



**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 (23)

2301- Les allergies alimentaires touchent 2 à 3,5% de la population adulte et 7 à 8 % des enfants dans l'Union Européenne. Elles représentent un véritable problème de santé publique et il n'existe pas aujourd'hui de traitement curatif pour ces maladies. Les conditions excessives d'hygiène dans les pays occidentaux limitent l'exposition des nouveau-nés aux microbes ce qui perturbe la colonisation de l'intestin par les bactéries commensales. Ces bactéries jouent un rôle important dans la maturation du système immunitaire. Un retard de colonisation est observé chez les enfants des pays industrialisés et une diversité réduite dans la composition du microbiote (ou flore) intestinal a été rapportée chez les enfants devenant allergiques par rapport à des enfants sains.

Le projet consiste à implanter des microbiotes complexes ou simplifiés (une bactérie en monoxénie) dans des souris sans germe, plus ou moins tardivement après la naissance de l'hôte, afin d'en étudier les répercussions sur la maturation du système immunitaire en relation avec le développement ultérieur d'une sensibilisation allergique. L'objectif est ainsi d'étudier les interactions entre l'hôte et son microbiote afin d'identifier les facteurs importants qui permettraient de prévenir le développement de l'allergie. Il n'existe actuellement pas d'alternative au modèle rongeur utilisé pour réaliser ce travail qui nécessite de faire naître les animaux en conditions stériles et qui se propose d'analyser des réponses immunologiques induites par les interactions entre l'hôte et son microbiote intestinal. Le nombre de 640 rongeurs, utilisés au cours de 10 études (6 procédures), avec 10 individus par lot expérimental, a été calculé pour obéir aux minima nécessaires à l'analyse des résultats à l'aide de tests statistiques non paramétriques et en permettre ainsi leur interprétation.

Les méthodes expérimentales ont été mises en place dans le respect de recommandations définies par la Directive Européenne 2010/63/UE. Le protocole de sensibilisation des animaux contre des protéines de lait de vache n'est pas douloureux et pour le test de réaction allergique, nous avons choisi un protocole qui n'induit pas de réaction violente (choc anaphylactique) chez l'animal. Enfin, les prélèvements de tissus biologiques sont réalisés après euthanasie de l'animal

2302- L'intestin héberge une communauté bactérienne résidente (microbiote), abondante et complexe, qui assure des fonctions essentielles pour la santé de l'hôte. Le projet de recherche concerne l'étude de mécanismes d'action impliqués dans les effets du microbiote sur la régulation du fonctionnement de l'épithélium intestinal.

La stratégie consiste à utiliser des animaux gnotobiotiques porteurs de microbiotes « à façon » puis à étudier les cellules intestinales pour identifier des « cibles » du microbiote intestinal. Nous cherchons ainsi à déterminer comment ces microorganismes interagissent avec leur hôte, quels sont les médiateurs de ces interactions. En effet, des travaux ont déjà démontré le rôle prépondérant du microbiote sur des fonctions essentielles du tractus digestifs. Le microbiote est notamment un acteur majeur de la maturation des cellules du tractus digestif : il participe à la structuration, au renouvellement (action stimulante) et à la fonctionnalisation du tissu épithélial. La composition du microbiote module cette action et, en cas d'altération prononcée de cette communauté, une hypothèse actuellement émise est que certaines altérations pourraient être des facteurs de risque de développement de pathologies digestives. Dans le cadre de nos travaux, nous nous intéresserons essentiellement aux rôles de maturation/fonctionnalisation et à la manière dont un microbiote défini (quelques espèces bactériennes) colonise le tractus digestif afin de mieux comprendre les interactions microbiote-hôte.

Nous travaillons sur rats ou souris, qui constituent des espèces de référence mondialement reconnues pour ce type de travaux, élevés dans des enceintes stériles ou isolateurs. L'élevage en isolateur permet d'obtenir des animaux dépourvus de microorganismes ou associés à une ou plusieurs souches (bactérie ou levure) sélectionnées pour produire spécifiquement un métabolite ou une protéine donnée. Nous estimons que nous utiliserons 200 animaux par an, soit un total de 1000 animaux sur la durée du projet. Dans le cadre de notre projet, nous effectuerons simplement des implantations de microbiotes définis, sans conséquences pathologiques a priori sur les animaux.

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 de cellules en tapis ne saurait reproduire. Il est donc nécessaire de recourir à un modèle animal. Le modèle le plus approprié pour ces études comprend actuellement l'utilisation de rongeurs (rats et souris). Le nombre d'animaux utilisés est réduit pour atteindre une valeur minimale 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,...). Les animaux bénéficient également d'un enrichissement de leur milieu (type feuille de cellulose, permettant une diminution du stress potentiel et la réalisation de petits nids par les animaux). Enfin, la souffrance éventuelle des animaux sera minimisée autant que possible et nous interviendrons immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

2303- Nous avons montré chez le rat que les cellules T CD8+CD45RClow sont régulatrices et qu'elles permettent d'induire une tolérance à l'allogreffe de cœur chez le rat. Chez l'Homme, nous avons montré que les T CD8+CD45RClow sont également régulatrices in vitro, et qu'elles peuvent être amplifiées à des fins de thérapie cellulaire, notamment dans le contexte de réaction du greffon contre l'hôte (GVH) lors d'une greffe de cellules hématopoïétiques et de rejet d'allogreffe lors de la transplantation d'organe solide.

L'objet de cette saisine est d'évaluer le potentiel thérapeutique des cellules Tregs CD8+CD45RClow dans 2 modèles de souris humanisées développés par le laboratoire, à savoir un modèle de GVH xénogénique induit par des cellules humaines (PBMCs) xénoréactives injectées chez la souris humanisée, et un modèle de rejet d'allogreffe de peau humaine par des cellules humaines (PBMCs) allogéniques injectées chez la souris NSG greffée.

Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie comme suit :

- Remplacer : Des études fonctionnelles ont été réalisées in vitro à partir de cellules humaines, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études in vivo. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité thérapeutique de ces cellules régulatrices dans un modèle vivo proche de l'Homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique est le modèle de souris dites «humanisées».

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit à 20, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (Log Rank test pour les courbes de survie, description des tests statistiques utilisés détaillée ci-après). Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le nombre total maximum d'animaux est de 160.

-Raffiner : Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids, le développement de la GVH et/ou du rejet de greffe et des prélèvements sanguins seront effectués tous les 15 jours pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris NSG. Tous les animaux traités avec les cellules régulatrices et ceux des groupes contrôles seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les organes dues à la réaction de GVH et dans le greffon, et par immunohistologie pour étudier la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action.

Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique des Tregs CD8+CD45RClow sur les réponses immunes intervenant dans des contextes de GVH et d'allogreffe, aideront à déterminer le nombre de cellules à administrer chez un patient pour le traiter, et permettront de mieux comprendre leurs mécanismes d'action par les analyses anatomopathologiques des organes des souris traitées. Cette étude est soutenue par l'INSERM transfert, les Tregs CD8+CD45RClow faisant l'objet de 2 brevets quant à leur potentiel thérapeutique clinique prometteur dans le domaine de la transplantation d'organe solide et de cellules, mais aussi pour le traitement de maladies autoimmunes. La validation de ces cellules dans ce modèle préclinique de souris humanisée est la dernière étape indispensable avant les tests cliniques.

2304- Les reins sont les organes qui assurent la filtration du sang et la production de l'urine. Chaque rein est constitué d'environ un million d'unités distinctes, les néphrons. Chaque néphron comporte un glomérule et un tubule. Les néphrons sont séparés les uns des autres par le tissu interstitiel. L'urine formée dans les reins est transportée par les uretères jusqu'à la vessie où elle est stockée jusqu'à son élimination. Le glomérule est l'unité spécialisée dans l'ultrafiltration du plasma pour l'élaboration de l'urine primitive dans le rein. Les podocytes (cellules du glomérule) et leurs pédicules (prolongements) forment un premier maillage pour obtenir cette urine primitive. Lorsqu'un dysfonctionnement des podocytes apparaît, une néphropathie se développe. Cette néphropathie est caractérisée par une protéinurie progressive induisant un œdème et une inflammation interstitielle et une fibrose rénale. Elle est présente dans différentes pathologies comme le diabète, le syndrome néphrotique idiopathique et d'autres pathologies caractérisées par des dommages rénaux en particulier au niveau des glomérules. Dans la pathologie chronique où les lésions glomérulaires et la fibrose sont installées, les traitements actuels permettent de ralentir l'avancée de la pathologie mais pas de réparer les dommages. En dernier recours, le patient devra subir une thérapie de remplacement d'organe (dialyse ou transplantation de rein).

Afin d'évaluer de nouveaux candidats médicaments, des modèles animaux reproduisant cette pathologie sont développés dont un modèle de néphropathie induite par l'adriamycine (ADR). Cette molécule, agent antitumoral à large spectre d'action, induit des dommages rénaux, particulièrement au niveau des podocytes dans le glomérule. Les modifications morphologiques des glomérules observées chez le rat traité avec l'ADR sont alors proches de celles observées chez l'Homme au cours des syndromes néphrotiques.

L'efficacité des traitements préventifs ou curatifs restant un enjeu majeur pour la recherche pharmacologique, l'objectif de ce projet est de pouvoir évaluer l'effet de candidats médicaments et/ou de molécules de référence sur la perte de fonction et sur les dommages glomérulaires induit par l'ADR.

La fréquence et le nombre d'études réalisées par an sera fonction des demandes de nos Clients dans le cadre d'une activité de prestation de service. Cependant, nous pouvons estimer que le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 1350 rats (15 animaux par groupe : minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou de doses à tester. Néanmoins, les tests statistiques réalisés sur les données recueillies pendant l'expérimentation et lors du sacrifice seront fonction de leur distribution. La plupart du temps il s'agit de l'ANOVA one-way suivi du test le plus adapté au protocole. Pour les données recueillies au cours du temps comme le poids des animaux, les données plasmatiques et urinaires pourront aussi être évaluées par une two-way ANOVA.

Les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement d'hébergement (type play tunnel en polycarbonate, aspen brick) sera introduit. De plus, l'état des animaux sera observé tous les jours.

2305- La prévalence des maladies cardiovasculaires (MCV) est importante à travers le monde et elles représentent un enjeu majeur de santé publique. Les High-density lipoproteins (HDL) exercent une action protectrice contre les MCV et de nombreuses études montrent une relation inverse entre le taux de HDL plasmatique et la survenue de MCV. De plus, un taux significativement bas de HDL augmenterait le risque de survenues de MCV. Les données de la littérature ont souligné l'effet bénéfique de l'infusion de HDL reconstituées sur des modèles animaux hypercholestérolémiques (Badimon JJ., J Clin Invest, 1990). Cependant, lors de récentes études d'intervention, le développement de nouvelles voies thérapeutiques visant à augmenter chez l'homme le taux de HDL plasmatique n'a pas été accompagné d'effets bénéfiques. La pertinence de l'augmentation du taux de HDL dans la circulation comme traitement des MCV soulève la question de la qualité des HDL et de leurs propriétés fonctionnelles. L'une des propriétés athéroprotectrices des HDL résiderait dans leur capacité à stimuler la réparation vasculaire. Cependant, les HDL de sujets atteints de pathologies cardiovasculaires, de maladies rénales ou de diabète semblent perdre cette propriété. Le diabète est une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie qui conduit à un risque accru de développement de MCV comme l'athérosclérose et qui est associé à un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire. Ainsi, les HDL semblent impliquées dans le fonctionnement de l'endothélium vasculaire or peu d'informations permettent d'établir le lien entre leur phénotype et leur potentiel sur la réparation vasculaire. En utilisant un modèle de souris diabétiques nous souhaitons analyser le rôle de différents types de HDL sur la réparation vasculaire.

2306- Chez l'homme comme chez tous les animaux vertébrés, de nombreux paramètres (comportementaux, hormonaux et biochimiques) présentent des rythmes circadiens (ex cycles de veille/sommeil) d'origine endogène, c'est ce que l'on appelle communément « l'horloge interne ». Ils sont en outre modulés par l'alternance lumière/obscurité sur 24h. Ces rythmes coordonnent l'activité de la plupart des grands systèmes physiologiques de l'organisme qui fluctuent suivant le moment de la journée (ex : pression artérielle, température corporelle,...). Parmi ceux-ci, le rythme de la température corporelle est un des plus pertinents et des plus stables chez le rongeur car résultant de plusieurs composantes.

L'objectif de ce projet est de suivre le rythme circadien de rats et de souris au moyen d'un simple capteur électronique implanté sous la peau ou dans l'abdomen et qui va permettre l'enregistrement à distance par télémétrie de la température corporelle en continu.

Des perturbations de ces rythmes mimant des situations « naturelles » (décalage du cycle jour/nuit, obscurité totale, ou mise en isolement) seront réalisées pour évaluer la capacité de composés à restaurer ces rythmes. Ces modèles de désynchronisation des rythmes circadiens sont représentatifs de l'état de certains patients atteints par des maladies psychiatriques (dépression, anxiété, schizophrénie) ou neurologiques (Alzheimer, Parkinson). L'intérêt de ce projet sera donc de sélectionner chez le rongeur les meilleurs candidats médicaments susceptibles de resynchroniser les rythmes de patients atteints de maladies neuropsychiatriques.

L'étude des rythmes circadiens et de leur modulation par des candidats médicaments ne peut être mise en œuvre que dans un organisme entier et complexe, possédant ainsi de façon intégrée tous les paramètres comportementaux, biochimiques et physiologiques soumis à des rythmes circadiens, il n'y a pas de méthode alternative à l'utilisation de l'animal.

Rats et souris jeunes adultes présentent un rythme endogène très similaire à celui de l'homme ce qui justifie leur choix d'utilisation dans le projet. Et si le rat présente une plus forte similitude de rythme avec l'homme, la souris présente quant à elle l'avantage de disposer de modèles transgéniques qui vont permettre d'évaluer les effets de modifications génétiques, et la capacité des composés à s'y opposer.

Le système d'enregistrement de la température corporelle en continu offre par lui-même des avantages allant dans le sens d'un raffinement pour les animaux : il rend possible le suivi individuel au sein d'un groupe social vivant dans une même cage, et le suivi des paramètres à distance évite le stress provoqué par les interactions directes avec l'homme. Il concourt également à la réduction du nombre d'animaux en permettant qu'un même animal une fois implanté soit utilisé au cours de plusieurs expériences successives, intercalées de périodes de repos (wash-out). Enfin, il permet de détecter à tout moment l'occurrence d'une hypothermie ou hyperthermie qui si elles s'avèrent trop prononcées vont constituer un des points limites applicables à l'expérimentation.

Par ailleurs, les cages d'hébergement de souris sont enrichies par des tubes de cellulose « nesting material ». Tous les animaux font l'objet d'un suivi quotidien réalisé par les expérimentateurs et le personnel zootechnique. Ce suivi est accru pour les lignées de souris transgéniques susceptibles de présenter un phénotype dommageable.

Le choix des doses de composés à utiliser sera adapté en fonction des résultats obtenus lors des tests de sécurité réalisés en amont, pour définir une dose efficace et ainsi éviter de multiplier les expérimentations et en conséquence le nombre d'animaux utilisés.

Après les premières études pharmacologiques, les données seront réunies pour réaliser une consultation statistique et réajuster le nombre d'animaux par groupe expérimental au strict minimum nécessaire pour apporter des conclusions expérimentales adéquates dans ce projet.

On peut estimer le nombre de rongeurs (rats et souris) nécessaires à la conduite de ce projet sur 5 ans à 2880.

2307- Notre projet vise à mieux définir les protéines virales et cellulaires impliquées dans le contrôle de la réplication d'un pathogène majeur de la volaille, le virus de la maladie de Marek. Pour les identifier nous devons disposer d'anticorps monoclonaux, réactifs monospécifiques que nous sommes obligés de produire dans la mesure où nous ne pouvons pas les trouver dans le commerce.

