond à des mesures d'électrophysiologie in vivo chez le rat anesthésié pour étudier l'activité des circuits neuronaux du cerveau.

Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner). Ce type de recherche, visant à comprendre les bases d'un processus psychologique, peut être uniquement mené sur un animal vivant (remplacer). Nous minimiserons le nombre d'animaux utilisés par des méthodes expérimentales validées et reproductibles ainsi que des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA qui nous permettent de réaliser plusieurs comparaisons entre les groupes et de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduire). Les animaux subissant une chirurgie (procédure 3) seront traités pour de possibles douleurs post-opératoires (raffiner). Nous avons calculé que pour cette étude 594 rats seront nécessaires pour obtenir des données qui seront analysables statistiquement.

Cette recherche innovante fournira des informations critiques pour la compréhension des mécanismes sous-jacents à la prise de décision et pourra avoir un impact sur la prise en charge des maladies psychiatriques chez l'Homme.

2252- Le cancer est un problème de santé public majeur, touchant un individu sur trois au cours de son existence. Le vieillissement de la population et des modes de vie plus sédentarisés entraînent une augmentation de l'incidence de plusieurs pathologies cancéreuses, ainsi que des coûts supportés par la collectivité. Si des améliorations significatives ont été obtenues au cours des dernières décennies pour le traitement et la prise en charge des patients, le diagnostic du cancer reste une pathologie lourde avec un pronostic souvent très sombre. Les approches immunothérapeutiques ont apporté des avancées récentes remarquables démontrant le potentiel du système immunitaire dans la lutte anti-tumorale. Le développement de vaccins thérapeutiques anti-tumoraux a soulevé un enthousiasme important au vu des excellents résultats obtenus en préclinique, mais a obtenu jusqu'à présent des résultats décevants dans les phases cliniques avancées. Ces études ont permis néanmoins de renforcer nos connaissances des mécanismes immunitaires impliqués dans la réponse et la tolérance lors du développement tumoral.

Les améliorations visées actuellement portent non seulement sur les vaccins eux-mêmes mais aussi sur les adjuvants utilisés, afin d'ouvrir des perspectives de traitements combinés avec une efficacité renforcée.

Notre partenaire est une société spécialisée dans le développement de vaccins pour des indications de santé publique insuffisamment prises en charge.

Un modèle murin de lignée cancéreuse (CT26) a été sélectionné en raison de sa caractérisation génomique, mutationnelle, immunologique et de sa sensibilité aux médicaments immuno-modulateurs.

Les expérimentations animales serviront à mesurer l'immunogénicité ainsi que l'impact de l'ajout d'un adjuvant différent.

Plusieurs protocoles seront ainsi effectués afin de déterminer quels sont les formulations et adjuvants les plus efficaces.

Afin de tester les différentes formulations, un maximum de 12 protocoles est prévu par année, pouvant se répéter sur les 5 années à venir.

Bien qu'il s'agisse de maxima et que nous souhaitons utiliser le moins d'animaux possible, cette étape est obligatoire pour s'assurer de l'immunogénicité de la formulation.

Nous utiliserons 37 animaux par protocole, répartis en 4 groupes de 8 animaux et d'un groupe contrôle de 5 animaux. Le nombre total d'animaux pour ce projet peut atteindre 2200 animaux, tout en considérant qu'il s'agit d'un maximal et que tous les efforts seront faits afin de déterminer le plus rapidement possible et en utilisant le moins de protocoles possibles, la formulation la plus utile pour le développement en cours.

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

2253- Le cancer est un problème de santé public majeur, touchant un individu sur trois au cours de son existence. Le vieillissement de la population et des modes de vie plus sédentarisés entraînent une augmentation de l'incidence de plusieurs

pathologies cancéreuses, ainsi que des coûts supportés par la collectivité. Si des améliorations significatives ont été obtenues au cours des dernières décennies pour le traitement et la prise en charge des patients, le diagnostic du cancer reste une pathologie lourde avec un pronostic souvent très sombre. Les approches immunothérapeutiques ont apporté des avancées récentes remarquables démontrant le potentiel du système immunitaire dans la lutte anti-tumorale. Le développement de vaccins thérapeutiques anti-tumoraux a soulevé un enthousiasme important au vu des excellents résultats obtenus en préclinique, mais a obtenu jusqu'à présent des résultats décevants dans les phases cliniques avancées. Ces études ont permis néanmoins de renforcer nos connaissances des mécanismes immunitaires impliqués dans la réponse et la tolérance lors du développement tumoral.

Les améliorations visées actuellement portent non seulement sur les vaccins eux-mêmes mais aussi sur les adjuvants utilisés, afin d'ouvrir des perspectives de traitements combinés avec une efficacité renforcée.

Notre partenaire est une société spécialisée dans le développement de vaccins pour des indications de santé publique insuffisamment prises en charge.

Un modèle murin de lignée cancéreuse (CT26) a été sélectionné en raison de sa caractérisation génomique, mutationnelle, immunologique et de sa sensibilité aux médicaments immuno-modulateurs.

Les expérimentations animales serviront à mesurer l'efficacité anti-tumorale des produits formulés par notre partenaire.

Dans un autre projet, se déroulant en parallèle, nous déterminerons des associations de formulations vaccinales et d'adjuvants capables de déclencher une immunogénicité satisfaisante.

Dans ce projet, nous utiliserons ces combinaisons optimisées de traitements sur des animaux porteurs de tumeurs, afin de mettre en évidence leur efficacité thérapeutique. Cela nous permet d'éviter tout double emploi d'animaux, selon les règles de réduction et de raffinement préconisées par les 3R.

2254- Plusieurs protocoles seront ainsi effectués afin de déterminer le meilleur schéma thérapeutique avec les différents combinaisons retenues par ailleurs.

Au préalable, nous effectuerons un premier protocole, sans traitement, visant à déterminer la quantité de cellules tumorales à injecter afin de mettre en place des tumeurs primaires dans l'ensemble des animaux traités tout en minimisant l'apparition de métastases tumorales, qui ne sont pas l'objet de cette étude.

La chronologie d'apparition des tumeurs et métastases sera caractérisée, par un suivi régulier au niveau du site d'injection ainsi qu'un contrôle par échographie et tomographie assistée par ordinateur (μ CT).

Ce protocole utilisera donc 3 quantités de cellules à injecter, avec 15 animaux par lot (10 animaux pour le suivi de croissance tumorale seul et 5 animaux qui seront utilisés aussi pour le suivi des métastases par échographie et tomographie ainsi qu'une collecte de la tumeur primaire pour analyse et une analyse nécropsique des poumons pour corroborer les résultats préalablement obtenus). Ces premiers résultats nous permettront d'ajuster le nombre d'animaux par groupe pour s'assurer d'obtenir l'ensemble des réponses nécessaires au projet.

Afin de tester les différentes formulations, un maximum de 10 protocoles de mesures de croissance tumorales est prévu par année, pouvant se répéter sur les 5 années à venir.

Bien qu'il s'agisse de maxima et que nous souhaitions utiliser le moins d'animaux possible, cette étape est obligatoire pour mettre en évidence la formulation la plus aboutie et efficace.

Nous utiliserons un maximum de 75 animaux par protocole, répartis en 5 groupes de 15 animaux (un groupe contrôle et quatre combinaisons de formulations/adjuvants seront testées en simultané). Le nombre d'animaux pour chaque groupe pourra être réduit après connaissance de la variabilité observée à la suite des premières expériences. Le nombre total d'animaux pour ce projet peut donc atteindre 3795 animaux, tout en considérant qu'il s'agit d'un maxima et que tous les efforts seront faits afin de déterminer le plus rapidement possible et en utilisant le moins de protocoles possibles, la formulation la plus efficace.

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

2255- Nous étudions les mécanismes régulateurs des fibroses hépatiques dans les infections par les schistosomes et par les virus de l'hépatite C et B. Ces infections causent des inflammations chroniques du foie (Hépatites) qui évoluent chez certains patients en fibrose hépatique (FH). La FH est due à l'accumulation de tissu fibreux de réparation dans les sites d'inflammation. Chez le patient sain, ces fibres sont détruites et remplacées par des cellules saines; chez certains patients elles s'accumulent et envahissent le tissu hépatique. La FH peut évoluer en cirrhose qui est une maladie grave irréversible et souvent mortelle. Nous tentons de découvrir des marqueurs génétiques qui permettraient de prédire la progression d'une FH en cirrhose. Dans ce but, nous conduisons des études génétiques chez plusieurs milliers de patients infectés par les schistosomes ou par le virus de l'Hépatite C et nous complétons ces études par des études chez la souris quand nous ne pouvons répondre à une question importante par l'analyse des populations humaines. Nous avons mis en évidence plusieurs marqueurs qui soulignent l'importance de certaines voies dont le rôle est mal connu dans les FH en particulier certaines cytokines qui semblent avoir des effets protecteurs contre la FH. Nos travaux dans les modèles souris ont pour but de produire les parasites utilisés dans nos études immunologiques chez l'humain et de tester au cours de l'infection l'origine (dans quels organes sont produites ces

cytokines) et le rôle des cytokines impliquées dans ces voies. L'étude dans le modèle souris est indispensable pour comprendre la communication entre les organes au cours de l'infection.

Bien que la grande majorité sinon la totalité des expériences ne devrait pas créer de douleurs ou de stress importants aux animaux, nous faisons en sorte d'utiliser la dose minimale de parasites nécessaire au phénotype étudié afin de minimiser cette souffrance potentielle. De même, pour le confort de l'animal, un enrichissement sera réalisé à l'aide de carrés de coton adéquats pour les souris.

Les souris seront surveillées quotidiennement afin de déceler une quelconque souffrance (douleur ou stress).

Pour nos projets qui se dérouleront sur 2 ans, nous utiliserons 132 souris. Ce nombre de souris est le minimum requis pour toutes nos expériences afin d'avoir une puissance statistique suffisante.

2256- 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 aliments santé ayant un intérêt thérapeutique dans le domaine de l'inflammation chronique de l'intestin. Le principal objectif de l'étude est d'évaluer les effets d'un traitement chronique par 4 composés (la dénomination des composés est sujette à confidentialité) sur l'inflammation colique chez la souris. 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 adjonction de DSS dans l'eau de boisson pendant 5 jours. Les composés à tester seront administrés pendant 10 jours (2 jours avant et 8 jours après le début de l'administration du DSS). Le poids corporel, la prise alimentaire et la prise de boisson 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) puis les animaux seront anesthésiés et le côlon sera ainsi 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. Une seconde portion de côlon sera prélevée et immédiatement congelée pour une analyse d'expression de biomarqueurs d'intérêt. Une troisième et dernière portion sera réservée pour une éventuelle analyse histologique sur coupes pour l'établissement d'un score de sévérité sur des critères microscopiques.

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 administration de DSS chez la souris qui est un modèle particulièrement bien caractérisé dans la littérature. 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 menées par le client. Le nombre de 20 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 100 souris Balb/cj sera utilisé, divisé en 5 groupes de 20 animaux :

un groupe contrôle (traité au véhicule) et 4 groupes traités respectivement avec chacun des 4 composés à tester.

- 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 aliment sur l'inflammation colique après ingestion.

2257- Les infections pulmonaires peuvent être classées en deux catégories : les pneumopathies communautaires lorsqu'elles sont acquises hors du milieu hospitalier et les pneumopathies nosocomiales quand elles sont contractées à l'hôpital. L'optimisation de l'antibiothérapie pour le traitement des infections pulmonaires comme pour toute autre infection, correspond à un véritable enjeu de santé publique afin de limiter l'apparition de bactéries résistantes. Toutefois, la particularité de l'infection pulmonaire est que plusieurs voies d'administration des antibiotiques peuvent être envisagées. En effet, une des stratégies dans le traitement des infections pulmonaires est d'administrer les antibiotiques par aérosol dans le but d'atteindre des concentrations plus élevées au niveau des poumons et des concentrations plasmatiques plus faibles qu'après administration intraveineuse, limitant ainsi une potentielle toxicité systémique des antibiotiques. Toutefois, peu de données existent dans la littérature concernant les réels avantages cliniques et les inconvénients de l'administration nébulisée des antibiotiques. Un système de classification biopharmaceutique (BCS) a été développé pour prédire la pharmacocinétique in vivo des médicaments administrés par voie orale en fonction de leur lipophilie et de leur perméabilité, toutefois aucune classification n'existe pour l'administration par voie pulmonaire. Le but de cette étude est d'évaluer chez le rat, les caractéristiques de diffusion pulmonaire d'anti-infectieux variés (antibiotiques, antifongiques, antiviraux) choisis pour leurs indications dans les pneumopathies nosocomiales ou communautaires et pour leurs propriétés de perméabilité membranaire différentes, en relation avec leurs caractéristiques physico-chimiques. L'efficacité de la voie nébulisée par rapport à la voie intraveineuse sera évaluée en mesurant pour chacune des molécules et chacune des voies d'administration, les concentrations au niveau plasmatique et pulmonaire par lavages broncho-alvéolaires, à différents temps post administration. Dans un second temps, une corrélation entre ces résultats de diffusion pulmonaire in vivo et des résultats in vitro de perméabilité sur des modèles cellulaires pulmonaires seront réalisés afin d'évaluer le caractère prédictif des données in vitro. 1536 rats seront utilisés pour cette étude et la règle des 3R a été prise en compte dans l'élaboration de ce protocole. Pour réduire le nombre d'animaux, des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA associées à un travail de modélisation pharmacocinétique en aval vont nous permettre de réaliser plusieurs comparaisons entre les groupes. Le remplacement des animaux est impossible car aucun modèle alternatif n'existe pour mimer les concentrations plasmatiques et pulmonaires à la suite d'une

administration de substance médicamenteuse. Toutefois, le raffinement est pris en compte pendant l'expérimentation, à savoir que l'administration des antibiotiques par voie nébulisée et intraveineuse ainsi que les prélèvements sanguins et par lavages bronchoalvéolaires sont réalisés chez des rats anesthésiés. De plus, entre l'administration et les prélèvements, les animaux vigiles sont placés dans un environnement thermostaté, avec libre accès à la nourriture et à l'eau et 2 par cage afin de limiter le stress lié à l'expérimentation.

2258- La bactérie *Helicobacter pylori* infecte l'estomac de la moitié de la population humaine mondiale. Cette infection peut atteindre jusqu'à 90% de la population dans les pays en voie de développement. Dans les pays industrialisés, entre 30 et 40% des adultes sont infectés chroniquement. Après acquisition de la bactérie durant l'enfance, l'infection par *H. pylori* devient chronique et persiste plusieurs dizaines d'années voire toute la vie. Bien que cette infection provoque toujours une gastrite chronique, elle est asymptomatique dans la grande majorité des cas. Parmi les personnes infectées, environ 10% développeront un ulcère gastrique ou duodénal. L'infection par *H. pylori* est également à l'origine de pathologies plus sévères comme l'adénocarcinome gastrique qui touche entre 1 à 3% des personnes infectées. On estime que l'infection par *Helicobacter pylori* est responsable de 60 à 90 % des cas de cancers gastriques et qu'elle cause le décès de près de 800 000 personnes dans le monde chaque année.

La relation entre l'infection par *H. pylori* et le développement de lésions cancéreuses gastriques a pu être mise en évidence d'une part par des études épidémiologiques mais aussi en grande partie par le développement de modèles animaux. Ce projet a pour objectif de mieux comprendre comment l'infection chronique par *H. pylori* conduit à des pathologies aussi graves que le cancer gastrique. Il a précédemment décrit que l'infection chronique par *Helicobacter pylori* conduit à l'inhibition de l'expression des facteurs de transcription USF (Upstream Simulating Factor). D'autre part, l'expertise depuis plusieurs années de notre équipe sur le rôle majeur des facteurs de transcription USF dans le contrôle de la stabilité génomique nous a conduit à envisager les conséquences de la perte d'USF1 d'une infection par *Helicobacter pylori* dans le modèle murin. Pour notre étude le modèle murin ne peut pas être remplacé par des modèles de culture de cellules gastriques utilisés *in vitro* car il est le plus proche de ce qui se passe dans un estomac humain et permet d'étudier les lésions gastriques et l'inflammation induite par l'infection par *H. pylori*.

Pour cette étude, nous utiliserons le modèle murin de souris invalidées de manière constitutive pour le gène *Usf1* que dispose notre équipe. Le projet de recherche proposé a pour objectif dans le respect de la règle des 3 R d'analyser les conséquences au niveau histologique et moléculaire d'une infection chronique gastrique par *Helicobacter pylori* dans les souris C57BL/6 invalidées pour le gène *USF1* par rapport à un groupe de souris contrôles. Les conséquences histologiques et moléculaires de l'infection seront analysées à différents temps (1,5 mois, 3 mois et 6 mois) afin d'analyser les différents stades après infection (gastrite, ulcère gastrique, adénocarcinome gastrique). Le nombre de souris utilisées sera réduit au maximum soit pour l'ensemble du projet 108 souris, nombre minimal requis pour avoir des groupes significatifs (test Mann-Whitney) pour les différentes conditions. Nous envisageons une accélération du développement des lésions dysplasiques dans les souris KO *Usf1*. L'ensemble de l'expérimentation sera réalisé par le personnel habilité avec une surveillance quotidienne des souris pour respect du bien être des animaux. L'infection par *Helicobacter pylori* ne cause aucune souffrance des animaux selon de précédentes études comparables.