Chez les animaux la production d'anticorps est induite à la suite d'une exposition à un antigène qui peut être de nature infectieuse. Les vertébrés ont la possibilité de reconnaître un nombre quasi illimité d'antigènes et d'élaborer contre ces antigènes une réponse anticorps. Les anticorps sont des glycoprotéines solubles, sécrétées par les lymphocytes B, et présentent l'intérêt de pouvoir se lier avec une grande affinité à un épitope, région définie de l'antigène contre lequel ils sont dirigés. Les anticorps ont été largement utilisés comme « traceurs » pour identifier les marqueurs viraux et cellulaires. Depuis 1975 il est possible de sélectionner in vitro des cellules (hybridomes) synthétisant des anticorps monoclonaux dirigés contre un épitope sur un antigène d'intérêt. La genèse de ces hybridomes fait appel à une fusion entre des lymphocytes B isolés d'une souris immunisée avec l'antigène d'intérêt et des cellules de myélome murin. A la suite de la fusion les cellules hybrides (hybridomes) sont sélectionnées. Les laboratoires disposent ainsi d'une source en théorie inépuisable de cellules produisant un anticorps spécifique de protéines virales ou cellulaires.

Au plan de l'expérimentation animale, l'obtention de lymphocytes de souris immunisées suppose i) l'injection aux animaux expérimentaux de l'antigène d'intérêt avec un adjuvant ii) la récupération des ganglions drainants la région dans laquelle l'antigène a été injecté pour en extraire les lymphocytes qui seront ensuite fusionnés in vitro. Les exigences de remplacement /réduction/raffinement sont prises en considération de la manière suivante :

☑ Remplacement : même si quelques publications ont fait état de la possibilité d'immunisation in vitro, le recours à l'animal pour fournir les lymphocytes est incontournable. Le choix de l'immunisation avec un cocktail d'antigènes inertes (non réplicatifs) correspond à un impératif scientifique, celle-ci étant plus efficace que tout autre procédure pour induire une réponse immune de qualité

☑ Réduction : nous utilisons le nombre minimal de souris par expérience : 1 antigène / 1 souris. En cas de programme d'immunisation multivalente on pourra envisager l'injection de 2 antigènes chez un seul animal.

☑ Raffinement : les animaux seront conservés en animalerie adaptée (niveau A1) pour une durée de 21 jours (une souris par événement de fusion) avec enrichissement (sopalin). Les souris seront en cage de 2 individus et la distinction entre individus sera faite par application d'une marque (coup de marqueur sur le dos) renouvelée une à deux fois au cours de la procédure d'immunisation.

Le nombre maximum d'animaux utilisés sera de 20

2308- L'aquaculture représente une alternative aux prélèvements de poissons sauvages dans la nature pour l'alimentation humaine. La carpe est l'espèce la plus importante en masse pour la pisciculture à l'échelle mondiale

Pour améliorer les conditions d'élevage des animaux, diminuer ou annuler l'impact des maladies et contribuer à rendre l'aquaculture plus "durable", le développement de vaccins et la sélection d'animaux naturellement plus résistants constituent les deux approches majeures.

Ce projet de recherche vise à mieux comprendre les mécanismes de défense des poissons contre leurs pathogènes pour développer de nouveaux vaccins contre des virus pour lesquels aucun vaccin n'est disponible ou pour lesquels les vaccins disponibles ne sont pas parfaitement efficaces. Les poissons sujets à infection expérimentale et ou vaccination sont analysés par différentes approches immunologiques et moléculaires.

Ce projet s'inscrit dans une démarche compatible avec la règle des 3R:

- les lignées cellulaires (in vitro) sont utilisées chaque fois que cela est possible par exemple pour pré-évaluer l'activité d'adjuvants

- nous veillons à réduire les effectifs de poissons autant qu'il est possible pour obtenir des résultats significatifs, en tenant compte des mortalités estimées

- nous effectuons les expériences dans un environnement optimal pour les animaux. Les animaux sont gardés en lots et constituent les uns pour les autres un élément important d'enrichissement du milieu. Il doit être noté qu'il est important de ne pas introduire dans les bacs des objets sur lesquels les poissons se frottent: même lorsqu'ils ne se blessent pas ce faisant, l'intégrité du mucus est souvent altérée ce qui fragilise l'animal.

Nous prévoyons d'utiliser au total 950 poissons pour ce projet qui se décline en 3 procédures qui pourront être répétées.

Les expériences durent de 3 à 6 semaines pour des infections expérimentales; pour des vaccinations, les animaux sont gardés le temps que la réponse non spécifique soit très atténuée, c'est à dire entre 2 et 6 mois selon les protocoles. Les groupes sont de 10 animaux environ pour effectuer des prélèvements ou de 30 pour évaluer l'efficacité de l'immunisation.

Les prélèvements sont faits post-mortem (sauf prélèvements de sang).

L'ensemble des procédures proposées ne pourrait être mis en oeuvre dans des modèles in vitro, dans la mesure où les propriétés de sensibilité, ou de réponses aux infections sont à l'échelle de l'individu, et dans une dynamique temporelle de quelques semaines à quelques mois; toutes les procédures sont définies et validées et sont mises en oeuvre dans le souci de respecter la règle des 3R.

Les expériences sont de deux types : (1) sur de jeunes carpes (2 à 10 g), des immunisations expérimentales/vaccinations sont effectuées par bain ou par injection puis (2) des infections expérimentales par bain ou injection sont pratiquées pour tester l'efficacité et les modalités de la vaccination; on analyse aussi les modalités de la réponse sur des tissus prélevés post-mortem ou sur le sérum.

2309- Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent pathogène responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Le SIDA est l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Les traitements antirétroviraux permettent un contrôle efficace de la réplication virale mais ne conduisent pas à l'éradication du virus du fait de l'existence de réservoirs viraux. Les réservoirs viraux sont constitués de cellules infectées où le virus demeure à l'état latent. Ces cellules infectées latentes ne sont pas reconnues par le système immunitaire et ne sont donc pas éliminées car elles n'expriment aucun antigène viral. A tout moment, ces cellules latentes peuvent se réactiver et produire des particules virales dans l'organisme. Les traitements antirétroviraux n'atteignent pas ces cellules infectées latentes car elles sont localisées dans des compartiments cellulaires ou des sites anatomiques peu ou pas perméables à une pénétration efficace des molécules antirétrovirales. Les réservoirs viraux constituent ainsi une barrière pour l'éradication du VIH chez les patients infectés chroniquement malgré un traitement antirétroviral prolongé.

Une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de la constitution et de la persistance des réservoirs viraux sous traitement antirétroviral et du contrôle de la réplication virale après arrêt des traitements est aujourd'hui nécessaire pour permettre une amélioration de l'efficacité des traitements et étudier de nouvelles approches thérapeutiques pouvant conduire à une guérison fonctionnelle (absence de progression clinique en l'absence de traitement) ou à l'éradication de l'infection.

Les objectifs de ce projet sont : 1) de mettre en place un modèle animal reproduisant la situation des patients infectés chroniquement et traités sur le long terme pour rechercher et caractériser les réservoirs viraux tissulaires et cellulaires ; 2) d'étudier l'impact du délai d'initiation d'un traitement antirétroviral sur la constitution et la persistance des réservoirs viraux et le contrôle de la réplication virale après arrêt du traitement. Le modèle animal choisi pour ce projet est le primate non humain (PNH). Le modèle d'infection expérimentale du PNH par des souches pathogènes du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) est particulièrement adapté pour ces études. Le PNH constitue le seul modèle expérimental reproduisant l'infection par le VIH. L'évolution de l'infection est semblable à celle observée chez l'Homme. Ce modèle est le plus pertinent pour obtenir des résultats prédictifs et transposables à l'Homme.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 104 animaux nés et élevés dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (inoculation virale, prélèvements de sang et de fluides muqueux sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés). Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés par paires avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

2310- Environ 350 millions de personnes sont atteintes de dépression à l'échelle mondiale et près de la moitié n'ont pas accès à un traitement efficace. La résistance aux traitements pharmacologiques classiques est un phénomène de plus en plus décrit dans la littérature. Par conséquent, le développement d'alternatives et l'amélioration de l'arsenal thérapeutique existant sont devenus des problématiques majeures pour les patients pharmaco-résistants. Ces dernières années, un progrès considérable a été accompli dans la stimulation électrique (stimulation cérébrale profonde) et superficielle (stimulation magnétique trans-crânienne) des zones cérébrales dysfonctionnelles chez les individus déprimés. Malgré sa précision, la stimulation cérébrale profonde reste une méthode lourde et invasive à laquelle peu de patients acceptent d'avoir recours et d'autre part, la stimulation magnétique, non-invasive, n'offre encore que de faibles discriminations spatiales et profondeurs de stimulation, limitant ainsi l'utilisation de ces deux techniques. Récemment, il a été démontré que la stimulation par ultrasons pouvait modifier l'activité électrique de certaines zones cérébrales ciblées, de façon précise et non-invasive. Cependant, cette nouvelle méthode n'a toujours pas été utilisée afin d'induire une réversion des états dépressifs.

L'objectif de cette étude sera alors 1) de démontrer la faisabilité de la stimulation cérébrale ultrasonore d'une région précise du cerveau impliquée dans la physiopathologie de la dépression dans un modèle animal de dépression et 2) d'observer si cette stimulation permet de réverser de façon durable les symptômes de la dépression. Ce projet vise à développer une alternative thérapeutique aux patients pharmaco-résistants.

Cette demande d'autorisation de projet correspond à la partie imagerie du projet déposé et autorisé initialement dans un établissement utilisateur (EU) voisin. Elle est soumise ici dans cet autre EU car la procédure décrite dans le présent document nécessite l'utilisation d'un imageur scintigraphique, uniquement présent dans l'EU. Pour cette procédure, 88 souris réparties en 8 lots sont requises (n=12 pour les lots 1 à 6 et n=8 pour les lots 7 et 8).

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

Raffinement : le stress traumatique appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen, en raison de sa brièveté, comparé à ce qui est pratiqué dans d'autres laboratoires. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chronique chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du

comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire *in vitro* n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle. Les souris seront uniquement mâles, afin d'éviter les variations comportementales provoquées par le cycle menstruel de la femelle et ainsi réduire le nombre total d'animaux. De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

2311- L'aquaculture représente une alternative aux prélèvements de poissons sauvages dans la nature pour l'alimentation humaine. Pour améliorer les conditions d'élevage des animaux, diminuer ou annuler l'impact des maladies et contribuer à rendre l'aquaculture plus "durable", le développement de vaccins et la sélection d'animaux naturellement plus résistants constituent les deux approches majeures.

Ce projet de recherche vise à

- mieux comprendre les mécanismes de défense des poissons contre leurs pathogènes pour développer de nouveaux vaccins contre des virus pour lesquels il n'en existe pas ou pour lesquels les vaccins existants ne sont pas parfaitement efficaces. Les poissons sujets à infection expérimentale et ou vaccination sont analysés par différentes approches immunologiques et moléculaires.

- identifier les bases génétiques de la résistance de la truite aux virus afin de pouvoir sélectionner de manière ciblée des animaux plus robustes et moins sensibles aux maladies. La sensibilité de différentes souches (lignées isogéniques) de poissons à l'infection est déterminée et analysée.

Ce projet s'inscrit dans une démarche compatible avec la règle des 3R:

- les lignées cellulaires (*in vitro*) sont utilisées chaque fois que cela est possible par exemple pour pré-évaluer l'activité d'adjuvants; nous avons ainsi développé des lignées cellulaires à partir des différentes lignées isogéniques de truite que nous étudions

- nous veillons à réduire les effectifs de poissons autant qu'il est possible pour obtenir des résultats significatifs, en tenant compte des mortalités estimées pour chaque fond génétique

- nous effectuons les expériences dans un environnement adapté autant que possible aux truites. Les animaux sont gardés en lots et constituent les uns pour les autres un élément important d'enrichissement du milieu. Il doit être noté qu'il est important de ne pas introduire dans les bacs des objets sur lesquels les poissons se frottent; la truite arc-en-ciel peut se blesser sur des objets apparemment anodins.

Ce projet se décline en 4 procédures qui pourront être répétées plusieurs fois, le nombre total d'animaux utilisés est 2840.

Les expériences sont de deux types : (1) sur des alevins, on effectue des infections expérimentales par bain pour évaluer la sensibilité naturelle de différentes souches (2) sur des adultes, on effectue des vaccinations et on teste par infection expérimentale par bain ou injection, l'efficacité et les modalités de la vaccination.

Les expériences durent de 3 à 6 semaines pour des infections expérimentales; pour les tests de vaccination, les animaux sont gardés le temps que la réponse non spécifique ait retrouvé son niveau basal, c'est à dire entre 2 et 6 mois selon les protocoles. Les groupes sont de 10 animaux pour effectuer des prélèvements ou de 100 au plus pour évaluer la sensibilité.

L'essentiel des prélèvements est fait post mortem (sauf prélèvements de sang).

L'ensemble des procédures proposées ne pourrait être mis en œuvre dans des modèles *in vitro*, dans la mesure où les propriétés de sensibilité, ou de réponses aux infections sont exprimées à l'échelle de l'individu, et dans une dynamique temporelle de quelques semaines à quelques mois; toutes les procédures sont définies et validées et sont mises en œuvre dans le souci de respecter la règle des 3R.

2312- L'objectif général du projet FISHBOOST est d'améliorer l'utilisation de la sélection génétique aquacole en Europe pour les 6 principales espèces de poissons d'élevage : saumon, truite, bar, daurade, carpe et turbot.

Dans l'objectif spécifique d'évaluer le potentiel génétique pour la sélection indirecte de l'efficacité alimentaire du bar (*Dicentrarchus labrax*), les expérimentations faisant l'objet de la présente demande d'autorisation, porteront sur l'évaluation expérimentale d'une sélection indirecte pour l'efficacité alimentaire, utilisant la perte au jeûne comme critère indicateur.

Sélectionner pour l'efficacité alimentaire est essentiel pour assurer la durabilité de l'aquaculture, en permettant de réduire les quantités d'aliment consommée et la pollution par les déjections, pour une même quantité de poisson produite.

Ce projet utilisera 1300 individus issus de 30 mères issues de 3 lignées différentes (1 lignée sauvage ouest méditerranée et 2 lignées sélectionnées divergentes pour la perte au jeûne) et de 80 pères issus de 5 lignées différentes (une lignée sauvage Ouest méditerranée, et 4 lignées sélectionnées divergentes croissance +/- et perte au jeûne +/-).

Afin d'estimer les différences génétiques d'efficacité alimentaire (EA) entre les lignées et entre les familles à l'intérieur des lignées, deux expérimentations seront mises en œuvre:

- i) Ces animaux seront évalués pour leur efficacité alimentaire de groupe: pour ce faire l'aliment distribué à chaque bac est pesé chaque jour sur deux périodes consécutives de 4 semaines, les poissons étant pesés en début et fin de chaque période.

- ii) Les poissons seront évalués pour leur perte au jeûne au cours d'un challenge alternant 2 cycles successifs de 3 semaines de mise à jeun suivies de 3 semaines d'alimentation *ad libitum* (permettant une croissance compensatrice effaçant la perte liée à la période de jeûne).

Pour répondre à la question de la possibilité de sélectionner pour l'efficacité alimentaire, il n'est pas possible de remplacer l'expérimentation animale, l'efficacité alimentaire étant la résultante d'une combinaison complexe de comportement

(ingestion, activité spontanée), efficacité de la digestion et du métabolisme, orientation métabolique de l'énergie ingérée,... Le Remplacement n'est donc pas possible en l'état. Le Raffinement ou optimisation est abordé par la possibilité d'utiliser des critères indirects pour sélectionner l'efficacité alimentaire, à savoir ici la croissance et la tolérance au jeûne. Par ailleurs, les poissons sont manipulés uniquement sous anesthésie pour limiter la souffrance et l'angoisse liées à ces manipulations. Pour ce qui est de la Réduction, le nombre d'animaux mesurés a été calibré au minimum en fonction des écarts attendus d'après les expérimentations antérieures, et le nombre de parents calibré pour que les groupes évalués soient bien représentatifs des différentes lignées sélectionnées

2313- L'objectif du projet est de mettre en place une méthode d'évaluation de l'efficacité alimentaire individuelle chez le bar et d'évaluer la variabilité génétique de cette efficacité alimentaire. L'objectif finalisé est de permettre une sélection sur l'efficacité alimentaire, qui n'est actuellement pas efficace du fait de l'absence de méthodes d'évaluation individuelle. Le bénéfice en serait une réduction de l'empreinte écologique des élevages (moins d'aliments consommés, moins de déchets produits). Le projet comportera 4 phases: - Phase 0 : mise au point de la méthode de mesure (200 poissons maximum - procédure 2) - Phase 1 : évaluation d'un lot de poissons A issu de lignées sélectionnées pour leurs caractéristiques de croissance et de tolérance au jeûne, qui sont potentiellement des indicateurs indirects de l'efficacité alimentaire (700 poissons - procédures 1 et 3) - Phase 2 : évaluation de l'efficacité alimentaire individuelle de 300 poissons du lot A et évaluation de la variabilité génétique inter et intra-lignée (procédure 2) - Phase 3: évaluation de l'efficacité alimentaire individuelle de 500 poissons d'un lot B et recherche de marqueurs génétiques (SNP) liés à cette capacité (procédures 1 et 2)

Les effectifs ont été calculés à partir de données d'expérimentations précédentes et de la littérature pour assurer une puissance de détection suffisante des effets escomptés (Réduction). La mise au point d'une méthode fiable d'évaluation de l'efficacité alimentaire, objet du présent projet, pourrait permettre une sélection plus efficace en disposant d'un critère plus lié au caractère d'intérêt que les critères indirects actuels. Pour réduire la souffrance et l'angoisse, les animaux sont manipulés uniquement sur anesthésie pour toutes les mesures individuelles, et sont disposés dans des aquariums leur permettant un contact visuel avec des congénères (Raffinement). La détection de marqueurs génétiques liés à l'efficacité alimentaire permettrait enfin à terme de remplacer au moins en partie l'évaluation phénotypique des animaux (Remplacement).

2314- La ribavirine a été utilisée comme antiviral à large spectre pour traiter de nombreuses maladies virales en association avec l'interféron et maintenant d'autres antiviraux. De fait, la ribavirine induit un vieillissement prématuré des globules rouges dont la durée de vie est fortement diminuée et conduit à l'anémie, un effet indésirable gênant qui contraint certains patients à arrêter leur traitement malgré son efficacité. Nous avons démontré grâce à un test in vitro que la DHEA (déhydroépiandrostérone) pouvait grandement inhiber cet effet. Avant d'envisager une application clinique, nous devons vérifier cet effet chez l'animal et nous proposons d'utiliser la souris comme modèle. Un groupe de 180 souris sera traité par la ribavirine à différentes doses pour vérifier l'induction de l'hémolyse ou par l'association ribavirine-DHEA toujours à différentes doses pour vérifier l'effet bénéfique de la DHEA empêchant l'hémolyse, 20 souris ne recevront que de la DHEA et serviront de groupe témoin. Nous travaillerons sur 5 groupes de souris traitées par différentes concentrations de ribavirine comportant chacun 6 sous-groupes traités par différentes concentrations de DHEA de 6 souris chacun, plus un groupe témoin sans ribavirine comportant 4 sous-groupes de 5 souris chacun, nombre minimal nécessaire pour appliquer notre test-statistique, avoir un échantillon assez représentatif avec une marge d'erreur minimale et ainsi avoir des données crédibles et extrapolables à de plus grands échantillons, notre but étant de démontrer de façon certaine que la DHEA a un effet inhibiteur de l'hémolyse induite par la ribavirine chez l'animal et pas seulement in vitro.

Les souris seront observées tous les jours afin de détecter le moindre changement d'aspect ou de comportement (physiologique, sanitaire...) qui pourrait être révélateur d'une souffrance physique ou psychique. Cette surveillance se fera selon des critères bien définis qui mèneront à des actions correctives dans le souci du bien-être de l'animal et afin de prévenir toute souffrance ou détresse inutiles. Les souris seront gardées dans des cages collectives munies du nécessaire et enrichies à l'aide de litières foisonnante et absorbante, d'une roue... dans des locaux calmes avec camouflage sonore des bruits stressants. Chaque souris sera marquée à l'aide d'un transpondeur.

Cet essai est indispensable avant d'envisager une application chez l'homme et n'a encore jamais été réalisé. En effet l'association DHEA-ribavirine pourrait être intéressante dans le traitement de l'hépatite E chronique puisqu'il pourrait améliorer la qualité de vie des malades traités par ribavirine en diminuant un de ses effets indésirables majeurs : l'anémie hémolytique

2315- La fièvre Q est une maladie transmissible de l'animal à l'homme et est causée par une bactérie intracellulaire appelée *Coxiella burnetii* dont il existe plusieurs souches aux propriétés probablement différentes. Les souches de *C. burnetii* responsables d'épidémies en Guyane et en Hollande semblent présenter une forte virulence (1-4). La maladie peut se présenter sous une forme aiguë, parfois asymptomatique. Parfois au contraire, elle court sur plusieurs mois ou années avec des atteintes des organes profonds, en particulier les valves cardiaques. L'isolement de la bactérie étant très fastidieux, le diagnostic repose essentiellement sur la détection des anticorps associée au tableau clinique.

Chez l'homme, l'élévation sanguine du taux d'anticorps dirigés contre la bactérie apparaît plus grande avec la souche de Guyane qu'avec la souche de référence anciennement isolée et nommée Nine Mile. (1,2) Chez la souris, les résultats préliminaires du projet précédent, confirment que les anticorps dans le sang s'élèvent davantage avec les souches épidémiques de Guyane et de Hollande qu'avec la souche Nine Mile. Chez l'homme comme chez la souris, les anticorps sont produits par des cellules d'origine lymphatique dont les précurseurs sont des lymphocytes de type B et dont l'origine ne

dépend pas de la glande productrice de lymphocytes appelée thymus (origine non thymique). Cependant, les lymphocytes B ont besoin d'être activés par d'autres lymphocytes appelés lymphocytes T qui eux dépendent du thymus. La défense de l'organisme vis-à-vis de l'infection connaît donc une étape dépendante des cellules d'origine thymiques (étape thymo-dépendante) et d'une étape dépendant des cellules d'origine non thymique (thymo-indépendante). La reconnaissance de la bactérie par ces lymphocytes va ainsi conditionner la production d'anticorps et donc la capacité de l'organisme à se défendre vis-à-vis de l'infection.

Afin de connaître lequel de ces mécanismes thymo-dépendant ou thymo-indépendant est impliqué dans les différences en terme de production d'anticorps observées avec les souches épidémiques, nous souhaitons utiliser des animaux au terrain immunitaire modifié.

Le projet consiste à mettre au point un modèle d'infection par *C. burnetii* sur des souris déficitaires en lymphocytes T (souris Nudes) et de comparer la réponse obtenue à celle de souris porteuses d'un déficit immunitaire combiné sévère (SCID) dépourvues de lymphocytes B et de lymphocytes T, ainsi qu'à celle de souris sans déficit lymphocytaire (BALB/c).

Les animaux seront infectés par aérosolisation dans une chambre d'exposition du corps entier. Les souris seront ensuite hébergées en cage de 5 animaux placées dans l'isolateur prévu à cet effet. Pour le confort de l'animal, un enrichissement de type igloo sera introduit. Ce projet mettra en œuvre des méthodes très peu invasives : l'exposition à l'aérosol est inodore et non irritante, les souris ne seront pas contraintes mais placées dans un panier grillagé où elles seront libres de se déplacer durant l'aérosolisation qui dure 1 heure. Les prélèvements d'organe et de liquides biologiques seront réalisés en post mortem immédiat ce qui permettra de réaliser les dosages d'anticorps (sérologies), de doser des médiateurs de l'inflammation dans le sang (cytokines) régulant la réponse inflammatoire. Des manipulations ultérieures seront effectuées par une étape *in vitro* sur les cellules de la rate (splénocytes).

Le projet nécessitera 90 animaux (trois groupes de 30 animaux).

Ce projet sera réalisé dans un laboratoire de sécurité microbiologique de classe 3.

2316- Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est responsable d'une pandémie touchant 35 millions de personnes qui continue de s'étendre avec plus de 2 millions de nouvelles infections chaque année. Un vaccin serait le moyen le plus efficace contrôle la pandémie. Toutefois, après 30 ans de recherches, nous ne disposons pas d'un vaccin capable de prévenir l'infection ni de contrôler la progression de la maladie.

Nous nous proposons d'étudier les mécanismes de production à long terme d'anticorps neutralisants, qui fait défaut chez la plupart des patients. Ces anticorps anti-VIH à longue durée de vie sont produits par les plasmocytes et sont issus d'un processus complexe de maturation impliquant des structures appelées centres germinatifs (CG). Dans ces structures, les interactions entre différents types de lymphocytes permettent la production à long terme d'anticorps neutralisants. Chez la plupart des patients infectés par le VIH, les anticorps neutralisants apparaissent trop tardivement et transitoirement.

Chez le primate non humain (PNH) infecté par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV), une cytokine inflammatoire régulant le fonctionnement du CG, nommée BAFF, est présente à des concentrations élevées. Notre hypothèse est que la surproduction de BAFF, en altérant le fonctionnement du CG, limiterait la production d'anticorps spécifiques du virus, ce qui contribuerait à empêcher la résolution de l'infection et favoriserait le passage en phase chronique.

Les objectifs de ce projet sont :

- 1) de caractériser les anomalies de CG lors des premières semaines de l'infection, phase décisive pour le contrôle ultérieur de la réplication virale,
- 2) de mettre en évidence le rôle de BAFF dans l'échappement du virus au contrôle du système immunitaire lors de la primo-infection par le VIH.

Le modèle animal choisi pour ce projet est le PNH infecté par le SIV, seul modèle expérimental reproduisant l'infection de l'homme par le VIH. L'évolution de l'infection dans ce modèle est semblable à celle observée chez l'homme.

Le projet prévoit au maximum 22 animaux nés et élevés dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : immunisations, inoculation virale, traitements et prélèvements de sang sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés par paires avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

2317- Certaines bactéries entéropathogènes (Salmonelles, Shigelles, Yersinia, E. coli...) sont un problème majeur de santé publique et sont responsables d'infections digestives provoquant la mort de 5 à 10 millions d'enfants par an dans les pays en voie de développement. La virulence de ces bactéries est en partie due à un système d'injection de leurs protéines effectrices appelé injectisome.

Alors que les protéines effectrices injectées au moyen de l'injectisome sont variées et dépendent de la spécificité du pathogène, trois des protéines structurales composant l'injectisome sont relativement bien conservées parmi les différentes bactéries pathogènes. Des résultats issus de la littérature ont montré que certaines de ces protéines, fortement impliquées dans la virulence des bactéries, sont des cibles de choix pour lutter contre des infections opportunistes impliquant des bactéries pathogènes, et ce dans un contexte d'antibiorésistance qui ne fait que s'aggraver.

Nous nous proposons d'étudier l'effet protecteur induit soit par vaccination (immunothérapie active) de rongeurs avec des protéines structurales de l'injectisome des bactéries entéropathogènes citées précédemment, soit induit par administration d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces protéines (immunothérapie passive) déjà produits au laboratoire. Au préalable, une étude pilote sera menée pour déterminer la dose de bactéries à injecter pour les 10 souches bactériennes testées. A terme, nous souhaitons développer un produit (vaccin ou anticorps) le plus simple et le moins coûteux possible, capable de protéger contre différents types d'infections.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages agréés et sont nés et élevés en captivité. Leur nombre (2900) a été réduit au minimum nécessaire, mais comprend l'ensemble des expériences qui seront menées sur 5 ans. Ce nombre est un maximum, et il est possible voire probable qu'en fonction des résultats obtenus ce nombre soit revu à la baisse, tout en restant suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences. L'étude pilote permettra d'affiner ce nombre d'animaux qui sera probablement revu à la baisse en fonction des résultats obtenus. L'état de santé et le bien-être des animaux seront surveillés tout au long de l'expérience et évalués grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

2318- Face à l'augmentation de la population mondiale, nourrir la planète de manière durable est un défi majeur. L'aquaculture est une filière d'avenir car elle produit des protéines de bonne qualité nutritionnelle, peut être un facteur de développement local, et permet de préserver les réserves naturelles de poissons. Cependant, son développement est freiné par l'impact de maladies infectieuses.

Flavobacterium psychrophilum (Fp), bactérie responsable de la flavobactériose des salmonidés, peut conduire à des taux de mortalités et à des pertes économiques considérables. En l'absence de vaccins efficaces, les antibiotiques sont le seul moyen de lutte contre la maladie et la mise au point de stratégies alternatives de lutte (vaccins, probiotiques, sélection génétique etc.) est essentielle à l'avenir de ce secteur.

Nos projets de recherche visent à

- mieux comprendre les mécanismes de virulence de la bactérie en soumettant les truites arc-en-ciel à différents isolats bactériens génétiquement caractérisés. Le niveau de virulence des souches est évalué par des cinétiques de mortalité et par quantification de la bactérie dans les poissons.

- identifier les facteurs participant à la résistance de la truite à Fp. Les études portent notamment sur l'impact de la composition des aliments ou du patrimoine génétique des truites. Les poissons soumis à une infection expérimentale sont analysés par différentes approches immunologiques, moléculaires et bactériologiques.

Nos projets s'inscrivent dans une démarche compatible avec la règle des 3R:

- nous veillons à réduire les effectifs de poissons autant qu'il est possible pour obtenir des résultats significatifs, en tenant compte des mortalités estimées, et nous effectuons les expériences dans un environnement optimal pour les animaux.

- les procédures décrites ne peuvent être remplacées par des expériences sur des lignées cellulaires (in vitro) car elles visent à comprendre la réaction de l'organisme à la bactérie pathogène.

- les animaux sont gardés en lots et constituent les uns pour les autres un élément important d'enrichissement du milieu. Il doit être noté qu'il est important de ne pas introduire dans les bacs des objets sur lesquels les poissons se frottent: même lorsqu'ils ne se blessent pas ce faisant, l'intégrité du mucus est souvent altérée ce qui fragilise l'animal.

Ce projet se décline en 3 procédures qui pourront être répétées plusieurs fois, le total des animaux utilisés pour l'ensemble de ce projet ambitieux est donc de 9740.

Les infections expérimentales durent au maximum 4 semaines. Pour évaluer la virulence des souches ou la sensibilité des truites à un traitement (par exemple, une formulation d'aliment), les groupes sont constitués de 50 à 100 animaux en fonction des observations et des prélèvements à effectuer. L'ensemble des prélèvements est fait post mortem après euthanasie.

2319- Le traitement des formes graves de certains rhumatismes inflammatoires se base depuis 10 ans sur des médicaments biologiques qui inhibent les voies de l'inflammation. Ces médicaments coûteux ont transformé le pronostic de ces maladies. Or, du fait de leur nature biologique, ils peuvent conduire à l'apparition d'une réaction d'immunisation de l'organisme du patient à leur encontre les rendant non fonctionnels. Ceci se produit chez 30 à 50% des patients.

Cette réaction de neutralisation des médicaments biologiques est liée à l'induction d'anticorps ciblant spécifiquement ceux-ci.

Dans des modèles de rongeurs il a été montré que le méthotrexate à faible dose (une molécule très largement utilisée en rhumatologie) permet de prévenir la production d'anticorps anti médicament biologique.

L'adalimumab est un médicament biologique anti TNF alpha largement utilisé dans les différents types de rhumatisme inflammatoire.

Les modèles rongeurs ont permis de valider la preuve de concept de la prévention de l'immunisation contre les médicaments biologiques avec le méthotrexate. Cependant la chute brutale des taux de médicament liée à l'immunisation observée chez l'Homme n'est pas retrouvée dans ce modèle, ce qui rend impossible l'utilisation de ce dernier.

En revanche, il a été montré dans le dossier d'autorisation de mise sur le marché de l'adalimumab et dans des publications pharmacologiques chez l'animal modèle choisi, le primate non humain (PNH), l'immunisation contre les médicaments biologiques est très similaire à celle observée chez l'Homme.

L'objectif primaire de ce projet est donc d'évaluer la meilleure stratégie d'utilisation du méthotrexate pour prévenir la neutralisation des médicaments biologiques.

Les objectifs secondaires sont :

1) La prévention de l'immunisation contre l'adalimumab en pré-traitement avec le méthotrexate.

2) La détermination des mécanismes par lesquels la prévention de l'immunisation vis-à-vis de l'adalimumab est établie.

De telles études nécessitant l'analyse des phénomènes multi-organe et multi-cellulaire de la réponse immunitaire, ne peuvent être réalisées que sur des organismes entiers, le modèle animal est donc nécessaire pour réunir le maximum d'informations avant la réalisation d'essais cliniques chez l'Homme.