Le développement du modèle animal (souris C57/Bl6) a permis de démontrer précédemment un effet mutagène direct de l'infection au niveau des cellules épithéliales gastriques en association avec l'inflammation chronique induite. Le modèle de colonisation de la souris par *H. pylori* est parfaitement adapté aux questions scientifiques que nous abordons.

2259- L'obésité est une maladie chronique définie par une accumulation anormale et excessive de graisses, favorisant le développement de maladies métaboliques telles que le diabète de type II ou encore les maladies cardiovasculaires. En France, en 2012, l'obésité et le surpoids concernaient respectivement 15 et 32% de la population, avec des conséquences médicales représentant près de 7% des dépenses de santé en 2007. Connaître les mécanismes aboutissant à ces complications est donc un enjeu majeur de santé publique. Les causes de cette accumulation excessive de graisses sont multifactorielles. Cependant, la surconsommation alimentaire ainsi que les mauvais choix nutritionnels sont les principales raisons de cette épidémie. La forte augmentation de la part des acides gras polyinsaturés (AGPI) n-6 dans la ration alimentaire est un exemple de l'évolution de notre alimentation des 50 dernières années. De même, plusieurs études ont récemment évoqué une relation entre l'augmentation de la consommation de fructose et l'augmentation de l'incidence de l'obésité et des maladies chroniques. Un apport excessif de fructose induit une stéatose hépatique non alcoolique (NASH) chez le rat. Nos données préliminaires montrent que la consommation excessive du précurseur des AGPI n-6, l'acide linoléique (18 :2 n-6) perturbe le métabolisme lipidique du foie chez le rat, signes précurseurs de stéatose hépatique. L'objectif de notre projet est de déterminer si la consommation excessive de 18 :2 n-6 favorise l'apparition de la NASH et des perturbations des métabolismes des lipides et du glucose induites par l'excès de fructose. Le projet consiste en trois procédures réalisées sur des rats Wistar. Dans une première étape, nous soumettrons des rats soit à un régime standard (A) soit à un régime enrichi en 18 :2 n-6 (B) dès le début de la gestation. Au sevrage, les rats recevront soit le régime de leur mère soit l'autre régime, nous constituerons ainsi quatre groupes d'animaux (AA-AB-BA-BB, n=8 /groupe). A l'âge de 6 semaines, nous ajouterons du fructose dans l'eau de boisson (à hauteur de 15%) afin de mimer les apports élevés des sucres ajoutés rencontrés dans l'alimentation occidentale. Une prise de sang sera réalisée à 6 semaines (avant le fructose) et 9 semaines d'âge pour évaluer le métabolisme hépatique. A 11 semaines, une évaluation du métabolisme du glucose sera réalisée par un test de tolérance orale au glucose. Les animaux seront sacrifiés à 12 semaines.

Cette procédure a été réfléchié selon la règle des 3R. Il s'agit d'une étude sur les effets chroniques de l'alimentation faisant appel à de la physiologie intégrée qui ne peut pas être remplacée par un protocole in vitro. Le nombre d'animaux reproducteurs (10 femelles, 5 mâles) a été calculé afin d'optimiser nos chances d'obtenir 32 rats mâles au sevrage. Ce nombre de 32 rats a été calculé afin d'obtenir un nombre significatif d'animaux nous permettant de mettre en évidence un effet de l'excès de 18 :2n-6 sur le développement de stéatose induite par le fructose. Enfin, la douleur sera minimisée lors des prises de sang par l'utilisation d'un anesthésique local.

2260- La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative aussi fréquente que la sclérose en plaques. Son issue est fatale en quelques années après le diagnostic, par paralysie progressive provoquant une insuffisance respiratoire. Une partie des cas de

SLA est d'origine familiale (SLAF), le plus souvent de transmission autosomique dominante. La SLAF est une maladie hétérogène, et des mutations dans plus de 10 loci sont actuellement connus pour provoquer la SLAF.

Nous disposons au laboratoire de deux modèles conditionnels de la maladie, basés sur des mutations des gènes SOD1 et Fus. Ces modèles permettent d'évaluer l'importance d'un type cellulaire donné dans la maladie.

Notre objectif ici est d'étudier la contribution du muscle squelettique dans le phénotype des modèles de SLA. Pour cela, nous abolirons l'expression des transgènes sélectivement dans le muscle squelettique.

Nous étudierons 256 souris, de 8 génotypes différents (32 souris par groupe ; SOD1, Fus, avec ou sans ablation sélective du transgène dans le muscle et leurs contrôles respectifs). La moitié de ces souris sera suivie jusqu'au décès de l'animal, et les tissus prélevés seront consacrés pour moitié à des études histologiques et pour moitié à des études moléculaires. La seconde moitié des souris sera sacrifiée au début des symptômes moteurs, et les tissus prélevés comme précédemment.

Environ 100 souris permettront le maintien des trois lignées transgéniques nécessaires à l'étude. Cette étude nécessitera donc au total 350 souris.

Conformément à la règle des 3 R :

-Nous avons Réduit le nombre d'animaux à 16 souris par groupe d'âge, nous permettant ainsi d'obtenir un résultats statistiquement exploitable.

-Nous avons Remplacé, dès que possible, le modèle animal par un modèle cellulaire. Cependant, pour la compréhension du mécanisme complexe que nous étudions, le modèle animal reste indispensable. La plupart de nos expériences ne peuvent être remplacées par des manipulations de culture cellulaire du fait de la complexité de la maladie. Par ailleurs, la distance évolutive entre mammifères et invertébrés rend les manipulations indispensables dans un modèle mammifère.

-Nous avons amélioré leur bien-être (Raffinement) en procédant à un enrichissement de leur milieu de vie (à l'aide de cotons, papiers et de bâtons), à un maintien des interactions sociales et un suivi quotidien des animaux. Nous limitons également la souffrance en ayant recours à des méthodes chirurgicales stériles ainsi qu'une analgésie post-opératoire. Enfin, nous avons réduit le stress procuré à l'animal en limitant le bruit dans l'animalerie et en les manipulant avec calme et soin.

2261- L'ataxie de Friedreich (AF) est la forme la plus répandue des ataxies héréditaires (1/40000), elle se manifeste par une diminution progressive de la coordination motrice et des troubles de l'équilibre associés à une cardiomyopathie hypertrophique. Les tissus les plus affectés sont le système nerveux ainsi que le muscle cardiaque. La pathologie débute au niveau des ganglions dorso rachidiens (DRG) où se situent les gros neurones sensitifs qui dégèrent chez les patients évoluant en une dégénérescence des faisceaux spino-cérébelleux, qui partent du DRG et remontent vers le cerveau. Les patients développent de plus une atrophie d'un noyau cérébelleux profond. Le gène responsable de la pathologie code pour la frataxine, une protéine mitochondriale impliquée dans la biosynthèse des protéines à centre fer-soufre. A ce jour, aucun traitement n'est disponible pour l'AF. Nous avons généré dans le laboratoire des modèles murins de la pathologie qui reproduisent notamment les symptômes neurologiques associés à l'AF. Ces souris constituent un bon modèle pour tester des approches thérapeutiques de la pathologie mais le modèle reste néanmoins imparfait car les souris ont une atteinte cérébelleuse qui n'est pas retrouvée chez les patients et développent de plus une atteinte très tardive de la pathologie. L'objectif de ce projet est de développer un nouveau modèle de souris et de le caractériser afin d'évaluer s'il constitue un meilleur modèle pour l'atteinte sensitive de la pathologie.

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

Notre laboratoire a démontré la possibilité de corriger la cardiomyopathie développée par les souris modèles de la pathologie via l'injection intraveineuse d'un vecteur AAV10 exprimant la frataxine humaine. Notre objectif actuel est de fournir une nouvelle approche thérapeutique visant à corriger/prévenir l'atteinte neurologique dans le modèle souris précédemment établi. Pour cela nous proposons une approche de thérapie génique de manière à délivrer dans les cellules malades le gène codant la frataxine humaine.

Le but de l'expérience est de déterminer si l'expression de la frataxine humaine dans les tissus affectés à l'aide d'un vecteur viral permet de prévenir et/ ou de corriger le phénotype des souris dans le système nerveux central et principalement dans les DRG affectés en premier chez les patients. Notre projet se divisera en différentes phases, tout d'abord la caractérisation du modèle. Enfin, la deuxième phase du projet permettra d'évaluer la prévention de l'apparition des symptômes neurologiques associés à l'AF dans notre modèle. Si nos résultats sont encourageants, la troisième phase consistera à l'évaluation de la correction du phénotype dans notre modèle. Un nombre total de 70 souris sauvages et 140 souris mutantes sera utilisées. Cet effectif correspond au nombre d'animaux nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique suffisante. D'autre part, environ 600 animaux seront utilisés pour la création et le maintien de la lignée.

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

2262- Un enjeu de recherche pour l'élevage porcin aujourd'hui est de connaître les conséquences dans le futur de la sélection d'animaux capables de bons niveaux de performances de production tout en ayant une ingestion d'aliment limitée (efficacité alimentaire accrue). L'application d'une sélection génétique divergente sur la consommation moyenne journalière résiduelle d'aliment (CMJR) sur le porc Large-White en croissance a été une première étape pour la recherche de leviers génétiques pour améliorer l'efficacité alimentaire en production porcine. Cette sélection génétique sur la CMJR a consisté à sélectionner des animaux ayant des niveaux différenciés de dépense énergétique consacrée aux besoins énergétiques autres que les besoins d'entretien et de production classiquement considérés en productions animales. Ainsi, des porcs à faible CMJR (CMJR-) ont de faibles dépenses énergétiques pour ces besoins 'autres' et sont plus efficaces pour transformer l'aliment ingéré en croissance corporelle.

Il a par ailleurs été observé que la sélection sur la CMJR a aussi pour effet de modifier le comportement des porcs, avec pour les porcs à faible CMJR (CMJR-), une moindre consommation alimentaire, une durée d'ingestion réduite et une vitesse d'ingestion élevée ainsi qu'une dépense énergétique liée à l'activité physique inférieure. De plus chez les animaux observés en situation de groupe dans une loge d'élevage, l'activité physique des porcs CMJR- est aussi moins importante et associée à une moindre présence de blessures aux pattes et à la queue ainsi qu'à moins de bursites (épanchement de synovie). Ceci pourrait suggérer un impact plutôt favorable de la sélection pour une moindre CMJR sur l'état de santé et le bien-être des porcs, du fait d'une moindre émergence de maladies de production.

L'objectif du travail est d'analyser les relations entre l'activité physique, qui peut être modifiée par la sélection divergente sur la CMJR, et la susceptibilité des porcs à présenter des troubles de santé, en particulier des troubles locomoteurs (dont des troubles de développement du cartilage de type ostéochondrose). Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet visant à évaluer les relations entre la santé et la génétique dans le cas des maladies de production, en s'appuyant sur une approche multidisciplinaire (comportements, biomarqueurs des troubles locomoteurs), sur des lignées divergentes bien connues, telle que celle de la CMJR. Le protocole expérimental est appliqué à deux groupes de 80 porcs en période croissance-finition, dont la constitution prend en compte de manière équilibrée les deux lignées de sélection (CMJR +, CMJR-), et le niveau d'activité physique, soit spontanée soit augmentée en jouant sur le chemin à parcourir pour recevoir leur aliment. Les animaux seront régulièrement observés et filmés afin de quantifier leur activité physique et leurs boiteries. Des prises de sang seront réalisées à trois reprises afin de quantifier certains biomarqueurs indicateurs du niveau d'inflammation et de troubles des cartilages. Les animaux seront abattus en fin de période de croissance (abattage de porc charcutier conventionnel) et leur os seront prélevés pour qualifier l'état des cartilages.

Le programme expérimental sera mené dans le cadre de la réglementation relatif à la règle des 3 R : réduire, remplacer, raffiner. Ainsi, l'expérimentation visera à limiter le nombre d'animaux à 20 animaux par modalité de traitement et 2 groupes de 80 porcs pour s'assurer d'une représentativité statistique de l'échantillon visant à une interprétation claire des réponses (réduire). La caractérisation de l'impact de l'activité physique sur le risque d'apparition de troubles locomoteurs chez le porc ne peut se faire qu'en observant des animaux dans un cadre expérimental contrôlé (pas de possibilité de remplacement). Il s'agira également d'assurer un suivi quotidien de l'activité alimentaire (grâce à un Distributeur Automatique d'Aliment), via la vérification des fichiers d'enregistrement, par les personnes en charge de l'expérience ou les animaliers formés pour l'expérimentation animale pour détecter un problème de consommation révélatrice d'un trouble de santé (raffiner). Une observation clinique des animaux détectés sera réalisée pour vérifier leur état de santé et appliquer un traitement selon les prescriptions du vétérinaire sanitaire.

2263- Après la naissance, le sevrage constitue la seconde période critique lors de l'élevage du porcelet. C'est une période de stress i) d'un point de vue physiologique et nutritif par le changement d'aliment, ii) comportemental avec la rupture de la relation truie-porcelet et iii) immunitaire avec l'arrêt de la protection immune lactogène maternelle. Le porcelet présente, à la naissance, un tractus digestif stérile qui va être colonisé par la flore de la mère ainsi que par les microorganismes présents dans son environnement. Il existe des corrélations entre la composition de la flore intestinale et la résistance des animaux aux infections. Ce programme vise à étudier l'impact du sevrage précoce sur la mise en place de la flore commensale en relation avec la robustesse des porcelets. Quatre groupes de 12 porcelets (soit un total de 48 porcelets) et leurs mères (n=4) seront produits dans l'unité expérimentale et sevrés à 10j (S10), 21j (S21), 28j (S28) ou 40j (S40). J0 représente la date de naissance et S pour sevrage. S10 est un âge très précoce de sevrage alors que S40 correspondant à un âge physiologique tardif de sevrage. S21 et S28 sont les deux périodes de sevrage souvent rencontrées dans les systèmes d'élevage intensif. On considère donc que séparer les porcelets de leur mère avant 21 ou 28 jours est du sevrage précoce. Les porcelets seront placés dans de petites cases par 3 avec des tapis chauffants. Pour diminuer le stress lié à la séparation, 2 animaliers spécialisés seront dédiés au suivi de ces animaux avec réalisation de caresses et de jeux avec eux. Les animaux seront évalués pour des caractères zootechniques de robustesse et de santé. Des prélèvements de sang seront effectués régulièrement pour des analyses de paramètres immunologiques et de stress et des prélèvements de fèces pour une analyse de la composition la flore commensale. Ainsi, les résultats obtenus permettront de mettre en évidence certaines espèces de bactéries qui pourraient avoir un lien avec la robustesse des porcelets qui serait corrélée avec une stimulation accrue de la réponse immunitaire. Par conséquent, des stratégies nutritionnelles pourront être utilisées dans le but d'influencer qualitativement la composition du microbiote pour stimuler la réponse immunitaire intestinale, augmenter la résistance des porcelets aux infections et diminuer ainsi l'utilisation des antibiotiques. La règle des 3R a été suivie en limitant le nombre maximum d'individus à 48 sans nuire à

l'objectif final de l'analyse du comportement et de l'état de santé des animaux qui doit prendre en compte la variabilité interindividuelle. REDUIRE: Le projet sera réalisé sur 48 porcelets soit 4 groupes de 12. Ces effectifs ont été définis en accord avec les contraintes de l'analyse statistique et la littérature pour permettre une étude conclusive. RAFFINER: Les procédures appliquées seront réalisées avec la plus grande attention. 2 animaliers spécialisés seront dédiés au suivi de ces animaux avec réalisation de caresses et de jeux avec l'animal pour limiter le stress des interventions. REMPLACER: Compte tenu de l'objectif du projet qui vise à réduire l'utilisation des antibiotiques en élevage porc, il est incontournable de travailler sur le modèle porc.

2264- Afin de préparer au mieux la première administration chez l'Homme, des études réglementaires de pharmacocinétique et de toxicocinétique doivent être réalisées chez toutes les espèces utilisées dans les études de sécurité ainsi que dans les modèles animaux utilisés en pharmacologie (ICH M3, S3, S6, S9). Il est ainsi nécessaire de réaliser des études de pharmacocinétiques chez différentes espèces animales (rongeurs et non rongeurs) afin de déterminer l'exposition des animaux au produit, de permettre de définir les doses pouvant être administrées lors des premières études chez l'homme et de sélectionner les formulations permettant une meilleure mise à disposition de la molécule chez l'homme.

L'évaluation des paramètres pharmacocinétiques au cours de ces études, associés à des outils de modélisation, permet d'anticiper les expositions jugées dangereuses en comparaison des effets observés dans les études de toxicologie réglementaires.