Le modèle animal retenu pour ce projet est le macaque, choix guidé par la grande similarité de la nature de la réponse immune entre ce modèle et l'Homme. Le nombre d'animaux dans chacun des 3 design expérimentaux successifs (une étude de deux animaux, une pilote de comparaison de 2 groupes de 3 animaux et 3 groupes expérimentaux constitués de 8 animaux chacun) a été réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non-paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies afin d'éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administrations et prélèvements sous anesthésie, limitations des volumes de sang prélevés). La durée de la phase d'induction sera réduite au minimum nécessaire en fonction de l'étude pilote (8 semaines au total), alors que l'ensemble des analyses biochimiques et immunologiques s'étalera sur trois ans.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 24 animaux provenant d'élevages autorisés. Les animaux seront hébergés en groupes ou en paires. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires de la vaccination). Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

2320- La maladie de Rendu-Osler ou HHT (Hereditary Hemorrhagic telangiectasia) est une maladie rare qui se caractérise chez les patients par des épistaxis (saignements du nez) importants, des télangiectasies (dilatations de petits vaisseaux sanguins) au niveau des muqueuses ou sur la peau et des malformations artério-veineuses (liens anormaux entre des veines et des artères) au niveau du foie, des poumons et du cerveau dans les cas les plus graves. Il s'agit d'une maladie génétique rare impliquant plusieurs gènes. En effet, chez des patients, des mutations ont été reportées sur les gènes ACVRL1 et l'endogline. La mutation d'un seul allèle d'un de ces gènes suffit à déclencher la maladie. Ces deux gènes sont directement impliqués dans l'angiogenèse (formation des néo-vaisseaux à partir de vaisseaux existants), un processus physiologique normal dans le développement du réseau vasculaire mais qui est également impliqué dans un certain nombre de pathologies (dissémination métastatique lors des cancers, dégénérescence maculaire liée à l'âge,...). ACVRL1 et l'endogline sont deux facteurs régulant l'angiogenèse. ACVRL1 code pour le récepteur ALK1 qui est spécifique des cellules endothéliales (cellules qui tapissent la paroi interne des vaisseaux sanguins) et l'endogline est un corécepteur de ALK1.

Notre équipe a identifié la protéine BMP9 (Bone Morphogenetic Protein 9), un facteur de croissance comme ligand du récepteur ALK1. Par ailleurs, les patients souffrant de la maladie de Rendu-Osler ont une amélioration de leurs symptômes par un traitement avec des thérapies anti-angiogènes (bevacizumab). Ces traitements ciblent un facteur de croissance primordial dans le développement de l'angiogenèse, le VEGF. Ce facteur de croissance est impliqué dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules endothéliales. Il augmente également la perméabilité vasculaire.

Cette étude vise à déterminer l'interaction potentielle entre BMP9 et son récepteur membranaire ALK1 avec le VEGF dans le contexte de la maladie de rendu-Osler. Cette étude utilisera des modèles rongeurs, soit normaux soit privés de BMP9 chez lesquels seront induites une perméabilité vasculaire par injection en intra-dermique du VEGF. A l'aide de ce modèle, nous analyserons le rôle protecteur de BMP9 sur la perméabilité vasculaire.

Aucune méthode cellulaire ou informatique ne peut fournir ces informations, importantes pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques. Le recours à des investigations in vivo est donc nécessaire.

Le modèle rongeur a été choisi pour réaliser cette étude. Les animaux sont nés et ont été élevés dans un établissement agréé. Leur nombre (36) a été déterminé sur la base des données de la littérature et pour répondre aux exigences d'un test statistique (test t de Student) qui sera appliqué pour chaque expérience. Ainsi, nous veillons à n'utiliser que le minimum nécessaire d'animaux pour assurer la validité des résultats.

Les animaux sont hébergés en groupe dans un environnement enrichi et des protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux.

Des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus, pour lesquels ils sera décidé de mettre en place un traitement approprié ou d'une euthanasie.

2321- Le traitement des formes graves de certains rhumatismes inflammatoires se base depuis 10 ans sur des médicaments biologiques qui inhibent les voies de l'inflammation. Ces médicaments coûteux ont transformé le pronostic de ces maladies. Or, du fait de leur nature biologique, ils peuvent conduire à l'apparition d'une réaction d'immunisation de l'organisme du patient à leur encontre les rendant non fonctionnels. Ceci se produit chez 30 à 50% des patients.

Cette réaction de neutralisation des médicaments biologiques est liée à l'induction d'anticorps ciblant spécifiquement ceux-ci. Dans des modèles de rongeurs il a été montré que le méthotrexate à faible dose (une molécule très largement utilisée en rhumatologie) permet de prévenir la production d'anticorps anti médicament biologique.

L'adalimumab est un médicament biologique anti TNF alpha largement utilisé dans les différents types de rhumatisme inflammatoire.

Les modèles rongeurs ont permis de valider la preuve de concept de la prévention de l'immunisation contre les médicaments biologiques avec le méthotrexate. Cependant la chute brutale des taux de médicament liée à l'immunisation observée chez l'Homme n'est pas retrouvée dans ce modèle, ce qui rend impossible l'utilisation de ce dernier.

En revanche, il a été montré dans le dossier d'autorisation de mise sur le marché de l'adalimumab et dans des publications pharmacologiques chez l'animal modèle choisi, le primate non humain (PNH), l'immunisation contre les médicaments biologiques est très similaire à celle observée chez l'Homme.

L'objectif primaire de ce projet est donc d'évaluer la meilleure stratégie d'utilisation du méthotrexate pour prévenir la neutralisation des médicaments biologiques.

Les objectifs secondaires sont :

1) La prévention de l'immunisation contre l'adalimumab en pré-traitement avec le méthotrexate.

2) La détermination des mécanismes par lesquels la prévention de l'immunisation vis-à-vis de l'adalimumab est établie.

De telles études nécessitant l'analyse des phénomènes multi-organe et multi-cellulaire de la réponse immunitaire, ne peuvent être réalisées que sur des organismes entiers, le modèle animal est donc nécessaire pour réunir le maximum d'informations avant la réalisation d'essais cliniques chez l'Homme.

Le modèle animal retenu pour ce projet est le macaque, choix guidé par la grande similarité de la nature de la réponse immune entre ce modèle et l'Homme. Le nombre d'animaux dans chacun des 3 design expérimentaux successifs (une étude de deux animaux, une pilote de comparaison de 2 groupes de 3 animaux et 3 groupes expérimentaux constitués de 8 animaux chacun) a été réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non-paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies afin d'éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administrations et prélèvements sous anesthésie, limitations des volumes de sang prélevés). La durée de la phase d'induction sera réduite au minimum nécessaire en fonction de l'étude pilote (8 semaines au total), alors que l'ensemble des analyses biochimiques et immunologiques s'étalera sur trois ans.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 24 animaux provenant d'élevages autorisés. Les animaux seront hébergés en groupes ou en paires. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires de la vaccination). Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

2322- Les tRNA synthétases sont des enzymes qui permettent la fixation des acides aminés sur l'extrémité 3' des ARNt. Ces protéines sont donc essentielles à la traduction. Elles sont présentes chez tous les organismes vivants mais certaines sont spécifiques du *Toxoplasme*.

L'objectif de notre projet est l'étude des inhibiteurs des tRNA synthétases au cours de l'infection par *Toxoplasma gondii* in vitro en culture cellulaire mais également in vivo au cours de la toxoplasmose murine.

Plusieurs inhibiteurs des tRNA synthétases qui inhibent la multiplication de *T. gondii* in vitro ont été identifiés. Par ailleurs, il a été déjà montré que certains de ces inhibiteurs des tRNA synthétases ont une activité inhibitrice de la multiplication d'autres protozoaires in vitro et in vivo. Les études de toxicité de ces composés sur les fibroblastes et chez la souris ont déjà été réalisées. Aux doses utilisées, il n'a pas été observé de toxicité chez la souris.

Nous souhaitons maintenant confirmer la capacité inhibitrice de deux de ces composés au cours de la toxoplasmose aiguë en modèle murin. Le modèle d'infection aiguë sera obtenu par l'infection d'une souche virulente de *Toxoplasma gondii* (souche RH, type 1) de souris CBA.

En modèle murin, la toxoplasmose aiguë secondaire à l'infection par la souche virulente RH est létale. Elle peut être traitée par différentes molécules dont les plus communes sont la pyriméthamine et la sulfadiazine. Ces deux molécules sont deux médicaments anti-toxoplasmiques également utilisés en médecine humaine pour traiter les patients présentant une toxoplasmose disséminée grave.

Nous souhaitons donc avec ces expériences:

1/ Confirmer l'efficacité de ces 2 composés (A et B) au cours de la toxoplasmose aiguë: représentent-ils de réels candidat-médicaments?

2/ Comparer leur efficacité à la pyriméthamine (12,5mg/kg) et à la sulfadiazine (200mg/kg) qui sont 2 médicaments anti-toxoplasmiques efficaces.

Cette étude sera réalisée en respectant la règle des "3R" :

- "remplacer" : les 2 composés candidat-médicaments ont été testés lors de l'infection par *T. gondii* en modèle cellulaire humain : ils sont parasitocides in vitro. Nous souhaiterions le confirmer dans un modèle de toxoplasmose murine. En effet, il ne sera possible d'envisager leurs administrations chez l'homme que si des études précliniques ont été réalisées chez l'animal.

- "réduire": la première expérience sera réalisée sur 3 animaux par condition à tester (27 souris pour cette expérience initiale). L'objectif étant que ces composés A et B doivent être totalement efficaces, les deux expériences suivantes ne seront réalisées qu'en cas de survies des souris traitées avec les composés A et B testés lors de cette première expérience (100% de survie). En cas d'efficacité partielle, le protocole ne sera pas poursuivi.

- "Raffiner": en cas d'efficacité, les deux expériences suivantes seront réalisées sur 5 animaux/condition à tester (50 souris). Les parasites seront infectés par injection intrapéritonéale et les souris seront traitées par gavage pour l'administration des candidat-médicaments. Les souris seront euthanasiées dès l'apparition des premiers signes cliniques de toxoplasmose: poils ébouriffés, prostration, dos voûté, mobilité réduite.

De 27 à 77 souris seront utilisées pour ce protocole en fonction des résultats de la première expérience.

2323- L'utilisation des prothèses articulaires permet de traiter les patients atteints de lésions dégénératives des articulations.

Les études cliniques ont montré que la durée de vie de certaines prothèses était limitée par une dégradation de l'os autour de la prothèse (on parle d'ostéolyse périprothétique) entraînant un détachement de la prothèse et nécessitant une nouvelle intervention chirurgicale. Cette ostéolyse est le résultat des débris d'usure libérés par prothèse qui activent une cascade inflammatoire responsable de l'ostéolyse.

Nous faisons l'hypothèse qu'il existe chez les patients des profils génétiques responsables d'échecs précoces de prothèses utilisant du polyéthylène (PE). Le phénomène de dégradation de l'os autour de la prothèse est variable d'un individu à un autre et est associé à l'activation d'une catégorie de cellules de l'immunité, les macrophages. Il a été démontré que les récepteurs TLRs (Toll Like Receptors), présents sur les cellules de l'inflammation, représentent une voie d'activation des macrophages. Leur expression variable d'un individu à l'autre pourrait expliquer la survenue d'ostéolyse périprothétique plus précoce et plus sévère chez certains patients. Ainsi l'analyse de l'expression des récepteurs TLRs impliqués dans l'ostéolyse périprothétique permettrait d'expliquer la variation interindividuelle de l'ostéolyse périprothétique.

L'objectif de ce projet est d'étudier, sur un modèle expérimental murin d'ostéolyse périprothétique la relation entre le degré de sévérité de la dégradation osseuse et l'expression des TLRs (TLR 2, 4 et 9) sur les cellules inflammatoires. Pour mimer la variation interindividuelle chez les patients, nous utiliserons des souris de deux fonds génétiques connus pour réagir différemment aux PE: les souris C57BL/6J et Balb/C, déjà utilisées comme modèle d'étude d'ostéolyse aux particules de PE.

Le modèle animal choisi présente de nombreux avantages tels que sa petite taille, son hébergement aisé, son coût, ses caractérisations et potentialités génétiques et immunologiques et l'existence de marqueurs in-vivo ou ex-vivo permettant une modélisation et un suivi de l'ostéolyse.

Nous procéderons à la mise en place des particules du PE dans le fémur distal à l'aide d'une micro pompe. Pour chaque souche de souris, nous évaluerons de façon longitudinale (les souris sont gardées en vie) ; i) l'inflammation par bioimagerie in vivo et ii) l'ostéolyse par imagerie rayons X (micro-scanner in vivo). Une analyse histologique post-mortem des fémurs sera effectuée. Ce projet nécessitera 48 souris (24 par souche des souris). Les dommages potentiels de ce modèle résident dans le caractère invasif : chirurgie avec deux incisions ce qui augmentent le risque infectieux ainsi que la douleur. Ces risques sont contrôlables en suivant les règles d'asepsie et les protocoles antalgiques et d'anesthésie. L'utilisation de la micro-pompe permet de réduire les injections itératives. Cela permet de réduire l'utilisation intempestive d'antalgique et limite à une seule fois la procédure chirurgicale. Ce modèle est parfaitement maîtrisé par l'expérimentateur.

L'analyse des résultats permettra de mieux comprendre la corrélation entre le fond génétique et l'expression des TLRs dans la survenue de l'ostéolyse périprothétique. Les connaissances apportées sur la susceptibilité/sensibilité individuelle à l'ostéolyse périprothétique permettront de nouvelles approches thérapeutiques afin de réduire ce phénomène et de prolonger la survie des prothèses et donc de diminuer le nombre d'échecs à long terme de ces implants.

2324- 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.

C'est dans ce cadre que nous souhaitons, dans un premier temps, mettre au point un protocole de sensibilisation à l'arachide chez la souris. Les souris seront ainsi rendues allergiques à l'arachide. 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 24 souris Balbc femelles et 24 souris C3H/HeOuJ femelles seront utilisées et divisées en 3 groupes de 6 souris et 2 groupes contrôle de 3 souris. Les souris subiront des procédures classées légères ou modérées. Elles seront sensibilisées à l'arachide par voie intragastrique ou par voie intrapéritonéale une fois par semaine pendant 6 semaines. Quatre 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 relevés.

Une surveillance quotidienne des souris sera effectuée y compris les weekend et jours fériés. Les souris seront hébergées par groupe de 6 ou 3 pour les souris contrôle, 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.

La comparaison de ces deux souches de souris nous permettra de déterminer la souche optimale pour les prochaines études de ce genre (Raffinement). Notre étude statistique nous indique qu'utiliser 24 souris de chaque souche 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.

2325- La neuromodulation, qui contrôle l'activité neuronale dans le cerveau, est très utile dans le traitement médical des troubles psychiques, de l'épilepsie, la schizophrénie, la maladie de Parkinson etc... Il existe beaucoup de techniques de neuromodulation comme la stimulation cérébrale profonde, la stimulation du nerf vague et la stimulation magnétique trans-crânienne. Cependant, ces techniques sont invasives et donc limitées aux patients gravement atteints qui ont besoin en permanence de la neuromodulation pour maintenir leur qualité de vie.

En revanche, les ultrasons à basse fréquence sont des techniques de neuromodulation non invasives.

Le projet vise à développer une technologie non invasive qui concentre les ondes ultrasonores directement dans le cerveau à travers le crâne et peut interagir avec les neurones dans le cerveau profond. Il utilise le fait que la stimulation ultrasonore est techniquement compatible avec l'IRM fonctionnelle (IRMf), aussi appelée imagerie BOLD. C'est une technique basée sur l'imagerie par résonance magnétique qui détecte les zones du cerveau activées dans une tâche, un processus ou une émotion.

Différents signaux d'IRM fonctionnelle seront utilisés pour caractériser l'effet d'un stimulus ultrasonore sur la membrane des neurones. Ce stimulus sera appliqué à des régions du cerveau spécifiques de la fonction motrice, et les mouvements induits des pattes seront analysés. Une fois maîtrisé, ce processus sera utilisé pour observer l'effet de molécules neuroactives sur l'inhibition des signaux d'IRM, en présence du stimulus ultrasonore.

Ce projet est réalisé sur un modèle animal car aucun dispositif in vitro ou modèle informatique ne peut reproduire le fonctionnement cérébral. Nous utiliserons des rongeurs provenant d'élevages agréés. Leur nombre, 60 individus sur cinq ans, a été réduit au minimum nécessaire pour détecter des effets statistiques significatifs dans chaque condition expérimentale.

Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie, définis et validés par une équipe vétérinaire, assurent qu'aucune angoisse, douleur ou souffrance ne sera ressentie lors des interventions sur les animaux. Une observation quotidienne des animaux sera effectuée pour s'assurer de leur bien-être. En cas d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en œuvre les traitements appropriés ou décider de l'euthanasie. Après acquisition des données sur plusieurs animaux, si aucun effet n'est observé pour un des médicaments, l'étude de celui-ci sera arrêtée.

2326- La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après les maladies d'Alzheimer et de Parkinson.

Elle se caractérise par une mort sélective des neurones moteurs situés dans le système nerveux central, par de l'atrophie musculaire et de la paralysie. Le décès des patients intervient trois à cinq ans après diagnostic. L'axe principal de la pathologie correspond à l'axe moteur, et les principaux tissus impliqués dans la pathologie sont la moelle épinière, les nerfs moteurs et les muscles squelettiques. L'étude de l'interaction de ces 3 acteurs est la clé de la recherche sur cette pathologie.

La SLA est une maladie multifactorielle dans laquelle le métabolisme des lipides influence la sévérité de la maladie chez les patients. La littérature montre que le métabolisme de sphingolipides, une classe de lipides complexes, est fortement perturbée chez les patients SLA ainsi que dans des modèles murins de dénervation musculaire. Notre hypothèse de travail actuelle est que la synthèse de sphingolipides particuliers est requise pour la maintenance et surtout la régénérescence des unités motrices. Nous proposons ici de moduler ces lipides par une approche pharmacologique dans un modèle murin de la SLA, les souris SOD1. Le traitement débutera à un âge présymptomatique et durera 20 jours, et le comportement moteur des animaux sera étudiée par des tests moteurs et visuels reconnus, et aussi par des tests biochimiques et biomoléculaires.

Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation des protocoles afin de limiter le nombre d'animaux et d'améliorer leur bien-être. La complexité des unités motrices et l'implication de plusieurs types cellulaires excluent l'utilisation de modèles cellulaires et rendent incontournable l'utilisation de modèle animaux. Notre projet est composé de deux protocoles expérimentaux. Au total, 86 souris, dont 54 souris SOD1 et 32 souris non transgéniques, seront incluses dans le projet afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. L'enrichissement de l'environnement des animaux, le maintien des interactions sociales et une surveillance quotidienne, permettront de limiter la souffrance des animaux et de s'assurer de leurs bien-être.

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

2327- Le cerveau est constitué d'un réseau très complexe de cellules (appelées neurones) qui sont reliées les unes aux autres via les synapses. Une partie de ce réseau reçoit puis traite l'information sensorielle sur le monde extérieur, et nous sommes particulièrement intéressés à la façon dont l'information sensorielle visuelle est gérée.

Nous savons que les neurones individuels reçoivent les entrées positive et négative à partir de synapses, et nous comprenons la manière dont ces signaux peuvent être traités de telle sorte qu'une neurone peut générer son propre signal comme le résultat d'un calcul. Dans cette étude, nous ferons progresser notre compréhension de la façon dont ces inputs dépendent des aspects de la scène visuelle, par exemple, comment changent-ils lorsque certains objets dans la scène se déplacent dans une direction spécifique.

Cette étude s'appuie sur des expériences électrophysiologiques qui enregistrent des signaux précis du cortex visuel du rat et de la souris. Surtout, nous utilisons également des techniques mathématiques pour construire des modèles théoriques de neurones et de leur réseau. Cette combinaison d'approches qui fournit des résultats plus précis et, en particulier, une utilisation plus efficace des animaux de laboratoire.

L'utilisation de modèles rongeur nous permettra de comparer directement les mécanismes fondamentaux sous-tendant les fonctions cérébrales. Ainsi, nous améliorerons notre compréhension du problème général de la conservation de divers mécanismes au sein de l'ordre des mammifères. Cet aspect est fondamental pour l'interprétation et l'extrapolation de résultats expérimentaux obtenus chez les mammifères simples afin de comprendre les mécanismes existants chez les mammifères supérieurs, y compris les primates et les humains.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum (105 rats, 105 souris). De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

2328- L'angiogenèse est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins indispensable au cours de nombreux processus physiologiques comme le développement embryonnaire. A l'encontre, l'angiogenèse incontrôlée devient pathologique comme par exemple dans le développement du cancer. La tumeur nécessite la multiplication des vaisseaux pour se développer et produit des facteurs qui stimulent directement sur les cellules des vaisseaux. La découverte de molécules anti-angiogéniques bloquant la formation des nouveaux vaisseaux est un axe thérapeutique stratégique bien établi aujourd'hui. Plusieurs molécules sont sur le marché, la première commercialisée depuis 2004 (Avastin) dans le traitement de différents cancers.

Selon l'OMS, plus de 15 Millions de décès sont dus au cancer. Si les traitements ont progressé et la mortalité a diminué, cette pathologie reste la première cause de mortalité en France avec une augmentation permanente de nouveaux cas, 355000 cas recensé en 2012, (Les cancers en France, Editions 2014-V5). Le besoin médical reste immense et la recherche de nouvelles molécules et nouvelles combinaisons de cibles médicamenteuses pour combattre les résistances est permanente.

Notre recherche est concentrée sur des nouvelles voies mécanistiques pour identifier de nouvelles molécules inhibant l'angiogenèse. Le but de notre étude est d'évaluer l'efficacité de ces molécules sur la régression tumorale dans différents modèles de cancer in vivo après avoir démontré leur effet in vitro (angiogenèse, prolifération, co-culture, modèle 3 dimension etc ...). En effet, si les tests in vitro permettent d'identifier une activité et certains mécanismes, ils ne peuvent pas refléter le contexte multifactoriel d'un organisme vivant et ne permettent pas toujours d'anticiper des phénomènes d'échappement au traitement par exemple. Les essais chez l'animal seront limités au strict minimum pour valider l'efficacité de la molécule, la biodistribution, sa tolérance après administration générale dans un organisme vivant. L'angiogenèse étant impliquée dans tout type de cancer, les molécules seront testées sur différents modèles de souris xenogreffées avec différents types de cancer mais avec une présélection de 3 indications sur la base de leur mécanisme d'action pré-établi à l'aide des tests in vitro. Le nombre d'animaux lors d'une expérimentation est réduit au maximum en gardant la taille de groupe permettant d'obtenir une significativité des résultats sur la base d'un calcul statistique. Pour réduire le nombre de lots, l'étude de plusieurs molécules seront regroupées avec un seul groupe contrôle et un seul groupe médicament de référence dans l'indication. Le nombre total d'animaux utilisés dans nos études des 5 prochaines années est de 960. Ce nombre a été réduit de plus de 80% avec le remplacement par des tests in vitro sur l'ensemble des molécules candidates et le regroupement d'expérimentations. Afin de réduire au maximum l'inconfort, l'angoisse et la souffrance des animaux, les souris seront réparties par groupe de 6 par cage, avec une période d'acclimation d'une semaine avant le démarrage de l'expérience. Les souris seront observées régulièrement et des points limites sont établis à partir d'expériences antérieures afin de suspendre ou interrompre l'expérience pour éviter des souffrances inutiles. Une grille de score est établie sur une échelle de 1 à 3 selon l'intensité de la douleur avec une surveillance resserrée pour le score 1, l'administration d'un antalgique au score 2 et l'euthanasie sous anesthésie lorsque l'un des points de score 3 est atteint.

2329- Les sulfates d'héparane (HS) sont des sucres complexes, présents en abondance à la surface des cellules. Ils régulent de nombreux processus biologiques (développement, angiogénèse, coagulation sanguine ...) mais aussi pathologiques, notamment le cancer. Certaines enzymes récemment identifiées, de la classe des sulfatases, appelées Sulfs, peuvent modifier les propriétés biologiques des HS. Les cellules humaines produisent 2 formes de Sulfs : HSulf-1 et HSulf-2. Ces 2 enzymes sont très voisines, mais ont pourtant des propriétés très différentes dans le contexte du cancer. HSulf-2 présente une activité oncogénique et constitue de ce fait une cible thérapeutique identifiée, alors que HSulf-1, présente une activité anti-oncogénique. Il est donc essentiel de mieux comprendre le mécanisme d'action des Sulfs afin de concevoir des stratégies anti-tumorales ciblant ce système clé de régulation de l'activité des HS.

L'étude de ces enzymes est cependant extrêmement complexe et de nombreuses divergences ont été observées entre les recherches menées sur des modèles in vivo et in vitro. Récemment, nous avons identifié la présence d'un motif structural important, présent sur HSulf-2 mais pas HSulf-1, qui pourrait jouer un rôle important dans la diffusion de l'enzyme dans les tissus. Nous pensons que ce motif pourrait être à l'origine des différences d'activité entre les deux formes de Sulfs, mais également entre conditions in vivo et in vitro.

Pour valider cette hypothèse, nous nous proposons d'exprimer les formes HSulf-1 et HSulf-2, sauvages ou mutées (au niveau de ce motif), dans des cellules issues d'adénocarcinomes mammaires, puis de greffer ces différents types de cellules chez un rongeur modèle pour les tumeurs du sein. Cette étude devrait nous fournir des informations importantes sur le rôle des Sulfs au cours de la progression tumorale.

Les données de la littérature indiquent clairement que l'action de ces enzymes in vivo ne peut être clairement évaluée au moyen de modèles cellulaires: le recours aux animaux est ici nécessaire. Nous utiliserons au maximum 180 rongeurs nés en captivité dans des élevages agréés. Ce nombre représente le minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des

expériences. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille d'observation clinique limitant les contraintes pour eux. Cette grille nous permet d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements antalgiques appropriés. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie

2330- Notre laboratoire de thérapie génique a pour objectif de développer des stratégies thérapeutiques pour traiter la maladie de Pompe (MP). C'est une maladie neuromusculaire rare (prévalence de 1/40000) causée par une insuffisance de l'acide alpha-glucosidase (GAA), qui est localisée au niveau de tous les tissus et qui convertit le glycogène en glucose. Le manque de GAA provoque l'accumulation de glycogène dans plusieurs tissus conduisant à des lésions.

La MP affecte principalement les muscles et les neurones et cause des cardiomyopathies, des faiblesses musculaires et des insuffisances respiratoires.

A ce jour, le seul traitement disponible pour la MP est une enzymothérapie substitutive, qui consiste à perfuser par voie intraveineuse l'enzyme GAA synthétique aux patients toutes les semaines. Ce traitement améliore certains facteurs de la MP (comme la cardiomyopathie), mais elle est inefficace pour cibler les muscles squelettiques, ce qui fait que la maladie progresse. De plus, l'enzymothérapie peut s'avérer totalement inefficace chez de nombreux patients, qui développent des réponses immunitaires contre l'enzyme GAA synthétique.

Sur cette base, l'objectif de ce projet est de développer une stratégie de traitement de la MP par une approche de thérapie génique : nous utiliserons différents virus adéno-associé (AAV) modifiés pour apporter le gène manquant de l'enzyme GAA (AAV-GAA) au niveau des cellules du foie, cible privilégiée de nos virus.

Afin de limiter au maximum l'utilisation d'animaux pour ce projet, tous nos AAV-GAA (60) ont été préalablement testés sur des cellules de foie cultivées en laboratoire. Ceci nous a permis de sélectionner 28 traitements candidats. Cependant la capacité de nos virus à franchir les défenses immunitaires ne peut être démontrée complètement que dans un organisme physiologique "entier". Nous prévoyons donc de les tester chez le modèle animal qui mime la MP, une souche de souris déficiente en GAA : B6;129-Gaatm1Rabn/J (GAA -/-).

Toutefois, la seule utilisation de cette souche pose certains inconvénients : en sachant qu'un animal sur 4 est affecté par la MP à la naissance et compte-tenu du nombre de souris nécessaires pour notre projet, le nombre de souris en élevage serait trop important pour répondre à l'ensemble des questions posées. De plus, en vieillissant, ces animaux développent des symptômes musculaires affaiblissants.

Aussi, dans l'optique de limiter au maximum l'utilisation de ces souris malades, nous testerons dans un premier temps nos AAV-GAA chez une souche de souris saines (C57BL/6). Ceci nous permettra de sélectionner ceux capables de produire le plus d'enzyme GAA. Puis dans un second temps, les traitements sélectionnés (14) seront testés chez les souris malades, afin de valider leur pouvoir thérapeutique. Cette souche nous permettra également de déterminer la dose la plus efficace pour enfin aboutir à la sélection du meilleur AAV-GAA « médicament » capable de traiter leur pathologie.

Les prélèvements sanguins seront importants pour évaluer l'efficacité de nos vecteurs et seront fait au niveau de la veine mandibulaire afin de raffiner le geste.

Au total, 525 souris (145 C57BL/6 et 380 B6;129-Gaatm1Rabn/J) seront utilisées. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études et en fonction d'une analyse statistique afin d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible.

2331- L'objectif des recherches de notre laboratoire est de mettre en place des stratégies thérapeutiques pour traiter les dystrophies musculaires progressives, en particulier la dystrophie musculaire de Duchenne et les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD pour Limb Girdle Muscular Dystrophies). Ces myopathies sont progressivement invalidantes et conduisent à la perte de la marche. La myopathie de Duchenne de transmission liée à l'X touche un garçon /35000. La prévalence de toutes les LGMD récessives réunies est estimée à 5 à 6 personnes sur 1 million. Aucun traitement curatif n'est actuellement disponible pour ces myopathies d'origine génétique.

Dans ce projet, nous souhaiterions savoir si l'injection par voie intramusculaire d'un vecteur viral apportant le gène déficient va contribuer à corriger la pathologie dans des souris modèles.

Afin de respecter la règle des trois R, tous nos vecteurs seront préalablement testés en culture cellulaire et seuls ceux ayant montré une expression optimale seront utilisés in vivo. Cette étape est estimée pouvoir réduire le nombre d'animaux nécessaire de 20 à 30 %.

Dans ce projet, 1452 animaux seront utilisés, ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études. Le degré de contrainte que subiront ces animaux sera modéré. L'état de santé des animaux sera surveillé, aucun animal en souffrance ne sera laissé sans soin. En particulier, nous nous attacherons dans un souci d'application de ces principes, à faire en sorte d'optimiser l'utilisation des animaux entre procédures chaque fois où cela s'avère possible.

2332- L'objectif des recherches de notre laboratoire est de mettre en place des stratégies thérapeutiques pour traiter les dystrophies musculaires progressives, en particulier la dystrophie musculaire de Duchenne et les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD pour Limb Girdle Muscular Dystrophies). Ces myopathies sont progressivement invalidantes et conduisent à la perte de la marche. Aucun traitement curatif n'est actuellement disponible pour ces myopathies d'origine génétique.

Ce projet concerne les formes de dystrophies musculaires des ceintures dues à des défauts dans les gènes codant pour les sarcoglycanes, protéines normalement localisées au niveau de la membrane des fibres musculaires et importantes pour la résistance des fibres aux contractions musculaires.

Dans ce projet, nous souhaiterions évaluer les conditions permettant d'éviter le rejet immunologique du transgène sarcoglycane dans le cadre d'une injection de vecteur viral portant ce transgène. Ce rejet immunologique est un problème important qui peut conduire à une inefficacité thérapeutique.

Afin de respecter la règle des trois R, tous nos vecteurs seront préalablement testés en culture cellulaire et seuls ceux ayant montré une expression optimale seront utilisés in vivo. Cette étape est estimée pouvoir réduire le nombre d'animaux nécessaire de 20 à 30 %.

Dans ce projet, nous estimons que 380 animaux seront utilisés. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études ainsi que sur un calcul de taille d'échantillon permettant une analyse statistique des résultats. Le degré de contrainte que subiront ces animaux sera léger. L'état de santé des animaux sera surveillé. Nous nous attacherons dans un souci de réduction, à faire en sorte d'optimiser l'utilisation des animaux entre procédures chaque fois où cela s'avère possible.