Afin de limiter le recours à l'utilisation des animaux de laboratoire, la sélection des molécules testées in vivo est basée sur les résultats obtenus dans des modèles in silico et in vitro d'activité pharmacologique, de métabolisme ou d'absorption. Lors de la réalisation des études de pharmacocinétiques, la diminution des animaux testés passe par l'utilisation de ceux-ci à plusieurs reprises dans la même étude, dans des études différentes mais aussi par la mise en place de méthodes de dosages spécifiques permettant de prélever des volumes sanguins plus faibles contribuant ainsi à une diminution du nombre d'animaux utilisés. Les études sont réalisées par du personnel formé et compétent.

De plus, le contenu de ces études intègre les impératifs éthiques tels que les modalités d'administration et de prélèvement, l'hébergement et l'enrichissement du milieu spécifique pour chaque espèce étudiée mais aussi la prévention de toute douleur, détresse ou inconfort chez l'animal.

Compte tenu des différences inter-espèces observées dans les processus d'absorption, de distribution, du métabolisme et d'élimination, et des espèces utilisées dans les études de sécurité et de pharmacologie, ce projet comprend l'utilisation d'un maximum 4950 souris, 5500 rats, 480 chiens et 180 primates non-humains.

Ce projet permet de préparer les phases cliniques en ajustant au mieux les doses présumées actives chez l'Homme et en évitant celles présumées dangereuses.

2265- La maladie hémorragique virale (VHD ou viral hemorrhagic disease) dans sa forme classique a émergé en 1984 en Chine et est apparue en France durant l'été 1988. Il s'agit d'une hépatite virale du lapin sauvage ou domestique. Due à un calicivirus (nommé RHDV ou Rabbit Hemorrhagic Disease Virus), la maladie est généralement septicémique et touche surtout des lapins adultes ou préadultes. La VHD est enzootique dans les populations de lapins sauvages d'Europe, d'Australie et de Nouvelle-Zélande. Sa transmission a lieu essentiellement par voie oro-fécale et par contact direct.

Elle fait partie des maladies transmissibles des lagomorphes considérées comme majeures du point de vue socio-économique (liste B des maladies notifiables à l'OIE).

Il n'existe aucun traitement contre cette affection. Chez des lapins non vaccinés, cette hépatite virale dans sa forme classique est habituellement responsable de 30 à 90 % de mortalité en région d'épizootie. Après une incubation de 2 à 5 jours, le lapin meurt. Seul le développement de vaccins efficaces a permis de la contrôler rapidement et d'enrayer des pertes économiques importantes de la VHD dans sa forme classique.

En 2010, plusieurs dizaines de déclarations sur le manque d'efficacité des vaccins existants contre la forme classique de la VHD sont parvenues à l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire dans le cadre de la pharmacovigilance. Les mortalités enregistrées dans les élevages touchés varient entre 10 et 30%. Des analyses phylogénétiques ont permis de mettre en évidence l'apparition d'un nouveau variant (nommé RHDV variant 2010) formant un nouveau groupe génétiquement distant des autres calicivirus connus. En 2011 les foyers se sont multipliés dans l'ouest de la France puis cette forme variante de la maladie a rapidement diffusé vers l'Est et a touché les pays voisins (Italie, Belgique). La faune sauvage de lapins de garenne n'est pas épargnée.

Notre laboratoire a développé un vaccin permettant de lutter contre les deux formes de la maladie, il contient d'une part la souche classique inactivée de la VHD et d'autre part la souche variante inactivée de la VHD. Ce vaccin a reçu une autorisation de mise sur le marché délivrée par l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire en 2015.

Notre objectif est désormais de produire et de contrôler des lots commerciaux de vaccin.

Les contraintes biologiques et réglementaires justifiant notre recours à l'expérimentation animale dans le cadre de ce projet sont les

suivantes :

- La méthode de culture du virus : à l'heure actuelle, la répllication du RHDV, nécessaire à la production d'un vaccin inactivé de la VHD (constitution des lots de suspensions virales rentrant dans la formulation du vaccin) ne peut être obtenue que chez des lapins sensibles. En

effet, dans les dernières décennies, tous les essais de multiplication du RHDV en culture cellulaire ou sur oeufs embryonnés de poulet, qui auraient permis de s'affranchir de l'animal pour la production du vaccin inactivé, sont restés infructueux. Pour obtenir du virus RHDV, la maladie doit donc impérativement être reproduite expérimentalement chez des lapins sains et sensibles par inoculation d'un broyat d'organes de lapins infectés. La suspension virale est ensuite préparée à partir de préparations homogénéisées de foies (organe contenant le titre viral le plus élevé) prélevés chez ces lapins inoculés dans les 3 jours suivant l'inoculation (la maladie évoluant sur un mode aigrement aigu ou suraigu, les manifestations cliniques sont généralement très discrètes et limitées aux quelques heures précédant la mort, mais il est alors possible d'euthanasier l'animal de façon anticipée pour des raisons de bien-être animal). Cette méthode de production est celle indiquée par la monographie de la pharmacopée européenne dans le cadre de la préparation d'un vaccin inactivé de la VHD, ainsi que dans le manuel terrestre de l'OIE (Office International des Epizooties).

- Les contrôles réglementaires à effectuer sur l'animal pour libérer des lots de vaccin commerciaux (contrôle d'inactivation et d'efficacité)

Le nombre de lapins nécessaires est de 395 lapins pour l'ensemble des essais.

Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, les mesures suivantes sont appliquées :

- Respect des normes d'hébergement (taille des cages, densité etc.) spécifiées dans la directive 2010 63 UE ;
- Application de conditions d'ambiance en accord avec l'âge et l'espèce (température, éclairage, hygrométrie) ;
- Fourniture d'eau et d'aliment (adapté aux besoins d'entretien ou de croissance des lapins) sans restriction ;
- Manipulation des lapins dans des box isolés prévus à cet effet par du personnel qualifié ;
- Mise en place d'un suivi clinique rapproché par le vétérinaire responsable de l'essai ;
- Mise en place d'une procédure d'évaluation des points limites spécifiques de la maladie hémorragique virale du lapin permettant d'euthanasier les animaux de façon anticipée.

2266- Les tumeurs abdominales (organes, tubes digestif ou péritoine) étaient jusqu'à récemment difficiles à traiter et les chances de survie des patients très faibles.

De nouvelles méthodes de chimiothérapie ont vu le jour et permettent dorénavant d'associer une prise en charge chirurgicale (retrait des tumeurs) avec des traitements appliqués directement dans la cavité abdominale.

Ces traitements locaux permettent de cibler les cellules cancéreuses et offrent de meilleurs résultats que les chimiothérapies intraveineuses pour certaines formes de cancers dit "chimio-résistants".

Notre projet consiste à évaluer différentes molécules anticancéreuses, chez le Porc, dans le cadre de ces méthodes d'application intra-abdominale. L'évaluation portera sur la pharmacocinétique des médicaments, leur toxicité et les éventuels effets-secondaires après quelques jours.

Pour cela, le projet nécessitera l'utilisation de 100 porcs sur 5 ans, permettant d'évaluer 5 traitements innovants contre le cancer. Le nombre d'animaux utilisé pourra être réduit si le nombre de traitements évalué est moindre ou si les résultats obtenus le permettent.

L'utilisation d'animaux ne peut être évitée, car l'évaluation porte à la fois sur des techniques innovantes ET des médicaments anti-cancéreux: il est nécessaire d'étudier l'impact sur l'organisme dans son ensemble. Cependant, de nombreuses phases préliminaires (sélection des molécules thérapeutiques par exemple) ont lieu sur des cultures de cellules in vitro.

Le principal bénéfice attendu est l'amélioration du traitement des cancers abdominaux (cancer colorectal, cancer ovarien, cancer du péritoine...) et l'augmentation du temps de vie des patients atteints.

Durant ce projet, les animaux seront pris en charge de façon à limiter tout stress et à assurer l'absence de douleur. Leurs conditions d'hébergements seront adaptées à leurs besoins (contacts avec les congénères, jeux, confort), et le personnel en charge des soins spécialement formé.

2267- Les infections invasives pulmonaires à champignons sont responsables d'une mortalité pouvant aller jusqu'à 80% chez les patients immunodéprimés malgré les traitements antifongiques (ATF) disponibles actuellement. La porte d'entrée des champignons responsables est le plus souvent pulmonaire. Les traitements ATF donnés par voie intraveineuse sont pourvoyeurs de toxicité et de nombreuses interactions avec les autres traitements que reçoivent les patients, notamment immunosuppresseurs et chimiothérapie anti-cancéreuses. Aussi, une administration des traitements ATF ciblant directement l'organe atteint permettrait d'améliorer à la fois la tolérance des ATF mais aussi le pronostic des patients. Les aérosols sont une voie d'administration qui permet d'atteindre le champignon au site de l'invasion en limitant au maximum la toxicité. Les doses pour la nébulisation nécessaires pour obtenir une efficacité ne sont pas connues chez l'homme et les infections invasives à champignon ont un pronostic trop sévère pour que l'on puisse tester directement chez l'homme l'efficacité des aérosols d'ATF. Or, le modèle d'infection à champignon chez la souris est celui qui se rapproche le plus de l'infection humaine.

Dans ce projet, notre objectif est de mettre au point des modèles d'infections fongiques invasives pulmonaires chez la souris qui permettront de tester ultérieurement l'efficacité des aérosols d'ATF sur les trois principaux champignons responsables d'infections pulmonaires chez les patients immunodéprimés (*Aspergillus* spp, les *Mucorales* et *Scedosporium* spp.). Deux types d'infection vont être testés. Le premier modèle est un modèle d'infection aiguë chez la souris caractérisant une infection chez un patient par inhalation de spores alors que celui-ci est déjà immunodéprimé. Le second modèle est un modèle de réactivation d'infection fongique pulmonaire chez la souris caractérisant une infection qui survient plusieurs jours voire plusieurs semaines après la contamination. Quel que soit le modèle développé, il convient d'immunodéprimer les souris avec des médicaments couramment utilisés chez l'homme pour induire une baisse de l'immunité (corticoïdes, cyclophosphamide) soit en amont, soit en aval de l'infection. Le choix et le temps d'administration de ses immunosuppresseurs doit être évalué au

cours de ce projet. La quantité de champignon à inoculer aux souris par voie intra-trachéale afin d'obtenir une infection devra également être déterminée et 3 inoculum fongiques vont être testés. Le choix du modèle sera déterminé par des tests de survie, par histopathologie pulmonaire mais également par PCR quantitative pour mesurer la charge fongique dans les poumons.

804 souris vont être utilisées pour ce projet. La règle des 3R a été prise en compte dans l'élaboration de ce protocole. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum grâce aux prélèvements et au stockage systématique des poumons à la fin des études de survie qui serviront pour les mises aux points des outils de biologie moléculaire. Le remplacement des animaux est impossible car aucun modèle alternatif d'infection n'existe in vitro permettant d'évaluer l'efficacité à terme de thérapeutiques. Pendant l'expérimentation, le raffinement est pris en compte. En effet, l'inoculation des champignons en intra-trachéal est réalisée chez des souris anesthésiées. De plus, après l'infection, les animaux vigiles sont placés dans un environnement thermostaté, avec libre accès à la nourriture et à l'eau.

2268- Les thérapies médicamenteuses conventionnelles exploitent les propriétés toxiques d'agents anticancéreux. Ils agissent principalement sur les cellules tumorales mais parfois sur les cellules saines, provoquant des effets secondaires responsables de l'arrêt des traitements chez les patients. Depuis quelques années, des stratégies de chimiothérapies ciblant les cellules tumorales ont émergé afin de véhiculer un agent anticancéreux vers la tumeur sous la forme d'un médicament non-toxique, puis de régénérer son activité toxique au niveau de la tumeur. De tels agents sont appelés vecteurs anticancéreux ou médicaments anticancéreux. Ainsi, nous créons des médicaments capables d'activer leur activité toxique uniquement après reconnaissance d'enzymes présentes dans le microenvironnement tumoral. Lors de précédentes études, notre laboratoire a démontré l'activité d'un vecteur anticancéreux in vivo chez la souris. Afin de rendre son activité antitumorale encore plus spécifique et permettre de libérer localement la molécule au niveau de la tumeur, nos partenaires ont enfermé les agents anticancéreux vectorisés dans gouttes sensibles aux ultrasons. A l'aide d'une impulsion d'ultrasons, nous sommes en mesure de faire éclater les gouttes sur une zone extrêmement restreinte afin de libérer le médicament vectorisé. Cette stratégie devrait nous permettre de réduire les effets secondaires des chimiothérapies grâce à un double système de ciblage tumoral : l'impulsion d'ultrasons pour libérer l'agent anticancéreux vectorisés et les enzymes du microenvironnement pour activer ce dernier et restituer un médicament pleinement actif directement au niveau de la zone à traiter.

Nous avons réalisé l'ensemble des expériences in vitro nécessaire à la validation de la preuve de concept. Dans le présent projet nous souhaitons transposer l'étude in vivo afin d'appréhender les bénéfices dans le ciblage thérapeutique des tumeurs apportés par une encapsulation dans des gouttes sensibles aux ultrasons d'agents anticancéreux vectorisés. Cette étude sera composée de 2 procédures expérimentales. Dans la première, nous étudierons la cinétique de biodistribution des gouttes dans les souris puis dans la seconde nous étudierons l'efficacité thérapeutique sur des tumeurs implantées dans des souris. Pour mener à bien cette étude nous serons amenés à utiliser 132 souris (96 pour la première procédure et 36 pour la seconde).

Comme mentionné plus haut, le vecteur anticancéreux a déjà été évalué sur des animaux. Les données recueillies lors de ces précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales. Par une approche statistique (Snedecor et Cochran), la « Règle des 3 R » établie par Russel et Burch, a été prise en compte afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude convaincante qui ne nécessitera pas de reproduire ces expériences. Les conditions d'expérimentation et d'élevage sont optimisées au mieux (groupe de 3 à 4 souris, nid, jouets etc...) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales (raffinement). Compte tenu des avancées de nos travaux in vitro, nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives in vitro. A terme, ces expériences permettront de connaître l'intérêt de l'encapsulation d'agents anticancéreux vectorisés sur leurs capacités thérapeutiques antitumorales.

2269- Ce projet de recherche propose d'évaluer la pathogénicité pulmonaire des fractions fines et ultrafines de polluants atmosphériques particulaires (PM_{2.5} et PM_{0,18}) prélevés en zone urbano-industrielle. Il a pour objectifs (1) de développer des méthodes de prélèvement, d'identification et de caractérisation physico-chimique des particules atmosphériques ultrafines, (2) d'analyser leur bioaccessibilité dans les fluides bronchiques, (3) d'évaluer in vivo, sur des modèles murins, leur toxicité et leur génotoxicité selon des scénarii d'expositions aiguës ou sub-chroniques à des doses réalistes, (4) de comparer ces effets à ceux de particules fines prélevées sur le même site. L'identification de biomarqueurs précoces associés à la toxicité pulmonaire des différentes fractions particulaires se fera, en particulier, par mesure de l'expression des ARNm et des microARN à l'aide de techniques innovantes pangénomiques. Les biomarqueurs ainsi identifiés pourraient être ensuite évalués chez l'homme afin d'étudier leurs potentielles corrélations aux maladies respiratoires environnementales (bronchopneumopathies chroniques, cancer du poumon, etc.).

Au niveau expérimental, un protocole préliminaire permettra de déterminer le mode d'administration des particules pour les protocoles d'expositions aiguës et sub-chroniques, à savoir l'instillation intranasale ou endotrachéale. De manière générale, les conditions d'hébergement, d'élevage et de soins seront optimisées (portoirs ventilés, cycles jour/nuit, enrichissement des cages) afin de familiariser les animaux avec leur nouvel environnement et leur manipulation, de sorte à réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse éventuellement provoquées par la réalisation des instillations et des prélèvements. Lors de l'administration des particules atmosphériques, les souris seront anesthésiées par inhalation d'isoflurane à 2,5 %. La procédure d'administration des particules, puis le réveil effectif des souris feront l'objet d'une surveillance toute particulière. La pertinence du protocole d'exposition à appliquer ultérieurement sera évaluée en mesurant la réponse inflammatoire et l'imprégnation en particules pulmonaire des souris exposées mais également en tenant compte de toute douleur ou souffrance

liée au mode d'instillation (en particulier, irritation, traumatisme ou œdème de la trachée pour les administrations endotrachéales).

Pour les protocoles d'expositions aiguës et sub-chroniques ultérieurs, une attention particulière sera portée à l'apparition de signes de douleur chez les animaux : altérations provoquées par la situation expérimentale, modifications comportementales, indices physiologiques et signes de déficience respiratoire. Une grille de notation sera régulièrement remplie pour chaque animal tout au long des procédures expérimentales. Tout animal manifestant une déficience respiratoire avérée, une perte de poids dépassant 20% ou l'apparition d'un traumatisme auto-induit persistant fera l'objet d'une euthanasie anticipée.

Au total, la réalisation de ce projet nécessitera l'utilisation de 190 souris mâles de type BALB/c.