2333- L'objectif des recherches de notre laboratoire est de mettre en place des stratégies thérapeutiques pour traiter les dystrophies musculaires progressives, en particulier la dystrophie musculaire de Duchenne et les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD pour Limb Girdle Muscular Dystrophies). Ces myopathies sont progressivement invalidantes et conduisent à la perte de la marche. Aucun traitement curatif n'est actuellement disponible pour ces myopathies d'origine génétique.

Ce projet concerne les formes de dystrophies musculaires des ceintures dues à des défauts dans les gènes codant pour les sarcoglycanes, protéines normalement localisées au niveau de la membrane des fibres musculaires et importantes pour la résistance des fibres aux contractions musculaires.

Dans ce projet, nous souhaiterions savoir si le traitement par des molécules ayant montré une efficacité sur des modèles cellulaires peuvent contribuer à corriger la pathologie dans des souris modèles.

Dans ce projet, 355 animaux seront utilisés, ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études. Le degré de contrainte que subiront ces animaux sera modéré. L'état de santé des animaux sera surveillé, aucun animal en souffrance ne sera laissé sans soin. En particulier, nous nous attacherons dans un souci d'application de ces principes, à faire en sorte d'optimiser l'utilisation des animaux entre procédures chaque fois où cela s'avère possible.

2334- Le diabète de type 2 est considéré comme un problème majeur de santé publique, affectant plus de 350 millions de personnes dans le monde. Il est connu qu'une forte augmentation de la production de glucose par le foie pourrait être à l'origine de l'hyperglycémie des diabétiques. En plus du foie, les reins et l'intestin participent au contrôle de l'homéostasie glucidique (maintien de la glycémie au cours du jeûne et régulation de la sensibilité à l'insuline) et énergétique.

Les objectifs de ce projet sont 1/ de démontrer que l'induction de la production de glucose par le foie favorise le développement du diabète de type 2 et 2/ de déterminer le rôle de la production de glucose par le rein dans le développement du diabète de type 2. Ce projet comprend la caractérisation phénotypique de souris transgéniques chez lesquelles la production de glucose est spécifiquement induite au niveau des reins ou du foie in utéro ou à l'âge adulte. Leur métabolisme glucidique et énergétique sera mesuré in vivo, comme chez l'homme, par des tests de tolérance au glucose et à l'insuline, des clamps hyperinsulinémiques euglycémiques, des mesures de glycémie et un suivi de prise de poids et de prise alimentaire. Dans le cas de signes de diabète, le change des animaux sera renouvelé plus fréquemment et la consommation en eau sera surveillée plus particulièrement. Ces souris seront élevées et hébergées par groupe de 5-6 souris/cage en milieu enrichi (coton de nidation, bois à ronger) et contrôlé. Les microchirurgies sont réalisées sous anesthésie générale à l'isoflurane avec injection pré et post-opératoire d'analgésique. Le suivi du comportement des animaux lors des différentes procédures se fera quotidiennement et toute modification de comportement ou signe de souffrance entrainera l'arrêt de la procédure. Le nombre d'animaux maximum utilisés a été estimé à 258 souris par génotype sur une période de 3 ans.

Ce projet devrait permettre de proposer de nouvelles bases scientifiques au développement de nouvelles stratégies de traitement du diabète de type 2, en ciblant la production hépatique et/ou rénale de glucose.

2335- L'induction de la production intestinale de glucose a des effets bénéfiques sur la régulation du métabolisme glucidique et énergétique avec notamment une induction de la satiété et une amélioration de la sensibilité à l'insuline au niveau hépatique. Ces effets passent par un signal nerveux entre l'intestin et le cerveau. Il est connu que les régimes riches en protéines induisent la production intestinale de glucose via les oligopeptides (di- et tri- peptides) issus de leur digestion partielle par les protéases intestinales.

L'objectif de cette étude est de déterminer si la surexpression du transporteur spécifique des oligopeptides permet l'induction de la production intestinale de glucose et ainsi la mise en place de ses bénéfices métaboliques. Cette étude nécessite d'être réalisée in vivo chez l'animal pour intégrer la communication nerveuse entre l'intestin et le cerveau.

Les souris génétiquement modifiées utilisées dans ce protocole ne développent aucune modification physique ou de comportement par rapport aux souris contrôles, aucun signe de stress, ni de douleur n'a été observé au cours de leur développement.

Les souris seront hébergées en groupe de 4 souris dans un milieu enrichi permettant la nidation, avec accès libre à la nourriture et à l'eau. Les différents tests et prélèvements seront réalisés dans des conditions limitant le stress et la douleur

des animaux. Le suivi du bien-être des animaux sera réalisé régulièrement en étudiant leur poids, leur prise alimentaire et leur comportement afin d'identifier tout individu en souffrance.

Le nombre total d'animaux, soit 160 souris, a été calculé au plus juste afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous effectuerons certains tests sur les mêmes souris, à une semaine d'intervalle entre chaque test. La durée maximum du projet est de 24 mois.

2336- De nombreux arguments suggèrent qu'une atteinte des synapses, structures de communication entre les neurones, est au cœur des maladies neurodégénératives. Par exemple au cours de la maladie d'Alzheimer, il existe un dysfonctionnement des récepteurs synaptiques au glutamate de type NMDA, substrats de la mémoire. Il paraît essentiel de déchiffrer les mécanismes qui aboutissent à ces dysfonctionnements, corrélés aux troubles de mémoire des patients, car leur connaissance pourrait ouvrir des perspectives thérapeutiques. Or, il existe une autre maladie neurologique, l'encéphalite à anticorps anti-récepteur NMDA, au cours de laquelle les malades produisent des auto-anticorps dirigés contre le récepteur NMDA de leurs propres neurones et présentent des troubles de mémoire aigus. Les auto-anticorps de ces patients perturbent la synapse de façon aigue. Notre objectif est d'utiliser expérimentalement chez la souris ces auto-anticorps de patients souffrant d'une encéphalite pour étudier les mécanismes de blocage des récepteurs NMDA. Ce modèle expérimental nous permettra d'étudier les conséquences de ce blocage à la fois sur le fonctionnement synaptique des neurones et sur la structure de leurs synapses. Nous disposons d'anticorps de patients que nous administrons aux souris pendant 7 jours. Sur ces souris nous allons étudier les mécanismes d'action des anticorps, leurs effets sur la mémoire et l'apprentissage et leurs conséquences sur la physiologie des cellules nerveuses. Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R. Nous veillerons à limiter le mal être des animaux en enrichissant leur environnement et en leur fournissant des analgésiques adaptés lors des soins post opératoires. Nous limiterons le nombre d'animaux (n=180) au maximum en réalisant les expérimentations de comportement et d'analyse tissulaire sur les animaux d'un même lot. L'ensemble de ces expériences permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires des encéphalites auto-immunes et d'une façon plus générale les mécanismes physiopathologiques impliquant les récepteurs NMDA.

2337- Les études de toxicologie de la reproduction permettent de révéler la toxicité d'un produit sur la reproduction des mammifères.

Les études de toxicité sur le développement prénatal couvrent plus spécifiquement la période du développement in utero, par d'administration quotidienne de la substance à tester pendant la gestation chez le rat, la souris ou le lapin (considéré comme non rongeur). A la fin de la période de gestation, les mères sont sacrifiées et les fœtus sont extraits par césarienne pour éviter une sélection naturelle de la mère (élimination des nouveau-nés malformés ou morts nés par cannibalisme). La morphologie fœtale est ainsi étudiée par une observation externe, viscérale et squelettique des fœtus tandis que les fonctions reproductives des mères (nombre de corps jaunes, nombre et distribution des fœtus morts ou vivants, nombre et qualité des implants et des sites d'implantations, examen du placenta). Si des anomalies de développement sont détectées à des doses non toxiques pour la mère, le produit sera classé tératogène.

Le grand nombre de fœtus par mère et des temps de gestations relativement courts (18 jours chez la souris, 21 jours chez le rat et 29 jours chez le lapin) permettent d'obtenir des résultats statistiquement fiables à partir de 20 (exigence réglementaire ICH) ou 24 (exigence réglementaire OCDE) femelles gestantes par dose sélectionnée et donc de limiter aussi le nombre de d'animaux à utiliser. Ces études se font généralement sur deux espèces différentes (rongeurs et non rongeurs). Elles sont choisies sur la base de leur sensibilité au produit. Les espèces souris, rat et lapin étant particulièrement recommandées par les textes réglementaires, elles sont donc les plus communément utilisées. Le total du projet s'élève à environ 15000 animaux sur 5 ans (150 souris, 1850 rats et 1000 lapin approximativement).

Il n'existe pas dans ce projet d'examen susceptibles d'entraîner de la douleur. Il est cependant prévu des soins vétérinaires pour certaines lésions spontanées (plaies dues à des blessures) et des anesthésies légères par inhalation d'un agent anesthésique volatil en cas de prélèvement sanguin chez les rongeurs. Les animaux seront observés quotidiennement. Tout signe de délivrance prématurée ou tout point limite défini de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé entraînera l'euthanasie de la mère et des fœtus.

Les femelles étant gravides, elles sont hébergées individuellement car leur état est incompatible avec un hébergement de groupe. Cependant, l'enrichissement est maintenu conformément à la Directive 2010/63.

Il existe des méthodes alternatives dites « in vitro ». Ces dernières servent essentiellement au dépistage des produits fortement tératogènes et permettent donc de réduire le nombre de produits qui seront finalement testés sur animaux.

2338- Depuis sa découverte en 1997, la myostatine est une protéine musculaire qui ne cesse d'intéresser la communauté scientifique internationale de part les espoirs thérapeutiques qu'elle suscite. En effet, son inhibition lors de mutation naturelle du gène de la myostatine entraîne une augmentation importante de la masse musculaire dans plusieurs espèces animales, avec un cas recensé de mutation naturelle chez l'homme. Les essais cliniques utilisant des inhibiteurs de la myostatine chez l'homme, sain âgé ou atteint de faiblesse musculaire (myopathies, vieillissement, diabète, sida, cancer), sont déjà en cours et obligent à explorer les conséquences de cette inhibition sur le muscle au-delà de l'aspect structurel (augmentation masse musculaire). Dans ce contexte, nous disposons d'un modèle unique d'exploration de la fonction de la myostatine grâce à des souris déficientes pour myostatine (mstn-/-). Nos résultats préliminaires montrent que cette souris présente une altération des capacités de course, associées à des perturbations métaboliques de la mitochondrie, organe majeur dans la production

d'énergie. Enfin, des études montrent l'importance de la flore intestinale dans le métabolisme énergétique et le contrôle de la masse adipeuse.

Ce projet de recherche s'inscrit dans ce contexte : Comment permettre et potentialiser les thérapeutiques d'avenir associées à l'inhibition de la myostatine ? Il a pour objectif d'évaluer et comprendre la réponse de ce tissu en situation d'exercice physique qu'il soit isolé (Procédure 1) ou répété (Procédure 2), comme modèles physiologiques permettant de moduler et d'étudier le métabolisme énergétique. Au regard de la relation métabolisme-muscle, nous souhaiterions également évaluer l'effet de traitement antibiotique altérant la flore intestinale (Procédure 3), et de traitement préventif en symbiotique (mélange de pro et pré-biotiques) sur la fonction musculaire squelettique (Procédure 4) et d'autres tissus d'intérêts (foie, tissu adipeux, pancréas et cerveau). Les résultats ouvriront sur des stratégies optimisées pour le maintien de la masse et/ou la fonctionnalité du muscle chez des personnes :

- atteintes de pathologies associées à une faiblesse musculaire (résultant le plus souvent de la sédentarité et aggravant cette dernière)

- et/ou traités par des antibiotiques, traitement médicamenteux largement utilisé en curatif dans les infections humaines.

100 animaux, issus de modèles murins en relation avec la protéine d'intérêt mstn (KO myostatine) ou dépourvus en flore intestinale (traitement antibiotiques) seront utilisés pour les 4 procédures. Le suivi des animaux sera réalisé selon les règles en vigueur de la directive 2010/63 (surveillance quotidienne, soin et suivi, compétence et responsabilité du personnel, prise en charge de la douleur ...). Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R sont les suivantes :

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation. Nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux, à la fois pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, et pour palier l'abandon de certaines souris dans l'expérimentation.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") : nous allons porter une attention particulière au bien-être de nos animaux avec un suivi quotidien des animaux.

- « Remplacer » les modèles animaux : nous nous sommes orientés vers le modèle animal se rapprochant le plus de l'humain sur la physiologie musculaire et avons donc choisi la souris de par l'intérêt des modèles transgéniques disponibles. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

2339- Le microbiote intestinal est l'ensemble des micro-organismes peuplant les intestins humains. Ces micro-organismes, notamment les bactéries, forment une association intime, durable et à bénéfice mutuel avec l'Homme, on parle de symbiose hôte-microbiote.

Depuis plus de 10 ans, la littérature scientifique relate chez l'Homme obèse, souffrant de troubles intestinaux, de maladies métaboliques ayant une composante immunitaire (obésité-diabète) ou de pathologies intestinales (syndrome du côlon irritable, syndrome inflammatoire de l'intestin, maladie de Crohn) un déséquilibre de la composition du microbiote intestinal que l'on qualifie de dysbiose intestinale. Plus récemment notre équipe a montré que la dysbiose correspond à une réelle altération de la symbiose hôte-microbiote. Cette dysbiose combine une distorsion du microbiote et une perturbation du statut immunitaire, chacune pouvant potentiellement aggraver l'autre et conduire à un état « pathologique ».

Des signatures récurrentes de dysbiose ont été décrites. Elles comprennent une perte de richesse du microbiote en termes d'espèces ou de gènes, des proportions plus faibles de bactéries productrices d'acides gras volatils souvent associées à des proportions plus fortes de bactéries à l'origine d'inflammations. Parmi les sujets obèses et en surpoids, ceux présentant un microbiote avec une faible diversité de gènes bactériens ("Low gene count" ; LGC) ont tous un trouble du métabolisme et une inflammation plus prononcés que les sujets à grande diversité de gènes bactériens ("High gene count" ; HGC). Une intervention nutritionnelle peut cependant corriger partiellement les facteurs de risques associés à un LGC, l'apport de fibres alimentaires diversifiées promouvant la diversité globale du microbiote dominant.

Aucune des approches thérapeutiques ou nutritionnelles actuelles dans les maladies immunes ne prend en compte conjointement la distorsion du microbiote et la perturbation du statut immuno-inflammatoire. Dans notre projet nous allons associer des bactéries vivantes aux propriétés anti-inflammatoires et/ou anti-oxydantes et un mélange de structures de type fibre afin de cibler les deux composantes de la symbiose hôte-microbiote. L'objectif est de retarder, prévenir et/ou traiter la rupture de la symbiose dans un modèle animal de dysbiose induite. Le but à terme est de retarder, prévenir et/ou soigner les grandes pathologies de sociétés modernes qui ont toutes une composante immune. Il est actuellement impossible de réaliser ce modèle d'inflammation légère de l'intestin sans l'apport de l'expérimentation animale car cela nécessite la mise en place d'interactions complexes hôte-microbiote que la culture d'organes séparés ou toute autre méthode alternative actuelle ne saurait reproduire.

Le modèle le plus approprié pour ce projet est le rongeur, et plus spécifiquement le rat qui présente une symbiose hôte-microbiote suffisamment similaire à celle de l'Homme. Dans la première partie de notre étude nous utiliserons un maximum de 130 rats par an. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum possible sans nuire à la qualité statistique des données, le résultat des premières procédures du projet permettra encore de réduire ce nombre. Les rats sont hébergés en cages transparentes leur permettant de garder une communication visuelle et auditive avec leurs congénères. Un enrichissement de milieu composé notamment de bâtonnets en bois à ronger est mis en place. Enfin, la souffrance éventuelle des animaux est minimisée autant que possible notamment par l'utilisation de méthodes faiblement invasives comme l'imagerie. L'euthanasie et l'ensemble des prélèvements sont réalisés à l'aide de méthodes anesthésiques et analgésiques adéquates (anesthésie à l'isoflurane, ou par injection de Kétamine/Xylazine pour l'imagerie).

2340- Le foie est un organe majeur et vital qui intervient dans différentes voies indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Il a à la fois une fonction d'épuration (élimination des toxines naturelles ou ingérées telles que les médicaments ou l'alcool), de synthèse (métabolisme des glucides, lipides et des protéines) mais aussi de stockage (vitamines et glycogène). Le foie étant constamment exposé aux antigènes alimentaires et aux produits de la flore intestinale, il déploie des mécanismes de tolérance immune remarquables tout en maintenant sa capacité à élaborer une réponse efficace en cas d'infection.

L'hépatite est définie comme une inflammation du foie qui peut être induite par des agents infectieux ou toxiques ; dans le cas d'exposition répétée aux agents, elle peut devenir une maladie chronique conduisant à une fibrose hépatique, elle-même propice au développement du cancer du foie. Son étiologie au niveau mondial est d'origine virale le plus souvent. Il existe parallèlement des hépatites d'origine non virale et dont la cause peut-être la consommation chronique d'alcool (1^{ere} cause d'hépatite en France), une intoxication médicamenteuse (paracétamol) ou chimique (solvants industriels, pesticides) ou encore associées à des maladies de type auto-immunes, syndrome de Wilson ou stéatose hépatique non alcoolique.

Notre laboratoire a développé différents modèles expérimentaux chez la souris pour étudier les différents types d'hépatite in vivo en utilisant le virus de l'hépatite murine, des agents toxiques ou des agents stimulant la réponse immunitaire tels que la Concanavaline A. Le « Remplacement » par des approches in vitro ne peut pas être envisagé pour l'étude d'un processus physiopathologique aussi complexe que celui de l'hépatite qui implique différents organes et types cellulaires. Les études de ces modèles in vivo d'hépatite ont permis de faire un état des lieux à différents temps (12h, 24h, 48h..) de l'avancée de la maladie et des mécanismes moléculaires et cellulaires responsables. Cependant elles ne permettent pas de faire un véritable suivi de la maladie dans un véritable continuum temporel.

Le nouveau développement technologique que représente l'imagerie optique in vivo en temps réel permet aujourd'hui de suivre dès les temps précoces et sur plusieurs jours, voire semaines, l'évolution de la maladie ou les effets d'un traitement sur un même animal, vivant et endormi, de façon non invasive et indolore. Cette technologie s'inscrit donc complètement dans la politique des 3R avec une amélioration considérable apportée au niveau « Réduction » puisque un même animal sera observé à différents temps de la maladie (au lieu de 1 animal par temps) mais aussi au niveau « Raffinement » car chaque animal sera suivi personnellement et très régulièrement sans intervention invasive ou douloureuse.

Notre projet pour lequel cette saisine est déposée est le développement d'outils et le test de différentes sondes utilisables en imagerie optique in vivo en temps réel et applicables à notre thématique de recherche pour une meilleure compréhension de l'enchaînement des événements moléculaires et cellulaires dans le temps et dans l'espace durant l'hépatite.

Un certain nombre de sondes utilisables en imagerie in vivo ont été développé mais encore peu ont été appliquées au modèle du foie en général et des hépatites en particulier. Nous souhaitons appliquer cette technologie au modèle in vivo d'hépatite aigue induite par l'injection de Concanavaline A déjà mis en place et maîtrisé par notre équipe. Ainsi, nous allons suivre cet agent inducteur Concanavaline A couplé à une molécule fluorescente afin d'identifier sa diffusion et son élimination dans l'organisme. De plus, nous utiliserons différentes sondes et une lignée de souris transgénique pour quantifier et analyser l'atteinte hépatique globale et l'état inflammatoire associé.

Nous utiliserons des souris blanches albinos afin de déterminer (1) l'efficacité de ces sondes pour l'étude de ces phénomènes dans un tissu profond comme le foie, et (2) les temps d'intérêt dans la cinétique de la maladie pour chacune de ces sondes et (3) acquérir des nouvelles connaissances sur les mécanismes de la maladie. Un fois les sondes pertinentes déterminées, nous étudierons celles-ci chez des souris noires qui, par la présence de leurs poils noirs et de leur peau riche en mélanine, pose des difficultés techniques à l'imagerie optique in vivo. Le transfert de la technologie sur des souris noires est justifié scientifiquement par le fait que la plupart des souris rendues déficientes pour un gène sont créées à partir de ces souris noires; elles présentent ainsi un intérêt scientifique majeur pour comprendre la fonction de certains gènes en particulier.

Pour mener à bien ces études, nous prévoyons d'utiliser 440 souris sur 4 ans.

2341- Le diabète est une pathologie systémique caractérisée par un défaut de sécrétion et/ou d'inactivité de l'insuline. L'augmentation croissante du diabète et pathologies associées dans le monde en fait désormais un problème de santé publique nécessitant l'amélioration de la qualité des soins, la prise en charge thérapeutique et la maîtrise des coûts de traitement. L'enjeu de notre projet est donc de mettre au point l'induction d'une hyperglycémie chez le rat (après injection de Streptozotocine) afin de tester l'efficacité de différents traitements. Toutes les données issues de ce type d'études sont essentielles au développement de nouveaux produits à visée thérapeutique ou de nouveaux excipients et aucun modèle in vitro ne peut se substituer à l'utilisation de modèles animaux pour des pathologies métaboliques, que ce soit dans le cadre d'étude d'efficacité, de pharmacocinétique ou d'évaluation de risque toxicologique. Un suivi du produit dans l'organisme entier (détection dans le sang/plasma) est également possible associé au suivi de la glycémie des animaux. De plus, ce projet pourra aussi être associé au projet n°00570.01 déjà détenu par notre société (Projet excipient associé à protéine recombinante thérapeutique dans le traitement des ulcères du pied diabétique et autres plaies chroniques invalidantes). Deux procédures expérimentales sont donc prévues dans ce projet: développement de l'induction du modèle diabétique et évaluation de différents traitements. Seuls des rats seront utilisés et chaque prélèvement/administration se fera en nombre limité et sous anesthésie générale (sauf en cas d'administration intra-péritonéale). Ce type de projet ne nécessitant pas d'hébergement individuel, les animaux seront en collectivité avec un enrichissement du milieu adapté. Le nombre d'animaux par étude sera réduit au minimum tout en évitant de compromettre les résultats du projet lié à la variabilité inter-individuelle. Au total, 600 animaux pourront être utilisés en 5 ans. Ce nombre pourra éventuellement être réduit si les résultats préliminaires le permettent.

2342- La priorité nationale étant de promouvoir et d'améliorer l'accès au don d'organe, chaque région possède un service de Coordination Hospitalière Régionale. En raison d'un nombre important de patients en attente sur liste de greffe avec, pour certains, un pronostic vital engagé, l'Agence de la Biomédecine organise la promotion de la formation de tous les acteurs des secteurs de soins critiques et des chirurgiens impliqués dans l'activité du prélèvement d'organe pour la greffe.

Le projet s'inscrit donc dans le cadre de la sensibilisation et de la formation de ces acteurs. L'objectif est de leur apporter les connaissances médicales et juridiques, et de les mettre en pratique.

Le module se déroulera en deux étapes. D'abord une formation théorique qui se déclinera en plusieurs sujets tels que la prise en charge du donneur en secteur de soins critiques et au bloc opératoires (3h), l'information aux proches du donneur, recueil de l'opposition au don (3h), et mise en situation (3h).

Ensuite une formation technique (6h30) au bloc opératoire permettra la mise en situation d'un prélèvement d'organe complet sur modèle porcin. Au cours de cette session, les acteurs aborderont les différentes étapes d'anesthésie, d'exploration anatomique, de canulation des gros vaisseaux et refroidissement des organes, de prélèvement du foie et des deux reins et conditionnement des organes, de conditionnement des reins sur machine à perfuser pulsatile, de restitution corporelle. A la fin de la formation, une évaluation et un bilan seront réalisés avec tous les participants (1h).

Dans le cadre de ce projet, tout sera mis en œuvre pour respecter au mieux la règle des 3R :

(Remplacer) L'apprentissage sur le modèle porcin est celui qui procure le plus de similitude avec l'Homme. Cette formation par simulation "in vivo" est indispensable avant de pratiquer soi-même un geste sur un patient.

(Réduire) Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum, en considérant que 2 animaux par session, à raison d'une session par an, permettront de former 20 personnes par an, soit 10 animaux au total pour le projet sur 5 ans.

(Raffiner) La souffrance et l'angoisse de l'animal seront prévenues par la réalisation d'une anesthésie générale pendant toute la durée du protocole. Aucun animal ne sera réveillé, l'euthanasie étant réalisée sous anesthésie générale.

2343- Le laboratoire développe depuis de nombreuses années des anticorps pour des applications diagnostiques dans des domaines tels que l'oncologie, les maladies infectieuses, les intoxications etc..., ou comme outils mis à la disposition de la communauté scientifique visant à répondre à des questions fondamentales scientifiques. A titre d'exemples, des immunodosages impliquant des anticorps polyclonaux ont par le passé été produits contre des molécules chimiques, tels que des médicaments (anti rétroviraux) ou encore contre des phages, virus de bactéries. L'objectif de ce travail sera de produire en quantité suffisante des anticorps polyclonaux dirigés contre différentes cibles (peptides, protéines, haptènes, virus ou bactéries inactivés...). Ces anticorps permettront la mise au point de tests rapides de détection ou de dosages immunologiques. Ils pourront être également utilisés dans des méthodologies d'analyses biochimiques (Western-blot, immunopurification, etc...).

Les animaux utilisés (330 lagomorphes sur 5 ans) dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité dans des élevages agréés. Nous veillons à n'utiliser que le nombre minimum d'animaux nécessaire pour assurer la validité des expériences, qu'il est impossible de remplacer par un modèle cellulaire pour obtenir des sérums contenant des anticorps. Les antigènes seront injectés aux animaux en présence d'adjuvant. Le niveau et le type de réponse immunitaire induit chez l'animal seront évalués in vitro après prélèvement de sang.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. L'application de critères d'arrêt, le suivi quotidien des animaux hébergés en groupes, l'enrichissement de leur alimentation au moyen de rondins de luzerne permettent de garantir le bien-être des animaux.

2344- Les maladies transmises par les tiques, actuellement en pleine émergence, sont très nombreuses, provoquent une morbidité et une mortalité très importantes à travers le monde, et concernent à la fois les animaux et les hommes. A présent, la lutte contre les tiques est essentiellement basée sur l'utilisation d'acaricides qui, outre le fait d'atteindre la faune non cible, sont polluants pour l'environnement et pour les produits issus de l'élevage, et génèrent des résistances chez les tiques. Identifier de nouvelles méthodes de lutte contre les tiques représente donc une urgence à l'heure actuelle. L'objectif du présent projet est de valider des candidats vaccinaux (au nombre de 5 dans un premier temps) identifiés chez *Ixodes ricinus* comme étant impliqués dans la transmission de bactéries. Trois formulations de ces candidats sont prévues. Dans un premier temps, les différentes formulations vaccinales seront administrées à l'animal de laboratoire (souris) afin d'évaluer les réponses immunitaires et les effets secondaires possibles induits. Dans un second temps, et en fonction des résultats obtenus, l'impact de la vaccination sera évalué sur le gorgement de tiques (prise du repas de sang des tiques sur les animaux en expérimentation) maintenues en élevage et sur la transmission d'agents pathogènes (*Bartonella* sp., *Anaplasma* sp.). Six lapins et 40 souris seront utilisés par candidat et par formulation, soit un maximum de 90 lapins et 600 souris pour les 5 années du projet. La bonne tolérance des substances biologiques administrées (antigènes, vecteur recombinant, adjuvant) est documentée. Seule une réaction de type inflammatoire peut survenir localement au site d'injection. Aussi bien pour les souris que pour les lapins, le gorgement de tiques n'induit qu'une douleur modérée. Les animaux sont simplement gênés par la capsule posée sur leur dos pour les souris et par les manchons en tissus posés sur les oreilles des lapins. Il n'y a donc pas de point limite à définir. Cependant différents évènements indésirables peuvent survenir comme : (1) s'il s'avérait qu'un animal se trouve en état de choc anaphylactique due aux piqûres de tiques, ou (2) qu'un animal s'automutile; dans ce cas cet animal serait euthanasié pour pallier à sa souffrance. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet permettront d'une part d'augmenter les connaissances sur les modalités du gorgement des tiques et de la transmission d'agents pathogènes par ces

dernières ; et d'autre part d'identifier des candidats vaccinaux permettant de lutter contre *I. ricinus*, qui représente, en Europe, le premier vecteur d'agents pathogènes responsables de maladies à la fois chez l'Homme et l'animal.

2345- Chez l'homme, de nombreuses maladies monogéniques touchant le système immunitaire et sanguin sont connues. Par exemple, plus de 150 formes d'immunodéficience primaire existent et empêchent les malades de lutter efficacement contre les microbes. Les hémoglobinopathies telles que la drépanocytose font partie des maladies génétiques sanguines les mieux connues et cette pathologie invalidante touche des millions d'individus dans le monde. De nombreux groupes travaillent pour découvrir de nouvelles thérapies pour ces maladies génétiques. Notre laboratoire a contribué à démontrer que la thérapie génique peut être efficace pour traiter certaines pathologies du système sanguin et immunitaire. L'approche repose sur le transfert de gène dans les cellules sanguines à l'aide de vecteurs viraux.

Notre laboratoire s'intéresse donc à développer de nouvelles approches de thérapie génique et à tester des composés additifs capables d'optimiser l'étape de transfert de gène dans les cellules souches sanguines dites cellules souches hématopoïétiques (CSH). Il est donc important de pouvoir vérifier l'efficacité et l'innocuité des traitements des CSH humaines sur leur capacité à se ré-implanter dans la moelle osseuse et à reconstituer au cours du temps un système immunitaire et sanguin complet, un pré-requis pour envisager une application clinique.

A ce jour, il est impossible d'étudier la capacité de greffe des CSH humaines *in vitro* mais cette question peut se poser dans un modèle *in vivo* pertinent. Il s'agit de souris dites « humanisées » qui sont des souris immunodéficientes (telles que les souris NSG) dans lesquelles sont greffées des CSH humaines afin d'observer la production d'un système sanguin chimère homme/souris pendant plusieurs mois.

Nous proposons donc d'utiliser les souris NSG pour étudier les propriétés fonctionnelles des CSH humaines génétiquement modifiées *in vivo*.

Le protocole consiste 1) à isoler des CSH humaines, issues de sang de cordon ombilical, et les modifier génétiquement (étape de transduction) selon diverses conditions; 2) à préparer les souris NSG à la greffe par injection intrapéritonéale de Busulfan, un protocole de chimiothérapie nécessaire pour une greffe hématopoïétique efficace. Nous avons fait le choix du Busulfan, plutôt qu'un protocole d'irradiation, car cela permet de diminuer fortement la mortalité des animaux et représente un niveau modéré de douleur ; 3) à injecter aux souris ainsi conditionnées les CSH génétiquement modifiées par voie intraveineuse dans le sinus retro-orbital (niveau douleur modéré) ; puis après plusieurs semaines 4) à prélever le sang de ces souris sous anesthésie pour mesurer la présence de cellules humaines. Ce prélèvement sera effectué dans la veine mandibulaire plutôt qu'un prélèvement dans le sinus rétro-orbitaire, plus douloureux (Raffinement) et enfin 5) à sacrifier les souris après 12 à 16 semaines afin de rechercher la présence des cellules humaines dans les différents organes et de les étudier. Le protocole comptera 9 souris NSG par test (nombre prérequis dans nos études statistiques), correspondant à l'injection de cellules CSH transduites dans l'une des 10 conditions tests et 2 groupes contrôles. Comme il a été montré précédemment que la prise de greffe dans les souris NSG mâles est beaucoup moins efficace que dans les souris NSG femelles, seules les souris NSG femelles seront injectées. Pour l'ensemble de notre projet, qui durera 5 ans et compte tenu des paramètres qui seront analysés, nous estimons à 297 le nombre de souris nécessaires à notre étude.

Afin de respecter le principe de remplacement, des méthodes alternatives ont été recherchées mais ne sont pas disponibles. Afin de respecter le principe de raffinement les souris humanisées femelles traitées au busulfan seront utilisées permettant une forte prise de greffe. Afin de respecter le principe de réduction, et pour éviter de tester des animaux inutilement, les conditions seront d'abord testées dans des modèles *in vitro* afin de vérifier l'absence de toxicité cellulaire.