2270- Les thérapies médicamenteuses conventionnelles exploitent les propriétés toxiques d'agents anticancéreux. Ils agissent principalement sur les cellules tumorales mais parfois sur les cellules saines, provoquant des effets secondaires responsables de l'arrêt des traitements chez les patients. Depuis quelques années, des stratégies de chimiothérapies ciblant les cellules tumorales ont émergé afin de véhiculer un agent anticancéreux vers la tumeur sous la forme d'un médicament non-toxique, puis de régénérer son activité toxique au niveau de la tumeur. De tels agents sont appelés vecteurs anticancéreux ou médicaments anticancéreux. Ainsi, nous créons des médicaments capables d'activer leur activité toxique uniquement après reconnaissance d'enzymes présentes dans le microenvironnement tumoral. Lors de précédentes études, notre laboratoire a démontré l'activité d'une nouvelle génération de vecteurs anticancéreux in vivo chez la souris. Ces vecteurs sont capables de faire régresser efficacement et durablement des tumeurs du pancréas, du sein ou encore du larynx.

Dans le présent projet, nous souhaitons utiliser ces mêmes vecteurs dans la lutte contre les cancers de la peau non mélanocytaires. Ces cancers sont extrêmement fréquents chez le sujet âgé et leur incidence augmente fortement avec l'espérance de vie. Les traitements chimiothérapeutiques existants sont peu efficaces pour ce type de cancer. Le traitement de référence reste la chirurgie qui laisse des cicatrices importantes et qui n'est pas suffisante lorsque le cancer atteint le stade métastatique. Il est donc important de rechercher de nouvelles alternatives chimiothérapeutiques pour ces cancers cutanés.

Comme mentionné plus haut, les vecteurs anticancéreux ont déjà été évalués sur des animaux. Les données recueillies lors de ces précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les protocoles expérimentaux. Un total de 216 souris sera nécessaire pour mener à bien l'ensemble du projet. La « Règle des 3 R » établie par Russel et Burch, a été prise en compte afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude interprétable sur le plan statistique. La notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation et d'élevage qui sont optimisées (groupe de 3 à 4 souris, nid, enrichissement, sédation et/ou analgésie pour toute manipulation douloureuse ou stressante ...) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales. L'étude in vitro ayant été menée, il est à ce jour indispensable de confronter ces résultats sur l'individu dans sa globalité. Cette approche ne pouvant pas se faire chez l'homme, ces expériences nécessitent obligatoirement l'usage de modèles animaux. Nous souhaitons modéliser, chez la souris, le développement des cancers de la peau par injections de kératinocytes malins en sous-cutané. Ceci va nous permettre d'étudier les cinétiques de croissance des tumeurs primaires et des métastases puis d'évaluer le potentiel thérapeutique d'agents anticancéreux ciblés sur ces tumeurs.

A terme, les résultats de cette étude nous permettront d'envisager de nouvelles alternatives chimiothérapeutiques à la chirurgie pour le traitement des cancers cutanés ne faisant pas partie des mélanomes.

2271- L'aliment des volailles pondeuses est conçu pour apporter les nutriments nécessaires aux besoins d'entretien et de production. Il se définit par un mélange de matières premières, additifs et minéraux. L'objectif de ce projet est d'évaluer les différents constituants des aliments d'une part, et d'autre part d'identifier les besoins des volailles pondeuses en fonction de leur stade de développement. Les volailles pondeuses sont classées en 2 catégories : les poules pondeuses produisant des œufs à destination de la consommation humaine et les poules reproductrices produisant des œufs à couver destinés à être incubés pour donner des poussins. Ces 2 catégories étant sélectionnées différemment, leurs besoins nutritionnels sont différents et doivent donc être évalués séparément. Nous avons développé 2 modèles d'études : un sur poules pondeuses et un sur poules reproductrices de type chair. Au total, 576 animaux sont élevés en cages afin de pouvoir étudier les différentes parties d'un cycle de ponte à savoir : fin d'élevage, début de ponte, pic de ponte et fin de ponte. Les animaux sont logés dans des cages aux normes expérimentales, jusqu'à 3 par cage. Ce logement permet d'avoir des modules plus petits avec moins d'animaux et nous assure la maîtrise totale de l'ingestion du fait de l'absence de litière. Afin d'évaluer l'impact de la nutrition, les performances de ponte (taux de ponte, poids des œufs) et la consommation d'aliment sont relevés chaque semaine. Le poids des poules est également un facteur important évalué régulièrement en fonction de la thématique. D'autres critères, tels que des paramètres sanguins, la composition corporelle ou encore la composition de certains tissus peuvent être analysés (15 animaux par traitement par type de prélèvement sont concernés, les animaux étant gardés en vie). Le nombre de prises de sang est limité à 6 par animal au maximum. 6 traitements maximum sont comparés, ce qui permet d'avoir une puissance statistique optimale avec un minimum d'animaux (36 à 72 animaux par traitement). Afin d'améliorer le bien-être des poules, les cages ont été enrichies avec des ficelles accrochées au plafond de la cage et les animaux peuvent entrer en contact (olfactif, visuel, ...) les uns avec les autres.

Les 2 catégories de volailles pondeuses sont conduites avec une alimentation à volonté ou sub-limitante pour les poules pondeuses, et un rationnement géré en fonction du poids vif pour les poules reproductrices de type chair

2272- La radiothérapie est un traitement locorégional des cancers, consistant à utiliser des rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses. Actuellement, plus de 50% des patients atteints d'un cancer sont traités par radiothérapie à

une étape de leur parcours de soin. Malheureusement, les rayons nécessaires pour le traitement altèrent également les tissus sains qu'ils traversent.

Les nanoparticules (NPs) sont des objets de diamètre compris entre 1 et 100 nm. Les nanoparticules de 50 nm qui vont être testées sont connues pour générer d'importantes quantités d'électrons lorsqu'elles sont atteintes par les rayonnements ionisants ce qui augmentera l'effet de la radiothérapie à l'intérieur de la tumeur, et ce, sans augmenter les dommages aux tissus sains. Avant de procéder aux essais d'efficacité des NPs, l'objectif de ce projet est d'évaluer l'impact de la présence de ces nanoparticules sur l'évolution de la greffe de cellules tumorales sans rayonnements ionisants. A cette fin, des quantités variables de nanoparticules seront incorporées à une quantité définie de cellules tumorales. Celles-ci seront ensuite injectées en sous-cutané sur le flanc droit des souris. Le même nombre de cellules, mais cette fois sans nanoparticules, sera injecté sur le flanc gauche de chaque animal à titre de contrôle. Après le sacrifice des animaux, les tumeurs seront prélevées afin de déterminer la quantité de nanoparticules encore présente afin d'en apprécier la biodisponibilité.

Dans ce projet, les lignées cellulaires cancéreuses d'origine murine (cancer de la mamelle, du côlon et mélanome) seront utilisées ce qui permet de travailler avec des souris immunocompétentes afin d'obtenir des résultats qui sont plus prédictifs de ce qui se produirait sur un patient.

Si la prise de greffe et la biodisponibilité des nanoparticules dans les tumeurs sont démontrées, nous bénéficierons alors de modèles de choix qui permettront de réaliser ultérieurement des études d'efficacité antitumorale du produit nanoparticulaire activé par la radiothérapie, afin de préparer de futurs essais cliniques.

Pour ce projet, 6 lots de 5 animaux soit 30 souris au maximum par type de cellule tumorale, soit 90 souris pour 3 modèles, sur 2 ans, pourront être nécessaires. Nous prévoyons de reproduire la procédure en modifiant les concentrations cellulaires tumorales dans l'hypothèse où nos estimations initiales de concentration cellulaires se révéleraient insuffisantes et de ce fait nous envisageons de pouvoir utiliser un nombre de 180 animaux pour ce projet.

Les animaux seront suivis de manière quotidienne et la croissance tumorale ainsi que leur état de santé seront évalués 2 à 3 fois par semaine. Les animaux seront euthanasiés dès l'apparition de signes indiquant une dégradation de leur état de santé.

2273- La présente demande est une extension d'autorisation d'un projet: Etude des stratégies de préservation de génétique par la voie femelle : préservation et restauration de la fertilité par cryoconservation du tissu ovarien.

Chez de jeunes patientes atteintes de cancer, la mise en place de traitements anti-cancéreux peut entraîner une stérilité. La préservation de la fertilité avant la mise en place de ces traitements est aujourd'hui possible grâce à la cryoconservation du tissu ovarien puis à la greffe de ce tissu une fois la patiente guérie et adulte. Cette même approche peut être également proposée pour préserver la génétique précieuse d'espèces menacées d'extinction et de races domestiques à petits effectifs. En effet le cortex ovarien contient une importante réserve de gamètes, présents sous forme de follicules primordiaux. Différentes méthodologies de cryoconservation et de greffes ont été étudiées et comparées chez la brebis pour estimer la viabilité tissulaire après cryoconservation. Dans ce projet, la brebis constitue un excellent modèle d'étude de la folliculogenèse et des stratégies d'autogreffes de tissu ovarien pour d'éventuelles transpositions chez la femme. Les outils et connaissances développés peuvent donc être utilisés afin de déterminer le protocole optimal de prélèvement et de cryoconservation (congélation vs. vitrification) et de le proposer comme outil de préservation de la fertilité chez la femme ainsi que pour préserver la génétique d'espèces domestiques de races locales à petits effectifs menacées de disparition ou pour la faune sauvage menacée (ongulés).

2274- Le présent formulaire concerne une continuité d'expérimentation sur la brebis. En effet les autogreffes déjà réalisées après cryoconservation chez les agnelles ont permis la production d'embryons à partir d'ovocytes collectés sur différents types de greffons ovariens. Notre demande concerne une expérience de transfert embryonnaire sur mère porteuse afin de valider la viabilité des embryons produits et de la comparer à celle d'embryons de référence (embryons produits in vivo et cryoconservés). Ces transferts embryonnaires concernent 25 brebis adultes.

Remplacement: Il n'existe pas d'approches alternatives au transfert embryonnaire pour déterminer la compétence au développement d'un embryon (capacité intrinsèque de l'embryon à s'implanter, à former une unité foeto-placentaire, se développer au cours d'une gestation normale et enfin permettre la naissance d'un individu sain).

Réduction du nombre d'animaux: Le transfert couplé d'embryons (2 embryons de 2 différents phénotypes par femelle receveuse synchronisée) chez cette espèce polyovulante permettra de réduire le nombre de receveuses utilisées tout en permettant de comparer la viabilité des embryons issus de greffes et produits in vitro (phénotype romanov) vs. contrôle produits in vivo (phénotype lacaine).

Raffinement: Afin de minimiser les conséquences du transfert embryonnaire, une chirurgie de type mini-invasive est réalisée et une prise en charge de la douleur est réalisée systématiquement. L'enrichissement du milieu des animaux concerne la conduite d'élevage en groupe (espèce grégaire) et sur paille.

2275- L'objectif de ce projet est de concevoir, expérimenter et évaluer des systèmes d'élevages herbagers biologiques produisant de la viande à l'herbe, en combinant de manière optimale un niveau élevé de productivité pondérale animale (kg de viande produite par mère et par hectare), un faible niveau d'intrants en concentrés et en médicaments de synthèse et une faible empreinte environnementale (réduction des pollutions et préservation de la biodiversité). En particulier, nous chercherons à valoriser la mixité d'espèces animales (ovins et bovins allaitant) pour augmenter l'efficacité des systèmes herbagers tout en limitant les risques pour l'environnement et la santé animale. Les deux questions de recherche identifiées sont les suivantes : 'Comment produire de la viande à partir de l'herbe?' et 'Quels avantages agro-écologiques à la mixité

d'espèces?'. Afin de répondre à ces questions, nous mettons en place une expérimentation pluridisciplinaire à l'échelle du système d'élevage. Pour cela, 3 systèmes d'élevage allaitant herbagers seront évalués en fonction de leurs performances techniques, économiques et environnementales, en fonction de la charge de travail et de la santé animale par une approche multicritère : un système d'élevage mixte ovin/bovin (14 vaches et 65 brebis) et deux systèmes d'élevage spécialisés, l'un ovin (156 brebis), l'autre bovin (24 vaches). Les animaux seront soumis à différents types de prélèvements durant la période d'expérimentation : prélèvements vaginaux (écouvillons), castration, prélèvements sanguins, prélèvements de fèces et prélèvements de tissu adipeux (adipocytes). À noter que ces 3 systèmes seront conduits en Agriculture Biologique.

Ce projet s'attache à respecter la règle des 3R :

- Remplacement : Malheureusement il n'existe aucune méthode alternative permettant de traiter ces questions.
- Réduction : 38 vaches allaitantes et 221 brebis allaitantes seront utilisées dans ce projet. Ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour permettre l'obtention de résultats statistiquement fiables. Des comparaisons statistiques étant prévues entre les 3 systèmes, les effectifs ont été calculés de manière à contenir le même nombre d'UGB (Unités Gros Bovins) chacun.
- Raffinement : La conduite en Agriculture Biologique ainsi que l'enrichissement du milieu de vie des animaux devrait permettre de leur assurer des conditions de vie optimales. Une évaluation du bien-être animal selon la méthode Welfare Quality® est prévue 2 fois par an pour chacun des systèmes

2276- La myopathie némaline (MN) est une maladie neuromusculaire rare représentant la forme la plus répandue de myopathie congénitale. Elle est caractérisée par une faiblesse musculaire et par la présence de structures en forme de bâtonnets au sein de la fibre musculaire squelettique. Elle varie d'une forme sévère présente à la naissance et souvent létale à une forme progressive d'apparition tardive. A ce jour, dix gènes ont été associés à la MN, la majorité codant pour des protéines du filament fin liées au sarcomère. Une atrophie musculaire et une altération de la fonction musculaire intrinsèque sont impliquées dans la faiblesse musculaire. A ce jour, aucun traitement n'est disponible. De manière intéressante, l'utilisation d'un agent pharmacologique (i.e., Tirasemtiv) permettant d'augmenter la sensibilité au calcium a pour conséquence d'améliorer la production de force de fibres musculaires de patients atteints de MN. Aussi, il a été récemment observé qu'une complémentation alimentaire en L-tyrosine pouvait avoir des effets bénéfiques sur la fonction musculaire chez des patients atteints de MN mais également chez un modèle murin reproduisant une forme sévère de la maladie. Néanmoins, les conséquences métaboliques, anatomiques et fonctionnelles à l'origine de ces améliorations de la fonction musculaire restent à être déterminées.

Ce projet porte sur la caractérisation phénotypique de deux approches thérapeutiques sur la base d'investigations conduites in vivo chez plusieurs modèles murins portant des mutations dans le gène ACTA1 (mutations His40Tyr et Asp286Gly), dans le gène TPM3 (mutation Met9Arg) ou déficients pour le gène KBTBD13 (kbtbd13-KO), NEB (cNEB-KO) ou LMOD3 (modèles Lmod3PB/PB et LMOD3-KO). Ces modèles animaux sont pertinents car ils couvrent l'ensemble du spectre clinique de cette pathologie.

Les animaux seront hébergés en groupe dans des cages (température maintenue à 22°C ; cycle imposé de 12 h jour/nuit) dont le milieu sera enrichi avec du coton et recevront de l'eau et de la nourriture ad libitum. La litière sera changée aussi souvent que nécessaire afin de maintenir les animaux au propre et au sec. Les expérimentations seront réalisées à l'aide d'un dispositif expérimental permettant une exploration totalement non-invasive de la fonction musculaire chez des souris contrôles et transgéniques (âgées au minimum de 12 à 16 semaines) dans des conditions physiologiques in vivo. Ce dispositif permettra d'obtenir des informations relatives à la performance mécanique (force), au métabolisme énergétique et à l'anatomie grâce aux techniques de résonance magnétique nucléaire. Ces expérimentations seront répétées sur les mêmes animaux permettant ainsi un suivi longitudinal in vivo. Ce dispositif permet ainsi de réduire de manière drastique le nombre d'animaux utilisés (i.e. en accord avec la règle des 3R). Les animaux seront maintenus anesthésiés et la température corporelle et la respiration seront contrôlées tout au long des expérimentations.

Les animaux seront testés avant et après une exposition aiguë (dose unique) ou chronique à l'un des deux agents thérapeutiques. L'administration aiguë sera réalisée par injection péritonéale ou par gavage. Les effets chroniques du Tirasemtiv et de la L-Tyrosine seront évalués après administration, respectivement, via la nourriture (pendant 12-18 semaines) ou via l'eau de biberon (pendant 4-8 semaines) ou, pour les deux agents, par l'intermédiaire d'une mini-pompe osmotique implantée sous la peau. Le placement de la mini-pompe nécessite une chirurgie qui sera effectuée sous anesthésie générale. Les animaux seront placés sur une couverture chauffante au cours de la procédure. Un anti-inflammatoire sera injecté avant la chirurgie et le comportement de chaque animal sera observé après réveil.

Pour évaluer les effets aigus, l'expérimentation sera réalisée en étude croisée (chaque souris recevant le placebo et l'agent thérapeutique de manière aléatoire à 7 jours d'intervalle) et permettra ainsi de réduire de moitié le nombre de souris utilisées. Pour évaluer les effets chroniques, l'étude sera composée de deux lots (traitées vs. non-traitées) et de deux groupes par lot (saines contrôles vs. transgéniques). La taille de l'échantillon pour l'administration aiguë de chaque agent thérapeutique (i.e., 10 souris) et pour l'administration chronique de chaque agent thérapeutique (i.e. 15 souris) a été déterminée à l'aide d'une analyse statistique prévoyant respectivement une augmentation de 10% et 20% de la force maximale tétanique chez les souris transgéniques traitées. Ainsi, pour l'ensemble des protocoles, au total 1120 souris seront utilisées.

Ce projet permettra de mettre en évidence les conséquences physiologiques d'une administration aiguë et chronique de ces deux stratégies thérapeutiques sur la fonction musculaire squelettique.

2277- Les protocoles décrits visent à étudier les mécanismes pathologiques de la maladie d'Alzheimer et de déterminer l'impact de facteurs modulateurs sur ces mécanismes. Ces études font appel à des modèles reproduisant les différentes lésions/anomalies retrouvées dans le cerveau des patients atteints par cette affection neurodégénérative ou processus considérés comme étant instrumentaux dans cette maladie. Les modèles sont générés par différentes approches transgéniques et virales. Ces expériences ont pour but de mieux comprendre la pathologie, d'en extraire des voies de modulation potentielles et in fine de trouver de nouvelles approches thérapeutiques. Ces expériences en voulant corréliser approches moléculaires et cognition doivent se faire dans des modèles appropriés in vivo. Notre projet répond aux exigences des 3R, à savoir remplacement, réduction et raffinement. Le nombre total d'animaux concernant les procédures de notre unité sur les 5 ans à venir est estimé à 8261 (7786 souris et 475 rats). Cette utilisation maximise les données obtenues de chaque animal, ce qui peut limiter ou éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, et ce, sans pour autant compromettre le bien-être animal. Les animaux seront suivis précisément pour chaque protocole, pour lesquels des points limites adaptés ont été définis. Toute souffrance, angoisse ou comportement inhabituel sera pris en charge par des approches appropriées. Les animaux présentant un des points limite spécifié pour chaque approche expérimentale sera sacrifié dans une salle dédiée; le tout en lien avec le responsable du bien être animal.

2278- Ce projet encadre l'utilisation d'animaux pour la formation continue du personnel effectuée en interne. Cette formation est obligatoire et est complémentaire à la formation spécialisée en expérimentation animale qui est un pré-requis. La formation interne permet d'acquérir les compétences nécessaires pour effectuer des gestes techniques auprès de personnes déjà formées (formation par des pairs). L'entraînement permet de s'assurer que le geste est toujours acquis. Le personnel est régulièrement évalué pour s'assurer qu'il maîtrise le geste technique. La fréquence des évaluations dépendra de la complexité du geste.

La formation et l'entraînement permettent d'assurer la compétence du personnel. Seules des personnes formées et compétentes peuvent participer aux expériences, entretenir les animaux ainsi qu'être responsables de la mise à mort. De la compétence du personnel va dépendre la bonne réalisation de l'étude et permettre ainsi d'obtenir un résultat fiable en utilisant le moins d'animaux possible. La formation et les évaluations sont tracées dans le livret de compétence de la personne formée.

Ce protocole s'applique à toute utilisation de souris, de rats, de gerbilles ou de hamsters permettant d'assurer la formation continue du personnel pour des gestes tels que par exemple la contention des animaux, les techniques d'administrations et de prélèvements, la chirurgie, l'anesthésie et l'euthanasie.

L'utilisation d'animaux n'est réalisée que s'il n'est pas possible d'effectuer la formation par des méthodes alternatives. Ces formations et entraînements s'appliquent :

- à une technique existante,

- à une mise au point d'une nouvelle technique déjà approuvée dans un autre projet éthique.

Lorsque le geste technique est susceptible d'engendrer une douleur ou souffrance des anesthésiques et/ou des analgésiques seront administrés. Dans le cas de formations chirurgicales des soins spécifiques seront apportés aux animaux. La formation est encadrée par une personne compétente au geste enseigné et/ou par un vétérinaire. La bonne acquisition du geste est ensuite évaluée par un pair compétent.

Les animaux utilisés seront préférentiellement des animaux utilisés au préalable dans d'autres projets pour lesquels la sévérité subie auparavant n'a pas été sévère. De plus, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés pour évaluer les compétences du personnel, les évaluations seront préférentiellement réalisées lors des études. Le nombre total d'animaux utilisés pour les 5 ans du projet est de 1600 animaux (soit, par an, 200 souris, 100 rats, 10 hamsters et 10 gerbilles). Le nombre d'animaux ainsi prévu permet de former et de maintenir le niveau de compétence de l'ensemble du personnel.

2279- L'infection par le virus de la dengue (DENV) provoque plus de 500 000 cas par an, pour lesquelles l'hospitalisation est nécessaire. A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement contre ce virus et aucun vaccin n'est encore autorisé. Il est donc urgent et crucial de développer des traitements thérapeutiques, ce qui requiert une meilleure connaissance de l'infection par DENV et de sa pathogénèse. Ce virus est transmis à l'Homme par piqûre de moustiques. Le virus de la dengue infecte, initialement, les cellules résidentes de la peau, puis se propage dans le reste de l'organisme. Dans les formes sévères, l'infection conduit à des hémorragies et un syndrome de choc, qui est, en grande partie, attribuable à la première ligne de défense immunitaire de l'hôte, appelée la réponse innée. Les cellules dendritiques plasmacytoides (pDCs) sont des cellules de l'immunité innée qui ont un rôle clé pour contrer les infections. En effet, elles détectent les composants viraux et, en réponse, sécrètent des molécules antivirales, telles que l'interféron.

Notre projet vise à déterminer le rôle des pDCs au cours de l'infection par DENV. Les méthodes d'étude in vitro ne permettent pas d'examiner la contribution de la réponse innée dans la régulation l'immunité de l'hôte et donc le contrôle de l'infection. Afin de comprendre l'importance des pDCs dans la réponse immunitaire contre DENV, il est donc nécessaire d'utiliser un modèle animal comprenant les différents acteurs du système immunitaire. Ainsi, seule l'étude de modèle in vivo permet de comprendre l'importance des pDCs, intégrée dans la réponse immunitaire, contre DENV.

Le nombre total des souris prévu pour la réalisation de ce projet est de 1252. Ce nombre inclut un groupe de souris génétiquement modifiées permettant de définir la contribution de pDCs (souris déficientes ou non pour la réponse immunitaires réalisée par les pDCs), ainsi que des groupes contrôles nécessaire pour la comparaison, et donc l'interprétation des résultats. Autant que possible, et par mesure de remplacement, nous favoriserons l'étude de la réponse cellulaire des pDCs par des expériences in vitro utilisant des cellules isolées, plutôt que des expériences sur l'animal. Le nombre de souris

utilisées, a été réduit au maximum tout en permettant des analyses statistiques (test Anova). Les études ont été conçues conformément au principe de raffinement, à savoir le minimum de manipulations des souris sera réalisé et un plan de surveillance et de traitement de souffrance des animaux sera mis en œuvre. Notamment, la manipulation des souris se limitera à l'injection d'anesthésiant, l'infection et l'injection d'anticorps ou de cellules pour certains groupes d'animaux, suivie de l'euthanasie après un intervalle de temps réduit. De plus, selon notre expérience et d'autres études, l'infection par DENV dans ces modèles ne provoque pas de souffrance ou douleur observable.

2280- Notre projet de recherche vise à améliorer la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les maladies chroniques développées par les populations inactives physiquement (i.e. diabète de type 2, cancer). Notre projet de recherche se focalise sur l'insulino-résistance et l'hyperglycémie chronique qui apparaît à long terme en réponse à une diminution drastique du niveau d'activité physique. Il s'intéresse plus particulièrement au rôle que pourraient jouer l'accumulation musculaire de céramides et de fer dans le développement de l'insulino-résistance. Pour atteindre ces objectifs, nous ne pouvons qu'utiliser des modèles *in vivo* où des souris sont traitées ou non avec de la myriocine (i.e. un inhibiteur de la synthèse de novo de céramides) ou de l' α -GOS (i.e. complément alimentaire anti-inflammatoire développé par la société Nutrinov). Le choix d'utiliser de la myriocine se justifie par son effet inhibiteur sur la synthèse des céramides, ces derniers étant reconnus pour induire une altération de l'insulino-sensibilité musculaire et hépatique. Le choix d'utiliser de l' α -GOS se justifie quant à lui par ses propriétés anti-inflammatoires, l'inflammation étant reconnue pour stimuler l'hepcidine, un peptide favorisant la sequestration cellulaire du fer.

Ce modèle d'inactivité physique chez le rongeur est actuellement le plus proche des niveaux d'inactivité physique observés chez les populations au style de vie sédentaire. Cette approche permet d'induire une brusque réduction de niveau d'activité physique permettant d'explorer les effets physiologiques à court terme et à long terme de l'inactivité physique comme le développement de l'insulino-résistance. Il est important de souligner que les animaux conservent une activité ambulatoire dans ce modèle.

40 souris C57/BL6 sont prévues pour ce protocole. Les cohortes sont constituées de 10 animaux par groupe (4 groupes : contrôle, inactifs, traités avec de la myriocine, traités avec de l' α -GOS) afin d'obtenir un nombre de sujets suffisants pour juger du caractère significatif des résultats. La taille de l'échantillonnage a été définie à partir du Sample size test, ceux qui correspondent à un échantillonnage de $n=10$. Ce protocole expérimental permettra de mettre en évidence de nouveaux mécanismes cellulaires et moléculaires se produisant à long terme en réponse à l'inactivité physique. Ces recherches permettront également de proposer de potentiels nouveaux moyens de prévention et /ou de traitements (administration de substances pharmacologiques) ouvrant donc des perspectives thérapeutiques innovantes.

Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R. Ainsi, pour limiter les effets délétères de l'isolement social, les animaux bénéficieront d'un enrichissement de leur environnement comme des tubes PVC ou du coton pour la nidation (Raffinement). De plus, le nombre d'animaux est choisi en fonction du nombre minimum nécessaire pour valider les données obtenus à la fin de la procédure (Réduction). Enfin, par l'intermédiaire de ce protocole expérimental, nous pourrions déterminer de changements physiologiques qui prennent en compte l'ensemble de fonctions du vivant, donc seulement observables dans un modèle *in vivo* (Remplacement).

2281- La thérapie photodynamique (PDT) est un traitement employé en cancérologie pour éradiquer les tumeurs de petite taille accessibles à la lumière. Le principe repose sur l'activation, en présence d'oxygène et de lumière, d'une molécule appelée photosensibilisateur (PS) qui se localise préférentiellement dans la tumeur. La méso-tétra-(hydroxyphényl)chlorine (mTHPC) connue sous le nom Foscan® est un PS approuvé en clinique pour le traitement alternatif à la chirurgie des tumeurs des voies aéro-digestives supérieures. Le problème majeur de la PDT réside dans la sélectivité modérée du PS pour les cellules cancéreuses, ce qui entraîne de sérieux effets secondaires au niveau des tissus sains en particulier la photosensibilisation cutanée. Pour pallier ces conséquences et améliorer la distribution du PS dans les tumeurs, l'utilisation de mTHPC encapsulée dans des nanovecteurs a été envisagée. Plusieurs types de nanovecteurs chargés de mTHPC sont en cours d'étude pour déterminer leur pharmacocinétique et leur biodistribution chez la souris porteuse de tumeurs humaine (projet apafis # 1353). Ce projet est en continuité avec ces études.

Le but de ce projet est de déterminer l'effet antitumoral de la PDT utilisant ces PS nanovectorisés à base de mTHPC. Il consiste à implanter une tumeur sous cutanée chez l'animal puis à traiter cette tumeur par une irradiation lumineuse localisée à un temps déterminé après l'injection intraveineuse du PS. Le suivi de la croissance tumorale permet de comparer les animaux traités aux animaux non irradiés. Les animaux sont mis à morts à la fin de la procédure ou lorsque le volume de la tumeur atteint le volume éthique de 1 cm³.

Avantages : La PDT est un traitement non invasif et peu morbide. La mesure de la croissance tumorale est une procédure simple, indolore provoquant un minimum de stress.

Domages : les gestes invasifs consistent en l'injection sous cutanée des cellules cancéreuses pour produire la tumeur sur le flanc de la souris et en l'injection intraveineuse des PS. La PDT peut produire localement une nécrose cutanée à l'emplacement de la tumeur et donc une douleur modérée.

Type d'animal : souris immunodéprimée « nude » permettant l'implantation d'une tumeur d'origine humaine.

Nombre d'animaux : les groupes seront constitués de 8 animaux maximum et une ou deux concentrations de PS seront étudiées. Ce qui donne au maximum dix groupes témoins sans PDT et 40 groupes avec PDT (dont 8 groupes témoins avec le PS de référence) et porte le nombre d'animaux à 400 souris maximum.

Remplacement : des études préliminaires sur cellules cancéreuses en culture sont effectuées. Elles permettent de comparer les nouveaux PS au PS de référence et d'ajuster in vivo certaines conditions de traitement.

Réduction : Pour l'analyse statistique, on adoptera une démarche séquentielle. Les groupes seront composés au départ d'un minimum de 4 animaux (nombre souvent suffisant pour les groupes témoins). On rajoutera 1 à 4 animaux par groupe si nécessaire. Deux concentrations de PS ne seront pas systématiquement étudiées. Il en est de même pour les conditions d'irradiation (4 conditions prévues mais qui ne seront pas systématiques)

Raffinement : L'ensemble des expérimentations, excepté la mesure du volume tumoral, est effectué sous anesthésie gazeuse. Dès l'injection du PS, pendant et après (durant 3 jours) l'irradiation lumineuse l'animal est protégé de la lumière. Immédiatement après PDT, un traitement antalgique est systématiquement appliqué pendant 3 jours.

2282- Dans le cadre de développement de méthode ou de validation de procédés, il est nécessaire de faire des prélèvements « témoins » sur les animaux. Ces prélèvements servent de référence, de base ou de « blancs » dans ces différentes méthodes.

Les prélèvements concernés sont les suivants : prélèvement sanguin, biopsie cutanée, prélèvement urinaire, prélèvement de moëlle osseuse, ponction splénique, ponction des nœuds lymphatiques, lavage broncho-alvéolaire, écouvillonnages nasal, oral, rectal, vaginal et oculaire.

Pour chaque procédure, des suivis cliniques réguliers des animaux seront réalisés. Des points limites adaptés seront définis et appliqués de manière à éviter toute douleur, souffrance ou angoisse des animaux.

Le nombre d'animaux concernés par ce projet sera au maximum de 4 725 sur 5 ans. Les espèces pouvant être sélectionnées pour les études sont des rongeurs et des carnivores domestiques.

2283- L'aquaculture française représente un secteur économique important. La France est l'un des principaux producteurs de truites arc-en-ciel en Europe avec une production de 35 000 tonnes et un chiffre d'affaires de 118 millions d'euros par an. Les virus sont responsables des maladies piscicoles les plus importantes. Ils induisent des pertes économiques sévères chez les producteurs de truites arc-en-ciel. Il est donc urgent de mettre au point des méthodes efficaces pour lutter contre ces agents pathogènes. Aujourd'hui, la vaccination constitue la méthode de prophylaxie sanitaire la plus efficace contre les maladies virales. Ce projet a pour finalité de mieux définir les facteurs de virulence de plusieurs virus reconnus comme majeurs par l'Union Européenne et de développer des stratégies vaccinales efficaces et sans danger.

L'étude des maladies infectieuses des poissons repose sur la caractérisation de l'agent pathogène et de ses interactions avec l'hôte, analysées par une combinaison d'approches menées in vitro en culture cellulaire et in vivo chez l'animal. La complexité des mécanismes engagés dans les relations hôte-pathogène nécessite la reproduction expérimentale des maladies. Cela permet d'étudier les effets cliniques et la virulence de nos virus, d'établir pour cette virulence des critères d'appréciation quantitative et de pouvoir ainsi comparer les souches émergentes de même espèce qui affectent les élevages. C'est sur le même principe que sont réalisés les essais vaccinaux impliquant l'appréciation précise des effets protecteurs induits par les vaccins. Nous avons donc développé des modèles d'infections par immersion et/ou injection sur de très jeunes alevins (stade le plus sensibles aux infections virales). Ces modèles ont été rigoureusement standardisés et peuvent être de ce fait employés avec des économies de moyens en matériel et en animaux, répondant ainsi aux exigences de réduction de leur utilisation. Les conditions d'hébergement des poissons prennent en compte leur bien-être : température et oxygénation de l'eau, circulation d'eau leur permettant de nager correctement, respect des densités d'animaux par aquarium... Nous étudions des virus largement représentés dans les élevages français (rhabdovirus, alphavirus...) en appliquant des protocoles qui permettent d'étudier leur voie d'entrée, leur virulence et aussi de valider des vaccins potentiels. L'intérêt de la balnéation est d'assurer une infection expérimentale dans les conditions les plus proches de l'infection naturelle. Les infections sont réalisées par injection lorsqu'il est important de contrôler précisément la dose d'agent pathogène administrée à chaque poisson et d'assurer la reproductibilité du modèle. Les protocoles ainsi définis peuvent être associés à des traitements vaccinaux ou immunisants et/ou à des prélèvements de matériel biologique réalisés après euthanasie des animaux pour caractérisation au laboratoire.

L'estimation annuelle de l'emploi de truites et de poissons zèbres pour ce vaste projet est de 5000 poissons. Le nombre de poissons par groupe est de 50 pour les infections par bain et de 30 pour les infections par injection. Il a été calculé afin de prendre en considération la variabilité génétique généralement observée sur ce type de modèle animal et la très petite taille des alevins (1 à 5 cm) afin d'effectuer les prélèvements nécessaires et de valoriser scientifiquement les résultats.

2284- La barrière hémato-encéphalique (BHE) représente un ensemble de structures séparant le compartiment sanguin du système nerveux central (SNC), et plus précisément le liquide céphalorachidien (LCR) et le liquide extracellulaire du parenchyme cérébral. Ses rôles sont multiples. De manière schématique, elle permet tout d'abord d'assurer le maintien de l'homéostasie du tissu cérébral en régulant de manière sélective, notamment par le biais de systèmes de transports spécifiques, les mouvements des différentes molécules. La BHE joue également un rôle majeur d'isolement et de protection du cerveau de par sa quasi imperméabilité aux protéines plasmatiques et aux molécules de grandes tailles, potentiellement toxiques pour le cerveau. Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, l'étude du passage de la BHE est fréquemment mise en oeuvre car elle revêt une importance particulière. Le passage de la molécule au travers de la BHE doit être évalué tout d'abord lorsque son site d'action se trouve au sein du SNC. En effet, le médicament ne sera dans ce cas efficace que s'il est capable de franchir cette barrière et d'atteindre sa (ses) cible(s) en concentration suffisante. Dans ce contexte, l'existence de la BHE complique le traitement médicamenteux d'un grand nombre de maladies neurologiques (agents psychotropes notamment), car de nombreuses molécules actives ne peuvent pas accéder à leur site d'action. Différentes

stratégies peuvent être mises en place pour permettre, faciliter ou optimiser le passage du médicament au travers de la BHE ; l'étude du passage de la BHE permet alors d'évaluer l'efficacité de ces différentes stratégies. Parallèlement à l'étude de son efficacité, le passage de médicaments au travers de la BHE doit également être évalué lorsque qu'il existe une possibilité de survenue d'effets indésirables liés à son entrée dans le SNC alors que son site d'action est situé en périphérie. Différentes méthodes ont été mises au point pour étudier le passage de molécules au travers de la BHE. Des techniques *in silico* permettent par exemple de simuler le passage de molécules au travers de modèles de BHE. De la même manière différentes approches *in vitro*, utilisant notamment des cultures cellulaires, rendent possible l'analyse de certaines composantes de ce passage. Néanmoins, ces différentes approches, si elles représentent des outils extrêmement intéressants, ne permettent pas de recréer la BHE telle qu'elle peut se présenter de manière physiologique, dans toute sa complexité.

En parallèle, différentes techniques permettent donc d'étudier le comportement de candidats médicaments vis à vis de la BHE *in vivo*, sur animal entier. Dans la mesure où la structure de la BHE est très similaire au sein des mammifères, les résultats qui peuvent être obtenus chez le rongeur de laboratoire (rat et souris) peuvent, dans la grande majorité des cas, être transposés à l'homme avec un bon niveau de prédictivité.

Compte tenu des éléments évoqués plus haut, une étape clef dans l'étude du passage de la BHE consiste en la réalisation de tests sur des modèles animaux et notamment sur le rongeur. Dans cette optique, le modèle consistant à prélever simultanément sur le même animal des échantillons de sang et de LCR, associés au prélèvement du tissu cérébral postmortem, compte parmi les modèles les plus classiquement utilisés et fait l'objet du présent projet. Un des intérêts majeurs de ce modèle repose sur le fait que plusieurs échantillons de sang et de LCR vont être prélevés sur le même animal pendant plusieurs jours ce qui permet de limiter le nombre de rongeurs utilisés dans chaque série expérimentale mais également d'améliorer la qualité des résultats collectés.

Une série expérimentale consiste généralement en l'étude du passage de la BHE pour 1 composé candidat à 3 doses différentes chez le rat ou la souris. Ainsi 3 procédures différentes seront décrites en fonction de l'espèce choisie (rat ou souris) et des besoins d'obtention de concentrations intra-tissulaires du candidat médicament. Pour chaque dose, 8 points de prélèvements « sang + LCR » seront répartis sur 24 heures en moyenne. A raison de 3 rongeurs par dose, 9 rongeurs devront être inclus pour assurer cette collecte simultanée pour l'ensemble des 3 doses. Si les cerveaux doivent également être collectés, 3 rongeurs supplémentaires devront être inclus à chacun des 7 premiers points (3 rats x 7 points x 3 doses = 63 animaux), pour disposer de tissu cérébral en quantités suffisantes. En effet, dans le but de limiter le nombre d'animaux (3Rs), on prélèvera également au huitième et dernier point le cerveau des 9 rongeurs utilisés pour la collecte répétée de « sang + LCR ». Le nombre total de rongeurs nécessaire pour réaliser, pour les 3 doses, la collecte de sang, de LCR et de cerveau, est alors de 63+9, soit 72 au total.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet est donc de 1440 animaux, répartis en 20 séries expérimentales de 72 rongeurs chacune, sur 5 ans.

Concernant les signes de reconnaissance de la douleur chez le rongeur, nous nous référons à la grille de MORTON et GRIFFITHS, 1985 modifiée. En effet, nous nous focalisons sur l'apparence de l'animal, son examen clinique dans sa cage, l'abreuvement et l'alimentation, le comportement naturel et provoqué. Selon les scores seuils atteints, il y a un déclenchement de décisions (normal, utilisation d'antalgiques appropriés ou euthanasie si le point limite est atteint).

2285- Le cancer du sein est la deuxième cause de décès par cancer et est responsable de 15% de tous les décès par cancer chez la femme. La surexpression de HER2 ou l'amplification du gène HER2 se retrouve chez approximativement chez 20-25% des patientes. Cette surexpression est associée avec une croissance tumorale agressive et est de mauvais pronostic.

Dans les cancers du sein HER2-positifs, l'addition du Trastuzumab, un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le domaine extracellulaire de HER2, en association ou séquentiellement avec une chimiothérapie cytotoxique à base d'anthracyclines a amélioré le pronostic des patientes. Cette combinaison est actuellement classiquement proposée aux patientes HER2 positives. Cependant, des phénomènes de résistance primaire ou secondaire au Trastuzumab sont presque toujours inéluctables. Ceci justifie le besoin urgent d'augmenter le répertoire actuel de l'option thérapeutique.

Dans ce contexte, le Trastuzumab emtansine (T-DM1) combine physiquement le Trastuzumab avec l'agent cytotoxique emtansine (DM1) par l'intermédiaire d'un linker stable de thioéther. Le Trastuzumab et le T-DM1 empêchent tous deux, la signalisation HER2, bloquent le clivage de HER2 et induisent la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps. T-DM1 s'est avéré efficace à la fois *in vitro* et *in vivo* dans les modèles de cancer du sein résistants au Trastuzumab. De plus, au sein du laboratoire, nous avons montré pour la première fois que le traitement combinant T-DM1 à une anthracycline nommée épirubicine montre des effets thérapeutiques synergiques *in vitro* clairs et spécifiques aux cellules tumorales qui surexpriment HER2.

Actuellement, l'objectif majeur de ce projet est d'apporter la preuve de concept que la combinaison T-DM1/épirubicine offre un bénéfice thérapeutique *in vivo* et de comparer cette combinaison à une administration séquentielle à l'aide d'un modèle préclinique. Dans ce but, la lignée tumorale humaine mammaire BT474, sur-exprimant HER2 et particulièrement sensible à la combinaison T-DM1/épirubicine *in vitro*, sera transplantée de manière orthotopique chez des souris immunodéprimées (NSG). Dans le souci de la règle des 3R, lors de cette phase de greffe, nous réaliserons une anesthésie (Kétamine 100mg/kg + Xylazine 10mg/kg) et une analgésie (meloxicam 1mg/kg) péri-opératoire afin d'éviter toute douleur. Pour le bien-être des souris, nous disposerons en tant qu'enrichissement des copeaux de bois compactés et du coton pour la nidification dans les cages.

De même, nous utiliserons un nombre minimum mais nécessaire de souris, évalué à 50 souris réparties en 5 groupes (sans traitement ; T-DM1 ou épirubicine en monothérapie ; la combinaison et un groupe traité avec séquentiellement épirubicine

puis T-DM1). Par la suite, nous évaluerons la croissance tumorale à l'aide d'un pied-à-coulisse en fonction des traitements en monothérapie, combinés ou séquentiels. Afin de fournir des résultats statistiquement significatifs pour valider ou non l'effet anti-tumoral de ces traitements, l'expérience sera réalisée une seconde fois. Donc 100 souris seront utilisées pour ce projet. Le projet s'inscrit donc dans la recherche de nouvelles formes thérapeutiques. En effet, le développement de stratégies ciblées en cancérologie est devenu une option incontournable pour faire avancer la recherche médicale et améliorer les traitements des patients. L'objectif de ce projet est de développer une thérapie plus efficace et mieux tolérée par les patientes. Le résultat attendu serait la validation *in vivo* de l'efficacité d'une nouvelle association T-DM1 / épirubicine dans le traitement du cancer du sein exprimant Her2.

2286- Les recherches menées au sein du laboratoire ont pour but de développer des molécules bifonctionnelles associant chimiquement une partie HBP (hydroxybisphosphonate) à un principe actif. De part la forte affinité de l'HBP pour le tissu osseux, celui-ci permettrait de vectoriser différents types de molécules au niveau osseux dans le but d'augmenter les concentrations au niveau de l'os (pour les applications ciblées) en diminuant les concentrations circulantes (pouvant être responsables d'effets secondaires). Cette vectorisation peut s'appliquer pour des anticancéreux (dans le cadre des tumeurs osseuses telles que l'ostéosarcome), mais il est également possible de vectoriser des anti-inflammatoires, antalgiques ou des agents utilisés pour l'imagerie par exemple.

Ce projet consiste à déterminer la cinétique ADMET (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination et Toxicité) des molécules vectorisées administrées à la dose pharmacologique (pharmacocinétique) et à la dose MTD (maximum tolerated dose): toxicocinétique). Cette cinétique peut varier en fonction des modifications structurales au sein du vecteur, de la stabilité de la liaison chimique entre le vecteur et le principe actif, de la nature du principe actif, et de la dose administrée (saturation). L'objectif est de déterminer la cinétique de fixation et de libération de la molécule complète ou clivée au niveau du tissu osseux. La molécule et ses différents métabolites seront recherchés au niveau plasmatique, urinaire, fécale et au niveau des organes mous et des os. En parallèle, une analyse histopathologique sera réalisée sur certains animaux afin de confronter les résultats de la biodistribution et de l'observation des lésions histologiques sur les organes étudiés. Ce type de protocole sera réalisé pour des molécules bifonctionnelles ayant préalablement démontré leur efficacité dans des modèles relevant correspondant à une indication ciblée. Cette étude permettra d'améliorer le schéma thérapeutique d'administration de la molécule et de définir les métabolites à rechercher pour les études de toxicologie réglementaires ultérieures.

Les molécules à évaluer seront administrées par voie IV (intraveineuse), IP (intrapéritonéale), SC (sous-cutanée), IM (intramusculaire) ou per-os (selon le type de molécule et l'indication) à des souris. Les protocoles conteraient 76 animaux à savoir 37 souris pour la bioanalyse (1 souris CT (contrôle), 18 souris dose pharmacologique et 18 souris dose MTD) et 39 animaux pour l'histopathologie (3 souris CT (contôle), 18 souris dose pharmacologique et 18 souris dose MTD), soit un total de 1140 sur 5 ans. Par soucis de respect de la règle des 3R, les tests pour plusieurs molécules seront si possible regroupés afin de limiter le nombre d'animaux en utilisant un même groupe contrôle pour comparer plusieurs molécules bifonctionnelles. D'autre part, un nombre minimum de molécule sera testé en pharmacocinétique puisque seules les molécules ayant démontrées des propriétés thérapeutiques significatives seront évaluées. Le respect du bien-être animal passera par des conditions d'hébergement adéquates, un suivi quotidien des animaux, l'instauration de points limites pertinents et précoces et la mise en place de mesures adaptées (traitement analgésique ou euthanasie par des méthodes reconnues).

A terme, si le développement se poursuit dans de bonnes conditions, ces candidats devront ensuite faire l'objet d'études précliniques complémentaires réglementaires répondant aux guidelines ICH (International Council for Harmonisation), afin de retenir une molécule qui pourra alors être administrée chez le patient dans le cadre des essais cliniques. L'objectif final étant de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques aux patients atteints de pathologies diverses liées à l'os.

2287- Les cancers du sein ErbB2/HER2 dépendants représentent 25-30% de l'ensemble des cancers du sein et sont associés à un mauvais pronostic clinique. Les thérapies aujourd'hui utilisées ne sont que peu efficaces dû à l'apparition de phénomènes de résistance ainsi qu'à une forte toxicité associée à leur manque de spécificité.

Nous avons identifié un nouveau mécanisme permettant de bloquer spécifiquement l'activation d'ErbB2, y compris les formes résistantes aux traitements actuels. Nous avons alors développé des tests *in vitro* permettant de cribler et d'identifier de petits composés chimiques inhibant ErbB2 par le même mécanisme. A la suite de nombreuses étapes de validation *in vitro* de l'efficacité de ces molécules à inhiber ErbB2 de façon sélective, conformément à des objectifs de remplacement et de réduction, nous souhaitons à présent tester l'efficacité de deux composés à inhiber la croissance de tumeurs ErbB2-dépendantes pour confirmer leur intérêt thérapeutique. Toutefois l'obtention des données sur l'efficacité anti-tumorale *in vivo* de ces molécules est essentielle au dépôt d'un brevet et à l'établissement d'un partenariat industriel qui prendra en charge le futur développement de cette stratégie thérapeutique innovante.

Dans ce but, la lignée tumorale humaine mammaire BT474, sur-exprimant HER2 et particulièrement sensible aux molécules sélectionnées *in vitro*, sera transplantée de manière orthotopique chez des souris immunodéficientes. Lors de cette phase de greffe et dans le souci de la règle des 3R, outre l'anesthésie durant la chirurgie, nous réaliserons une analgésie péri-opératoire afin d'éviter toute douleur. De plus, les deux molécules criblées ont déjà obtenu une AMM et leurs profils pharmacocinétiques sont déjà connus, ce qui diminue le risque inhérent à leur administration. De même, pour le bien-être des souris, nous disposerons en tant qu'enrichissement des copeaux de bois compactés et du coton pour la nidification dans les cages durant toute la durée de l'hébergement. Après apparition des tumeurs, les souris seront alors réparties dans trois groupes, un groupe contrôle (10 animaux) et deux groupes (2x10 animaux) auxquels seront administrés le composé à évaluer à deux doses différentes. Le volume tumoral sera alors mesuré pour évaluer la capacité de ces composés à inhiber la croissance tumorale de

ce sous-type de cancer. Les résultats seront confirmés dans une seconde expérience ce qui implique que ce projet fera donc appel à 60 (3x10x2) souris par composé, soient 120 souris au total.

Le projet s'inscrit donc dans la recherche de nouvelles formes thérapeutiques. En effet, le développement de stratégies ciblées en cancérologie est devenu une option incontournable pour faire avancer la recherche médicale et améliorer les traitements des patients. L'objectif de ce projet est de développer une thérapie plus efficace pour les patientes. Le résultat attendu serait donc la validation in vivo de l'efficacité de 2 molécules repositionnées dans le traitement du cancer du sein exprimant Her2.

2288- L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des bronches caractérisée par l'apparition de crises (épisodes de dyspnée aiguë). Elle est la conséquence de facteurs innés (terrain atopique) et de facteurs environnementaux (présence d'allergènes dans l'environnement notamment). L'asthme associe une inflammation locale, une hyper-réactivité bronchique (HRB), une hyper-sécrétion de mucus et un épaississement de la paroi des bronches qui s'accompagne d'une bronchoconstriction. Il n'y a pas dans l'asthme, sauf formes très sévères, d'atteinte parenchymateuse. L'ensemble de ces phénomènes aboutit au développement d'une hyperréactivité bronchique à différents stimuli, à la diminution du diamètre des bronches et par conséquent à une limitation transitoire des débits expiratoires.

Il s'agit d'une maladie respiratoire grave qui touche plus de 4 millions de personnes en France et 235 millions dans le monde, dont un tiers d'enfants, chez qui elle représente d'ailleurs l'affection chronique la plus fréquente. Ce nombre en constante évolution est par ailleurs très probablement sous-estimé car la pathologie est souvent non diagnostiquée et donc non prise en charge. L'asthme est responsable de plus de 2000 décès par an en France.

D'un point de vue des signes cliniques, la crise d'asthme se caractérise par des difficultés respiratoires qui s'accompagnent d'une toux et d'un sifflement caractéristique, témoin du rétrécissement des bronches. Non traitée, la pathologie s'aggrave au fil des années et peut évoluer vers une insuffisance respiratoire.

L'asthme est une maladie complexe et se trouve être la conséquence de plusieurs anomalies : une inflammation chronique caractérisée par un afflux majoritaire de granulocytes éosinophiles, une hypertrophie des glandes à mucus et une hypersécrétion de mucus, des spasmes du muscle bronchique et des lésions de l'épithélium bronchique.

L'asthme étant la résultante de phénomènes d'inflammation et de bronchoconstriction, les traitements actuels (bronchodilatateurs et anti-inflammatoires) visent à limiter l'impact de ces deux éléments. Malgré tout, ces traitements ne sont pas curatifs ; ils permettent seulement de ralentir l'évolution de la maladie et de mieux contrôler les crises.

Compte tenu des éléments précédemment évoqués, il apparaît clairement que les efforts engagés pour tenter de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à mieux contrôler l'asthme et les crises associées, doivent être poursuivis. Compte tenu de la complexité de cette pathologie ces développements passent par la réalisation de tests sur des modèles animaux, aussi prédictifs que possible. Dans cette optique, différents modèles animaux ont été développés. Les modèles consistant à exposer des animaux à des allergènes sont les modèles les plus utilisés pour l'étude de l'asthme. Le modèle d'inflammation pulmonaire induite par exposition à de l'ovalbumine chez la souris compte parmi les modèles les plus classiquement utilisés et fait l'objet du présent projet.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été déterminé par un calcul de N : 60 par série expérimentale pour un total de 20 séries sur 5 ans, soit 1200 animaux. Le point limite a quant à lui été fixé sur la base de la grille d'évaluation de la souffrance de MORTON et GRIFFITHS 1985 modifiée ; ce « point limite » étant défini comme le moment auquel la souffrance et/ou la détresse d'un animal d'expérimentation doit être arrêtée, minimisée ou diminuée à l'aide d'un traitement visant à le soulager, par l'arrêt du processus qui le fait souffrir, ou par euthanasie en dernier recours.

2289- Les fumées de cigarette constituent le facteur environnemental majeur chez l'homme d'apparition de pathologies pulmonaires comme les bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO) consécutives à une exposition durant des années aux fumées de cigarette. En revanche, des expositions courtes à ces fumées provoquent une inflammation des voies aériennes et une hyperplasie des cellules à mucus. Il s'agit de ces caractéristiques que nous souhaitons étudier dans ce protocole court. Ce modèle qui dure entre 5 et 10 jours est très intéressant car il utilise un facteur environnemental réaliste par rapport à l'homme, et permet d'obtenir une inflammation de type neutrophilique majoritairement, avec un remodelage des voies aériennes faibles mais avec une hyperplasie des cellules à mucus qui est une caractéristique intéressante à étudier et absente des modèles déjà présents dans le laboratoire. La mise au point de ce modèle court permettra de définir les conditions d'exposition des souris aux fumées de cigarette pour une exposition chronique par la suite. Dans ce modèle il sera aussi très intéressant de déterminer si l'inflammation induite par les fumées de cigarette est réversible ou atténuée avec l'utilisation de glucocorticoïdes, les données publiées étant divergentes sur cet aspect.

Remplacement : Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle in vitro ou de culture cellulaire ne nous permet d'étudier les symptômes inflammatoires au niveau pulmonaire. De plus, la souris est déjà utilisée et bien étudiée dans les études d'inflammation au niveau respiratoire, du fait des similitudes avec la pathologie humaine.

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

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés sera optimisé pour obtenir des résultats exploitables. En effet, 30 animaux au total seront utilisés afin de déterminer les conditions expérimentales permettant d'obtenir une inflammation des voies aériennes et

les symptômes associés. De plus, les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter toute redondance dans cette mise au point

2290- *Streptococcus pneumoniae* (pneumocoque) est la première cause de pneumonie communautaire et pourrait être le principal agent responsable des pneumonies communautaires d'étiologie inconnue. Le taux de mortalité de la pneumonie à pneumocoques peut atteindre 30% en fonction de la bactériémie, de l'âge et des maladies sous-jacentes. Mal diagnostiquée et mal traitée, une infection à *S. pneumoniae* peut entraîner une bactériémie, une méningite, une péricardite, un empyème, un purpura fulminans, une endocardite et/ou de l'arthrite.

La méningite à pneumocoques, une maladie qui entraîne fréquemment des lésions cérébrales irréversibles ou la mort, peut se manifester sous la forme d'une complication d'une autre infection à pneumocoques ou bien spontanément, sans aucune maladie précurseur. Elle affecte les personnes de tous âges, mais prévaut chez les enfants de moins de 5 ans, les adolescents et les jeunes adultes, ainsi que les personnes âgées. La maladie peut évoluer en quelques heures d'une affection bénigne au coma, d'où l'importance d'établir un diagnostic immédiat permettant d'administrer un traitement antimicrobien adéquat. Le taux de mortalité en cas de méningite à pneumocoques est de 20 à 30%, souvent malgré une antibiothérapie adaptée pendant plusieurs jours. La mortalité est encore plus élevée chez les très jeunes enfants et les personnes très âgées.

Pour toutes ces raisons, nous souhaitons développer un test permettant le diagnostic précoce de la pneumonie à pneumocoques. Ce test sera un immuno-essai, dont le principe repose sur la réaction anticorps-antigène et qui nécessite donc de disposer d'anticorps sensibles et spécifiques.

Il n'existe pas actuellement d'anticorps commercialement disponibles répondant à nos besoins. L'immunisation d'animaux permettra d'obtenir un immunosérum qui, une fois purifié, fournira les anticorps polyclonaux qui seront utilisés dans le test. 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.

L'animal choisi pour ce projet est la chèvre. La chèvre présente de nombreux avantages pour la production d'anticorps polyclonaux, elle permet d'obtenir en général des volumes satisfaisants d'antisérum présentant un titre élevé et une forte affinité vis-à-vis de l'antigène injecté. De plus, le prélèvement des anticorps peut être réalisé par plasmaphérèse qui est un mode de prélèvement moins traumatisant et moins éprouvant pour l'animal, permettant l'obtention d'un volume important de plasma hyper-immun avec un faible nombre d'animaux.

Il est prévu pour notre projet d'immuniser une première série de 3 chèvres et en fonction des résultats obtenus de relancer une ou deux autres séries. Dans tous les cas, le nombre total de chèvres immunisées sera au maximum de 9.

La stabulation des animaux sera réalisée dans des conditions conformes à la réglementation et adaptées au bien-être des animaux : Les chèvres seront stabulées en lots de plusieurs animaux leur permettant une vie sociale avec mise à disposition de fourrage à volonté leur fournissant une occupation.

2291- Le virus de la dengue qui est transmis par les moustiques *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*, est largement répandu dans les régions tropicales et subtropicales mondiales. Il existe quatre sérotypes distincts du virus de la Dengue (dengue virus 1, 2, 3 et 4). La dengue est considérée comme l'arbovirose humaine la plus importante en raison de la morbidité et de la mortalité qu'elle engendre.

L'antigène NS1 est une glycoprotéine hautement conservée qui est présente en quantité importante, pendant la phase clinique précoce de la maladie, dans le sérum des patients infectés par le virus de la dengue. L'antigène NS1 est présent dans le sérum des malades entre le premier et le neuvième jour après l'apparition de la fièvre.

La détection de la protéine NS1 permet un diagnostic précoce de la dengue et la mise en place rapide d'un traitement adapté.

Nous souhaitons donc développer un test permettant la détection de cette protéine NS1. Ce test sera un immuno-essai, dont le principe repose sur la réaction anticorps-antigène et qui nécessite donc de disposer d'anticorps sensibles et spécifiques.

Il n'existe pas actuellement d'anticorps commercialement disponibles répondant à nos besoins. L'immunisation d'animaux permettra d'obtenir un immunosérum qui, une fois purifié, fournira les anticorps polyclonaux qui seront utilisés dans le test. 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 1 ou 2 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 pas supérieur à 5.

La stabulation des animaux sera réalisée dans des conditions conformes à la réglementation et adaptées au bien-être des animaux (ambiance musicale,...).

2292- La présence de germes pathogènes dans la viande de poulet peut être responsable de maladies d'origine alimentaire chez l'homme, maladies dont les plus courantes sont les gastro-entérites (ex : Campylobactériose)

Les maladies résultant de l'infection par la une bactérie intestinale sont en général bénignes, mais peuvent être fatale chez les très jeunes enfants, les personnes âgées et les individus immunodéprimés.

La campylobactériose, par exemple, est une zoonose, c'est-à-dire une maladie transmise aux hommes par des animaux ou des produits animaux. La principale voie de transmission serait la consommation de viande de volaille contaminée et insuffisamment cuite.

Il est rare que cette bactérie provoque des maladies chez l'animal. Toutefois réduire la prévalence de cette bactérie chez les volailles vivantes permettrait de réduire la fréquence de campylobactériose humaine.

Ce projet a pour objectif de tester l'efficacité de produits permettant de réduire la présence de certains germes intestinaux chez la volaille.

Ainsi les produits étudiés seront distribués aux animaux dans l'eau de boisson ou dans l'aliment, des prélèvements de fiente ou d'organes seront réalisés avant, pendant et/ou après traitement, afin de quantifier le nombre de germes, et donc de voir si le traitement permet une diminution de la prévalence.

La procédure expérimentale in vivo est nécessaire et ne peut être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

La conception de ces projets (y compris la sélection des espèces d'essai, leur nombre, leur âge, la dose sélectionnée et la voie d'administration) est basée sur les informations disponibles issues des études in vitro, des données bibliographiques ainsi que sur l'utilisation clinique ultérieure prévue.

Grâce à une bonne standardisation des essais le nombre d'animaux est optimisé en vue d'utiliser un minimum d'animaux sans compromettre les objectifs des études. Ainsi, pour la plupart des projets, les animaux sont répartis dans 3 à 6 groupes de 30 animaux. Le nombre d'animaux par groupe est déterminé en fonction des données déjà disponibles sur la molécule étudiée, en fonction des analyses réalisées et dans le but de répondre aux besoins statistiques.

Le nombre d'oiseaux prévu pour la période de 5 ans est de 1000.

L'établissement au sein duquel les animaux sont hébergés fournit des conditions de maintenance adaptées. Les animaux sont hébergés par groupe et bénéficient d'enrichissement (ex : litières à gratter, perchoir) pour leur bien-être. La réglementation en vigueur relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques sera respectée.

Les résultats obtenus lors de ces études permettront de vérifier si, dans ces conditions d'administration (dose, durée,...), le produit permet d'éliminer la bactérie intestinale en question chez les oiseaux.

2293- L'objectif scientifique de cette validation d'un modèle d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) induite par hypoxie est :

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) correspond à un groupe de maladies d'évolution progressive caractérisée par une élévation anormale de la pression sanguine au niveau des artères pulmonaires, dont le symptôme principal est un essoufflement à l'effort chez l'homme. Selon la cause et la gravité, l'hypertension artérielle pulmonaire peut être une maladie sévère avec une tolérance à l'effort très nettement diminuée et une insuffisance cardiaque droite.

Il existe deux types d'HTAP, l'HTAP primitive qui est sans atteinte du cœur gauche et l'HTAP secondaire qui est consécutive à une insuffisance cardiaque gauche.

L'objectif de ce développement, à cheval sur les activités cardio-vasculaires et respiratoires du service, est d'obtenir un modèle d'hypertension pulmonaire (primitive) avec des caractéristiques physiopathologiques proches de celles rencontrées chez l'homme (hypertension au niveau des artères pulmonaires, insuffisance cardiaque droite)

Dans ce modèle d'HTAP par exposition prolongée à des conditions d'hypoxie, la baisse de la pression partielle en oxygène (comme en altitude) entraîne des modifications structurales des vaisseaux pulmonaires : épaissement de la paroi des artères, réduction du nombre d'artéoles fonctionnelles, ... La physiopathologie de ces modifications structurales fait intervenir différents effets cellulaires en réponse à l'hypoxie comme l'induction de gènes impliqués dans la prolifération des cellules musculaires lisses et la production de matrice extracellulaire via la sécrétion accrue d'érythropoïétine (EPO) permettant une augmentation de la production de globules rouges dans le sang mais également une induction de l'expression du récepteur de la sérotonine 5-HT_{2B} très présent sur les cellules musculaires lisses pulmonaires, la sérotonine étant responsable du remaniement de la paroi vasculaire au niveau pulmonaire. Dans ce modèle d'HTAP, nous allons d'une part administrer de l'EPO recombinante pour vérifier l'hypothèse que cette administration conduit à une HTAP sévère via une augmentation accrue de sécrétion de sérotonine et de l'expression de 5-HT_{2B} et d'autre part, administrer un inhibiteur de la production de sérotonine (la parachlorophénylalanine) pour vérifier l'hypothèse que l'inhibition de la sérotonine conduit à une HTAP légère.

Ces différentes caractéristiques physiopathologiques seront évaluées à l'aide de techniques utilisées chez l'homme et qui sont adaptées ici à la souris. Ainsi l'hypertension au niveau des artères pulmonaires et l'insuffisance cardiaque droite sera appréciée par échographie cardiaque (comme chez l'homme) et confirmée par cathétérisme cardiaque droit (comme chez l'homme) ainsi que par histologie

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

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

Notre expérience au laboratoire a montré qu'il est nécessaire d'avoir un effectif de 6 souris au minimum afin de pouvoir conclure sur l'étude.

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

Ainsi nous avons 9 groupes de 6 à 8 souris, soit 62 animaux pour ce projet, répartis en 6 groupes placés dans des conditions d'hypoxie pendant différentes durées et 3 groupes placés dans des conditions normoxiques (contrôles).

RAFFINEMENT: Avec ce protocole nous nous sommes attachés à éviter au maximum toutes formes de souffrance des souris impliquées. L'exposition des souris à des conditions hypoxiques ne provoque pas de souffrance. L'exploration échographique sous anesthésie ainsi que le cathétérisme invasif final ne provoquent pas de souffrance. Le test d'effort et de fatigue quant à lui engendre des chocs électriques de faible intensité et de durée très courte qui ne provoquent pas de souffrance prolongée ni durable mais très brève et transitoire

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

2294- L'étude s'inscrit dans un large projet industriel qui vise à décrypter les mécanismes moléculaires de toxicité des molécules dans le développement préindustriel d'un adjuvant de combustion. Nous sommes en charge d'étudier la tolérance aiguë et chronique et la distribution tissulaire chez la souris normale de la molécule d'intérêt. Dans ce projet, la majorité des expérimentations font appel à des méthodes alternatives in vitro. Cependant, les aspects cinétiques (taux plasmatique, distribution tissulaire), ne peuvent être appréhendés in vivo.

Ce travail permettra de définir les informations indispensables pour constituer le dossier réglementaire REACH pour l'utilisation industrielle de ce produit.

Ce programme se décline en trois phases :

Expérimentation 1 : évaluation de la tolérance des souris à des doses croissantes de composé (exposition aiguë) après administration parentérale et administration orale.

Expérimentation 2 : mesure de la tolérance après exposition chronique d'un mois à trois doses (ajout du composé à l'eau de boisson). Le niveau d'exposition (concentration du TNP dans l'eau de boisson) sera fonction de la concentration maximale tolérée lors de l'expérience 1 pondérée par un facteur 1/5, 1/10, 1/20.

Expérimentation 3 : à la dose maximale tolérable par administration parentérale déterminée lors de l'expérimentation 1, nous déterminerons le taux sanguin et la distribution tissulaire du composé et de ses métabolites éventuels préalablement caractérisés in vitro. L'identification et la quantification sera réalisée en utilisant une méthode analytique par LC-MS/MS.

Expérimentation 4: Détermination de la toxicocinétique par voie orale du TNP à la dose à 40 mg/kg au lieu de 185 mg/kg de l'expérience 3. Ceci correspond à 2,5 fois la dose IV utilisée dans les expérimentations précédentes. Nous déterminerons la distribution tissulaire du TNP et de leurs métabolites éventuels préalablement caractérisés in vitro. L'identification et la quantification sera réalisée en utilisant une méthode analytique par LC- MS/MS.

Nous allons respecter la règle des 3R; Réduction du nombre d'animaux utilisés en réalisant la procédure 1 en administrant de la concentration la plus faible à la plus haute. Les méthodes alternatives, quand elles existent seront utilisées (détermination des métabolites du TNP sur cellules modèles cellulaires). Lors de la réalisation des protocoles, le maximum d'informations sera récolté afin de restreindre l'utilisation de l'animal.

Le nombre d'animaux est de 204 souris

2295- L'obésité et le surpoids concernaient 15 et 32% de la population française en 2012 (étude Obépi 2012). Les conséquences médicales de l'obésité représentent jusqu'à 10% des dépenses de santé. Connaître les mécanismes aboutissant à ces complications est donc un enjeu sociétal, économique et scientifique majeur. La surconsommation alimentaire appelée hyperphagie est l'un de ces mécanismes. La régulation de la prise alimentaire est un phénomène complexe faisant intervenir des signaux en provenance de nombreux organes. Lors d'un repas, des hormones intestinales sont secrétées et vont envoyer des informations au cerveau par l'intermédiaire du nerf vague pour continuer ou arrêter la prise alimentaire. De récents travaux ont montré que, suite à l'ingestion de régime hyperlipidique, cette communication est altérée. Le cerveau ne perçoit plus les signaux de satiété provenant de l'intestin, et donc ne réduit plus la prise alimentaire. Ces mécanismes sont en partie responsables de l'installation de l'obésité.

Des résultats antérieurs ont montré une augmentation de la prise alimentaire les 5 premiers jours de régime chez les animaux nourris avec un régime hyperlipidique. L'objectif de notre projet est de déterminer la relation entre la fonction intestinale, la biologie du nerf vague et la prise alimentaire durant cette première semaine de régime hyperlipidique. Pour cela, nous suivrons deux différentes procédures. Une première permettra de préciser l'effet d'un régime hyperlipidique sur une courte période. Nous soumettrons des rats Wistar à deux régimes différents : standard durant 4 jours et hyperlipidique durant 1, 2 et 4 jours. Au terme de ces périodes, nous prélèverons l'intestin et le nerf vague ainsi que le sang et du tissu adipeux chez 6 animaux de chaque régime, ce qui fera un total de 24 animaux. Dans une deuxième procédure, et afin de déterminer le rôle des lipides dans ces dérèglements, nous soumettrons des rats à 3 régimes différents : Standard, hyperlipidique et hyperlipidique restreint en énergie (pendant 1 semaine puis régime hyperlipidique ad libitum pendant 5 semaines pour ce dernier groupe). Nous étudierons l'effet de ces régimes à court terme après une semaine de régime mais également l'effet à long terme après 6 semaines de régime. De la même manière, au terme de cette procédure, nous prélèverons l'intestin et le nerf vague ainsi que le sang et du tissu adipeux de ces 36 animaux.

Lors de ces procédures, nous respecterons la règle des 3R : Réduire, Remplacer, Raffiner. Nous avons réduit le nombre d'animaux tout en conservant un n suffisant par groupe afin d'observer des différences significatives. Nous allons utiliser des animaux du même âge, de même sexe afin de limiter l'utilisation de plusieurs groupes contrôles. Nous étudions les effets la nutrition sur la physiologie nerveuse et intestinale, il est donc difficile remplacer ces procédures par des méthodes in vitro. Enfin, l'aspect Raffinement est pris en compte: des études préliminaires ont été réalisées permettant d'ajuster au mieux les procédures et les animaux étant en cages individuelles, ils auront à leur disposition du matériel (tube plastique, carré de coton) pour réduire le stress lié à cet isolement (enrichissement).

2296- La borréliose de Lyme est une zoonose transmise par une tique dure du genre Ixodes (I. Ricinus en Europe) et causée par une bactérie appartenant au phylum des spirochètes: *Borrelia burgdorferi* sensu lato regroupant une vingtaine d'espèces dont les trois espèces pathogènes principales sont *B. burgdorferi* sensu stricto (ss), *B. afzelii* et *B. garinii*. Le réservoir naturel de la maladie est représenté par les petits rongeurs et certains oiseaux. Une interaction entre le pathogène, le vecteur et l'hôte

est nécessaire pour la persistance de la maladie dans la nature. Chez l'homme, l'impassibilité bactériologique pour le pathogène, de nombreuses manifestations cliniques sont décrites selon le stade de la maladie mais ce sont les formes cliniques tardives qui posent un véritable problème diagnostique et thérapeutique.

L'objectif de l'étude est de définir le rôle de la peau, interface essentielle dans la transmission, de comprendre la transmission de l'hôte infecté au vecteur non infecté ainsi que le mode de persistance de *Borrelia* dans l'organisme pour progresser dans la compréhension et la prise en charge des patients atteints de formes cliniques tardives. Nous nous intéressons aux trois principales espèces de *Borrelia* en Europe (*Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* et *Borrelia afzelii*). Plusieurs protocoles d'inoculation (intradermique et intra-péritonéale) puis de réactivation après 40 jours d'infection (dépôt de nymphes négatives ou application de dermocorticoïdes) vont être réalisés pour comprendre la dissémination et la réactivation cutanée de *Borrelia* dans un modèle murin (souris C3H/HeN). La dissémination sera analysée par culture d'organes et mesurée par PCR quantitative. Puis la persistance cutanée de la bactérie sera mise en évidence par la réactivation de *Borrelia*, réalisée par application de dermocorticoïde sur la peau. L'analyse par protéomique (LC-MS/MS_ Liquide Chromatographie couplée à la spectrométrie de masse) permettra la recherche dans la peau de protéines bactériennes, servant de marqueurs d'infection tardive.

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

Remplacement : notre modèle est infectieux. Nous ne pouvons pas travailler sur des organes isolés pour deux raisons principales : i) le but de l'étude est d'analyser la dissémination du pathogène dans différents organes à partir d'une inoculation intradermique ou intrapéritonéale ; ii) Le système immunitaire de l'hôte est un élément majeur de la dissémination/réactivation de la bactérie chez le mammifère. Un modèle complet est donc nécessaire à cette étude.

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

Réduction : Le nombre prévu de souris pour le projet est réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. L'analyse statistique est un test non paramétrique de Man-Whitney. Ce nombre est de 380.

2297- Les animaux d'élevage n'étant plus considérés comme des biens de consommations mais comme des êtres sensibles, il est nécessaire de limiter au maximum les émotions négatives qui peuvent être provoquées par les procédures d'abattage. Il est donc impératif de disposer de méthodes d'évaluation de la douleur, potentiellement perçue par les animaux au moment de l'abattage, qui reposent sur des fondements scientifiques.

Face à l'absence de techniques de mesures directes du ressenti douloureux, il est nécessaire de développer une méthode d'évaluation de la douleur aiguë des bovins, à l'aide d'indicateurs validés et clairement définis, au moment de leur mise à mort. Cette méthode d'évaluation permettra à court ou moyen terme une évaluation des méthodes d'abattages industriels et nous permettra ainsi de disposer d'un outil objectif en vue de l'amélioration des pratiques.

L'objectif du projet est de mettre en place une méthode d'évaluation de la douleur aiguë des bovins au moment de leur mise à mort, applicable sur le terrain (en abattoir industriel). Il n'existe pas de méthodes alternatives, ne mettant pas en jeu des animaux, qui nous permettent de répondre à l'objectif de notre projet. Pour mettre au point de manière pertinente ce type de méthode d'évaluation, il est donc nécessaire d'avoir recours à des animaux (n=18). Un à 2 bovins seront utilisés pour tester la faisabilité du protocole expérimental (Procédure n°1). Si la faisabilité est validée, il sera mis en œuvre sur 16 bovins répartis en deux lots (n=8 par lot) selon leur traitement. Le nombre d'animaux a été ajusté en fonction des différences attendues et des analyses statistiques les plus pertinentes qui tiennent compte des faibles effectifs.

2298- L'activité physique régulière et encadrée engendre des bénéfices variés sur la santé, notamment chez les patients atteints de tumeurs. Depuis 1995, de nombreuses études ont montré une diminution du risque de cancers, de leur progression et de leur rechute chez des patients réalisant une activité physique régulière. Ces effets sont concomitants à une amélioration des capacités cardio-respiratoires, de la fatigue et de la qualité de vie des patients. Toutefois, les travaux portent principalement sur les cancers les plus fréquents, à savoir les cancers du colon, du sein et de la prostate. Les sarcomes sont des tumeurs rares représentant environ 1% des cancers avec une incidence de 2 cas pour 100000 habitants. Ils surviennent préférentiellement chez l'adulte, entre 50 et 65 ans. Leur traitement est essentiellement chirurgical et le délai préopératoire entre le diagnostic et l'acte chirurgical varie suivant la nécessité d'un traitement préalable (chimiothérapie et plus rarement radiothérapie) et la réalisation du bilan pré opératoire. Cette période est généralement comprise entre 2 semaines et plusieurs mois. Dans ce contexte, notre projet a pour objectif principal d'étudier l'impact de niveaux d'activité physique sur le développement d'un liposarcome chez la souris et d'en déduire d'éventuelles recommandations de niveau d'activité physique chez l'homme dans la phase pré opératoire.

Pour atteindre ces objectifs, le modèle in vivo est incontournable compte tenu des effets sur l'activité ou l'inactivité physique à observer. Nous utiliserons des souris porteuses d'un liposarcome inoculé au niveau des membres postérieurs qui demeureront actives ou inactives physiquement suite à cette inoculation. Le modèle de roue bloquée sera utilisé pour induire un phénotype actif ou inactif physiquement aux animaux. Cette approche permet d'induire une brusque réduction de niveau d'activité physique fournissant une fenêtre de temps pour explorer les effets physiologiques à court et long terme de l'inactivité physique. Indépendamment de l'inoculation du liposarcome, ce modèle de roue bloquée n'induit pas de stress particulier, ni de douleur chez l'animal. L'expérimentation se divisera en deux tâches :

- une première consistant à établir une courbe de survie d'une cohorte de 30 souris atteintes d'un liposarcome en fonction de leur statut actif ou inactif (n=15 par groupe). Pour cette courbe de survie, les animaux seront sacrifiés avant la mort naturelle (perte de poids égale à 20% du poids initial de l'animal), cette procédure permettant d'épargner une souffrance inutile chez l'animal.

- une seconde tâche consistant à sacrifier une cohorte de 4 groupes de 8 souris (déterminé à partir d'un sample size test) à un temps plus précoce pour comparer au même instant des paramètres histologiques, biochimiques et moléculaires au sein du tissu musculaire et des tumeurs cancéreuses en fonction du statut des animaux (Actif ou inactif, porteur ou non d'un liposarcome). La courbe de survie établie lors de la première tâche permettra de choisir le meilleur temps possible de sacrifices pour mettre en évidence les différences entre les animaux actifs ou inactifs au niveau de la croissance tumorale et des paramètres de santé de l'animal. Si la première tâche ne permet pas de confirmer d'effets bénéfiques ou délétères de l'activité physique, la seconde tâche ne sera pas réalisée.

Au total, ces deux tâches nécessiteront 62 souris, répondant à la règle des 3R, réduire, raffiner, remplacer. Raffinement: les animaux sont élevés dans des conditions adaptées, locaux confinés, eau et nourriture ad-libitum. Pour les besoins de l'expérimentation les animaux seront hébergés individuellement mais les uns à côté des autres au sein de cages transparentes. Pour limiter les effets délétères de l'isolement social, les animaux bénéficieront d'un enrichissement de leur environnement (tube en carton pour jouer et coton pour nidation). De plus, le suivi quotidien des animaux (grille d'évaluation de la douleur couramment utilisé au sein de notre labo), du poids et du volume tumoral permettra d'avoir un contrôle continu de l'état de santé des rongeurs pour éviter des souffrances inutiles. Réduction: Les procédures expérimentales sont rigoureusement planifiées afin de n'utiliser que le nombre d'animaux strictement nécessaires pour valider les données obtenues à la fin de la procédure. Remplacement: Notre expérimentation nécessite l'exploration de mécanismes cellulaires et moléculaires au sein du tissu musculaire et tumoral. Il est à l'heure actuelle pour nous impossible de pouvoir effectuer des biopsies musculaires et tumorales sur des populations atteintes d'un liposarcome et de disposer d'une population d'individus actifs et inactifs suffisamment larges. Aucun modèle "in vitro" ne permet d'explorer les effets de l'activité physique sur la croissance d'un liposarcome ainsi que ces conséquences délétères sur la santé d'un individu.

2299- L'altération de la fonction auditive au cours de la presbycusie et du traumatisme sonore implique des mécanismes cellulaires et moléculaires faisant l'objet de nombreuses recherches destinées à préciser la physiopathologie des atteintes auditives. Si la responsabilité du stress oxydatif dans l'altération des cellules ciliées externes et internes est largement démontrée, il semble que de nombreux facteurs de l'inflammation pourraient jouer un rôle protecteur ou inhibiteur dans les voies d'apoptose des cellules ciliées. Mais aujourd'hui il n'existe pas de système de prélèvement de liquide endocochléaire in vivo permettant d'envisager ce type d'investigations.

Afin de mener des essais cliniques pour préciser les causes moléculaires des altérations auditives, il est donc nécessaire de mettre au point un instrument permettant de réaliser des empreintes moléculaire et cellulaire endocochléaires in vivo. A terme, cet instrument serait utilisé chez les patients recevant un implant cochléaire, sans geste invasif supplémentaire que ceux prévus lors de cette opération chirurgicale. Notre objectif actuel est de développer un tel instrument et de faire la preuve de son efficacité dans un modèle animal, avant de proposer son utilisation chez les patients mal-entendants.

Après avoir validé in vitro la biocompatibilité de l'instrument que nous avons développé, nous souhaitons donc maintenant étudier chez 30 rats son efficacité pour prélever des échantillons de liquide endocochléaire scientifiquement exploitables. Ensuite, nous validerons sur 2 primates sa possible mise en œuvre dans des conditions les plus proches possibles que celles rencontrées en chirurgie humaine lors d'une implantation cochléaire. Pour minimiser le nombre d'animaux utilisés et éviter leur souffrance, un suivi clinique quotidien permettra d'adapter leur traitement antalgique et de veiller à leur bien-être.

L'étude d'efficacité et de tolérance sera menée sur 30 rats Wistar répartis en deux lots de 15 rats (effectifs requis pour l'exploitation statistique des résultats recueillis). Le premier lot permettra de prélever et caractériser le liquide cochléaire des animaux à l'état basal, et le deuxième lot (rats exposés à des doses ototoxiques de Gentamicine) permettra de valider l'efficacité de la technique proposée pour détecter des différences dans les concentrations protéiques de la périlymphe.

Phase 1 : Induction des lésions auditives. Après une semaine d'acclimatation la moitié des rats seront soumis à une injection intrapéritonéale de gentamicine à dose de 160 mg/kg/j pendant 5 jours

Phase 2 : Réalisation d'une empreinte protéomique à tous les animaux au cours d'une chirurgie sans réveil après exposition de la fenêtre ronde et de la cochlée pour son analyse en spectrométrie de masse MALDI.

Si la première expérimentation prouve l'efficacité de notre dispositif, nous vérifierons ensuite sa possible mise en œuvre dans les conditions des futurs essais cliniques. Nous souhaitons ainsi tester les conditions de prélèvement d'empreinte de liquide endocochléaire chez le primate, dans des conditions similaires à celles d'une implantation chirurgicale humaine. Indispensable avant de pouvoir proposer à l'ANSM un projet d'étude clinique, cette étude de faisabilité ne fera pas l'objet d'une évaluation statistique et nous proposons de la mener sur deux animaux utilisés à la fin d'un autre protocole dans le respect de la règle des 3R.

2300- L'une des activités principales de notre équipe est l'étude de capacités immuno-modulatrices de composés bactériens ou de bactéries entières vivantes. Nous nous intéressons essentiellement à des bactéries ayant le statut QPS européen (qualified presumption of safety, qui permet une utilisation en alimentation humaine) ou à des bactéries commensales non pathogènes (isolées chez des volontaires sains). Nous sommes également amenés à étudier des composés synthétisés par des bactéries recombinantes, qui sont alors capables de produire des molécules d'intérêts de natures diverses (protéines, lipides ou autres).

Notre démarche générale concernant ces composés est la suivante : lorsque nous avons accumulé des éléments nous convainquant d'une activité immuno-modulatrice (en général anti-inflammatoire), nous testons quelques bactéries candidates (ou composés bactériens) dans des modèles in vivo d'inflammation induite utilisant des souris (au maximum 1000 par an). Nous disposons en amont de cribles sur des lignées cellulaires (modèles in vitro) permettant de repérer des candidats. Nous avons également l'appui de médecins gastro-entérologistes parmi nos collaborateurs qui peuvent nous donner des pistes quant aux molécules à tester ou bien aux marqueurs les plus pertinents à suivre.

Notre protocole expérimental respecte la règle des 3 R : remplacement, réduction et raffinement. Les mécanismes étudiés mettent en jeu des interactions complexes au sein de l'hôte que la culture d'organes séparées ne saurait reproduire. Il est donc nécessaire de recourir à un modèle animal. Le modèle le plus approprié pour ces études est actuellement la souris. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum possible sans nuire à la qualité statistique des données. Les animaux sont hébergés dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (litière changée régulièrement, eau et nourriture à volonté, température et hygrométrie régulée,...). Enfin, la souffrance éventuelle des animaux sera minimisée autant que possible. L'ensemble de notre protocole est de plus soumis à l'approbation d'un comité éthique.

L'objectif final de ce projet est de pouvoir fournir des alternatives ou des compléments aux traitements actuels de pathologies du tube digestif : maladie de Crohn, rectocolique ulcéreuse (ces deux pathologies formant le groupe des IBDs), cancer du colon, syndrome de l'intestin irritable (IBS)...