2346- Le but de ce projet vise à comprendre la régulation du maintien de l'intégrité du tissu osseux. Le projet est entièrement dédié à l'étude de la seule cellule l'organisme qui a la capacité unique de dégrader l'os. Cette cellule est l'Ostéoclaste. Grâce à des modèles de souris, le projet va permettre d'étudier l'effet de spécifique d'un facteur de croissance présent dans l'os le Transforming Growth Factor de type 2 (TGF β) dans la cellule ostéoclaste que ce soit au niveau de la structure osseuse à l'état normal ou en situations expérimentales de perte osseuse. Le projet va consister tout d'abord à générer 2 nouvelles lignées de souris génétiquement modifiées afin de d'inhiber ou d'induire une activation permanente des ostéoclastes par le TGF β . La qualité du tissu osseux de ces animaux sera tout d'abord évaluée par microtomographie en absence de toute autre manipulation. Puis la qualité du tissu osseux de ces animaux sera évaluée dans deux conditions pathologiques grâce à la mise en place de deux modèles expérimentaux viables pour l'étude de la perte osseuse qui présentent toutes les caractéristiques pour le premier de l'ostéoporose et pour le deuxième de l'arthrite rhumatoïde. Le premier modèle reproduisant l'ostéoporose est un modèle couramment utilisé consistant à induire une carence en œstrogène par ovariectomie chez la souris âgée de 9 semaines. L'impact sur la qualité et la structure de l'os est quantifié au bout de 4 semaines par microtomographie. Le deuxième modèle reproduisant l'arthrite rhumatoïde est un modèle couramment utilisé consistant à induire une inflammation articulaire par injections intrapéritonéales de sérum de souris K/BxN. L'impact sur la qualité et la structure de l'os articulaire est quantifié par microtomographie sur une période de 3 semaines. Ceci nous permettra de proposer le développement de nouvelles approches thérapeutiques visant à moduler les effets du TGF β dans les pathologies osseuses. Les animaux seront suivis quotidiennement et toutes les procédures expérimentales seront réalisées en tenant compte de la règle des 3R. Remplacer : Aucune expérience menée *in vitro* n'est capable de reproduire la complexité physiologique du tissu osseux. Raffiner : Les expériences seront menées en tenant compte de la sensibilité des animaux à l'environnement et à la douleur. Les souris seront mises à mort à la fin des protocoles selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever les échantillons tissulaires permettant l'analyse du métabolisme osseux. Réduire : Le nombre total d'animaux sera limité à 360 souris sur une période de 5 ans

2347- La malnutrition protéino-énergétique (MPE) est actuellement le problème nutritionnel le plus important qui touche environ un cinquième des enfants dans les pays en voie de développement. La MPE est caractérisée par une modification de la structure et de la fonction de la muqueuse intestinale. Elle est associée à un syndrome de malabsorption, des troubles de la perméabilité de la muqueuse, et de l'inflammation.

Le microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans la digestion des aliments, étant responsable de l'extraction et la synthèse des nutriments et d'autres métabolites qui sont essentiels pour le maintien de la santé.

Plusieurs maladies ont été associées à un déséquilibre du microbiote intestinal et, récemment, il a été démontré que le microbiote intestinal était impliqué dans la propagation du Kwashiorkor, une forme grave de MPE.

Cette étude vise à déterminer si une modification du microbiote intestinal peut améliorer l'état nutritionnel des personnes sous-alimentées. La compréhension du rôle du microbiote sur la malnutrition pourrait être déterminante pour avancer des stratégies thérapeutiques.

Dans ce but, des souris axéniques (ne comportant pas de bactéries dans l'intestin ou sur d'autres surfaces du corps) seront colonisées par différents microbiotes provenant de souris ayant reçu des régimes alimentaires différents (normal, riche en matières grasses ou à faible teneur en protéines). Ces souris colonisées recevront ensuite un régime pauvre en protéines, régime simulant une alimentation de pays en voie de développement. Nous étudierons alors l'impact des différents microbiotes sur le développement de la MPE.

Pour une telle étude, le recours à l'animal est indispensable car on étudie la relation entre l'alimentation, l'hôte et ses bactéries avec l'ensemble des interactions que cela implique.

Pour cette étude nous allons donc utiliser 6 souris C57Bl/6 qui se diviseront en 3 groupes de 2 souris qui recevront une alimentation très différente. Ces souris seront les donneuses de microbiotes. 2 souris par groupe est un minimum d'une part d'un point de vue éthique car la souris est un animal vivant en groupe et d'autre part d'un point de vue scientifique afin de ne pas mettre en péril l'expérimentation si un problème survient sur une souris.

Ensuite nous utiliserons 3 groupes de 12 souris C57Bl/6 receveuses de microbiotes. 12 est un nombre minimal pour obtenir des résultats statistiquement pertinents.

Toutes ces souris seront pesées de façon hebdomadaire, le seul traitement étant constitué par le régime pauvre en protéines.

Durant l'expérience nous ferons pour les 42 souris 2 séries de prélèvements de fèces de façon naturelle (le simple fait de prendre la souris la fait déféquer naturellement) et pour les 36 receveuses nous ferons avant leur euthanasie un prélèvement de sang au niveau de la joue en respect avec la réglementation.

Compte tenu de la faible invasivité du protocole, aucune souffrance animale n'est attendue dans cette étude. Toutes les souris auront dans chaque cage un enrichissement du milieu par l'ajout de Sopalain (pour faire un nid) et d'un bâton de bois à ronger.

2348- Le sepsis sévère et le choc septique représentent 10% des admissions en réanimation et reste aujourd'hui un problème majeur de santé publique avec 50% de mortalité. La physiopathologie du sepsis est complexe et il apparait de plus en plus clairement que la microcirculation (ensemble des vaisseaux sanguins de moins de 100µm) joue un rôle clé dans l'apparition des altérations tissulaires précédant la mort.

Les Cellules Stromales Mésoenchymateuses humaines (CSM) sont une population de cellules issues principalement de la moelle osseuse. Des travaux récents ont montré que des CSM injectées par voie veineuse au cours du sepsis sévère chez la souris amélioreraient leur survie. Il a également été montré qu'il était possible d'augmenter l'efficacité des CSM en les pré-informant de l'environnement dans lequel elles seraient injectées. Toutefois peu de données sont disponibles sur les mécanismes protecteurs mis en jeu.

Les risques, consécutifs à l'injection de cellules entières hétérologues, sont le principal obstacle à l'utilisation des thérapies cellulaires chez l'homme. De récentes études ont mises en évidence que les microvésicules (MV), longtemps considérées comme des débris cellulaires, pourraient jouer le rôle de médiateur thérapeutique entre la cellule dont elles sont issues (CSM) et les tissus environnants. Il nous semble donc important de vérifier si les MV présentent les mêmes effets bénéfiques que les cellules dont elles sont issues et ainsi envisager à terme de substituer l'utilisation des cellules entières les MV.

Dans ce projet nous allons tester, sur 327 souris Balb/c mâles, rendues septiques par injection intra-péritonéale de fèces, les effets de différentes suspensions de CSM ou MV obtenues dans différentes conditions de culture cellulaire in vitro. Dans un modèle d'étude de la microcirculation de muscle squelettique, nous mesurerons l'interaction entre les globules blancs (GB) et l'endothélium vénulaire ainsi que le nombre de GB présents dans le tissu environnant. Ces paramètres, reflets de la réponse inflammatoire locale, sont augmentés au cours du sepsis. Ils seront évalués précocement (entre 5 et 6 heures : H6) et à plus long terme (entre 25 et 26 heures : H26) après induction du sepsis. Ces expérimentations permettront aussi d'évaluer l'effet bénéfique des traitements sur la mortalité due au sepsis.

L'objectif principal de ce travail est:

- Déterminer si les traitements testés améliorent la survie des souris en situation de choc septique sévère à H26 et si cet effet est associé à une diminution de la réponse inflammatoire microvasculaire à H6 et H26

Les objectifs secondaires sont :

- Si les effets microvasculaires sont décelables précocement (H6), ce qui nous permettrait de tester de nouvelles conditions de culture sans attendre la phase létale du sepsis.

- Et enfin si nous obtenons une concordance entre les résultats obtenus in vivo et in vitro, nous permettant à terme de ne plus avoir recours aux animaux pour tester de nouvelles thérapies.

Lors de l'analyse des premiers résultats de la série H26, si nous ne retrouvons pas les effets bénéfiques des CSM sur la survie ou les paramètres microcirculatoires, alors nous arrêterons l'ensemble de cette série expérimentale.

Dans toutes nos expérimentations la réduction de la douleur, induite par le sepsis, sera faite par injection de Buprénorphine.

2349- Le but de ce projet vise à comprendre les mécanismes de la formation osseuse. Le projet est dédié à l'étude de la cellule responsable de la Résorption de l'os. Cette cellule est l'Ostéoclaste. Grâce à des modèles de souris, le projet va permettre d'étudier l'effet de l'inhibition spécifique dans la cellule ostéoclaste de l'expression de l'Autotaxine d'une part et du récepteur de type 1 de l'acide lysophosphatidique (LPA1) d'autre part que ce soit au niveau de la structure osseuse à l'état normal ainsi qu'en situation expérimentales analogues à deux pathologies humaines que sont l'ostéoporose et la polyarthrite rhumatoïde. Le projet consiste tout d'abord à générer 2 nouvelles lignées de souris génétiquement modifiées afin de stopper la production d'ATX d'une part et de LPA1 d'autre part spécifiquement dans les ostéoclastes. La qualité du tissu osseux de ces animaux sera tout d'abord évaluée par microtomographie en absence de toute autre manipulation. Puis la qualité du tissu osseux de ces animaux sera évaluée dans deux conditions pathologiques grâce à la mise en place de deux modèles expérimentaux viables pour l'étude de la perte osseuse qui présentent toutes les caractéristiques pour le premier de l'ostéoporose et pour le deuxième de l'arthrite rhumatoïde. Le premier modèle reproduisant l'ostéoporose est un modèle couramment utilisé consistant à induire une carence en œstrogène par ovariectomie chez la souris âgée de 9 semaines. Le deuxième modèle reproduisant l'arthrite rhumatoïde est un modèle couramment utilisé consistant à induire une inflammation articulaire par injections intrapéritonéales de sérum de souris K/BxN. L'impact sur la qualité et la structure de l'os sera quantifié par microtomographie qui est une technique d'analyse non invasive et non douloureuse. Ceci nous permettra de proposer le développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant dans les pathologies osseuses. Les animaux seront suivis quotidiennement et toutes les procédures expérimentales seront réalisées en tenant compte de la règle des 3R. Remplacer : Aucune expérience menée in vitro n'est capable de reproduire la complexité physiologique du tissu osseux. Raffiner : Les expériences seront menées en tenant compte de la sensibilité des animaux à l'environnement et à la douleur. Les souris seront mises à mort à la fin des protocoles selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever les échantillons tissulaires permettant l'analyse du métabolisme osseux. Réduire : Le nombre total d'animaux sera limité à 360 souris sur une période de 5 ans.

2350- Les biomatériaux sont étudiés afin de développer des produits de substitution osseuse utilisés chez l'Homme lors de fracture ne cicatrisant pas spontanément, afin d'obtenir une arthrode (intervention chirurgicale visant à immobiliser définitivement une articulation), afin de combler une perte osseuse trabéculaire dans certaines affections comme l'ostéoporose... Il est possible, dans ces indications, d'utiliser des autogreffes, des allogreffes voire des xélogreffes. Toutefois, le volume de l'autogreffe est limité et il a été montré que le site de prélèvement est à l'origine chez un certain nombre de patients de douleurs importantes pouvant persister pendant plusieurs mois (11% à 1 an). Pour les allogreffes et les xélogreffes, le problème de la stérilisation sans dénaturer la structure osseuse est primordial pour éviter la transmission de maladies et n'est toujours pas parfaitement résolu. L'utilisation des biomatériaux de synthèse est donc une voie de développement depuis une vingtaine d'années.

Les biomatériaux étudiés font toujours l'objet d'études in vitro préalables permettant d'éliminer certains biomatériaux en raison d'effets délétères. Néanmoins, une étude in vivo est nécessaire avant l'utilisation en chirurgie humaine afin d'apprécier les effets sur un organisme vivant. Il s'agit d'une recommandation de la norme ISO 10993-6 lors du marquage CE.

Plusieurs espèces animales peuvent être utilisées pour des études sur les biomatériaux en fonction de la taille du défaut osseux que l'on veut traiter et du type de biomatériaux de substitution (forme, taille...). Le rat sera utilisé pour l'étude de biomatériaux de petite taille adaptés tels que des vis, tiges ou granules. Le projet s'effectuera en partenariat avec des industriels spécialisés dans l'ingénierie des biomatériaux.

L'objectif du projet est de tester des biomatériaux de substitution in situ osseux en vue d'une application chez l'homme. Nous prévoyons de tester 3 types de biomatériaux. Une étude cinétique sera effectuée afin d'analyser l'interface d'ancrage os/biomatériaux ainsi que la résorbabilité dans le temps lorsque le biomatériau utilisé est de type résorbable. L'intérêt d'un biomatériau résorbable implanté chez l'homme est qu'il ne nécessite pas une seconde intervention chirurgicale pour le retirer une fois la réparation osseuse effectuée. Afin de caractériser le devenir des biomatériaux testés in vivo, des techniques d'imagerie à Rayons X (radiographie numérique, microtomographie et nanotomographie) seront utilisées et des analyses histologiques seront effectuées. L'ensemble des données obtenues par l'imagerie et l'histologie seront comparées avec celles obtenues avec l'implantation d'un biomatériau de référence en titane implanté dans le membre controlatéral du même animal. Notre projet implique l'utilisation de 144 rats. L'effectif de chaque groupe est celui minimal pour obtenir des informations valides et des tests statistiques performants. Le matériau de référence sera implanté dans le membre controlatéral du même animal recevant le biomatériau à tester, permettant de réduire le nombre de groupes d'animaux de moitié. Le geste opératoire sera réalisé sous anesthésie générale. Une analgésie per- et postopératoire sera effectuée pour limiter la douleur. Une grille d'évaluation du bien-être animal permettra de déceler toute altération nécessitant une prolongation/augmentation de l'analgésie et/ou exclusion d'un animal. Le bien-être sera suivi quotidiennement par un personnel qualifié impliqué dans le projet.

2351- L'anxiété et la dépression sont associées à des perturbations fonctionnelles et structurales de certaines régions cérébrales, notamment l'hippocampe. Ces mêmes modifications ont également été observées post mortem chez des patients souffrant de dépression. L'état d'activation hippocampique est donc un point majeur de la pathologie dépressive.

Ainsi, ce projet expérimental a pour objectif la compréhension de l'implication cet l'état d'activation (électrique) de l'hippocampe dans des modèles murins dépressifs ou non. Nous nous intéresserons aux conséquences de telles modifications au niveau neurochimique et au niveau comportemental.

L'évaluation de systèmes cérébraux impliqués dans des processus aussi complexes que l'émotivité requiert de l'expérimentation *in vivo*. Pour l'ensemble de ce projet, 80 animaux seront utilisés.

Ce nombre d'animaux prend en compte la règle dite des 3R. Il s'agit de réduire le nombre d'animaux de raffiner la qualité des expériences et de remplacer si possible l'expérimentation animale. Dans l'état actuel des connaissances modéliser *in vitro* ou *in silico* des troubles de l'humeur n'est pas possible. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire pour étudier ces pathologies. Notre expérience se basera sur le couplage de deux techniques effectuées chez les mêmes animaux. Ce couplage permet à la fois de diminuer le nombre de souris nécessaires à l'expérience ainsi que d'apporter des données scientifiques solides, chaque animal étant son propre témoin. Par ailleurs l'ensemble de ce projet définit clairement des points limites au delà desquels les animaux seraient sacrifiés en cas d'inconfort ou de souffrance.

2352- Pour l'évaluation neurochimique, la combinaison de la stimulation de l'hippocampe par optogénétique avec la microdialyse striatale permettra d'évaluer la libération dopaminergique (neurotransmission largement impliquée dans le contrôle de l'humeur). L'optogénétique est une méthode novatrice basée sur des animaux transgéniques exprimant des protéines photosensibles appartenant à la famille des opsines. Par manipulation génétique, ces protéines vont être exprimées dans des populations neuronales précises. Ces cellules devenues photosensibles seront activés par de la lumière qui sera appliquée à leur proximité. Techniquement, une fibre optique reliée à un laser sera implantée dans l'hippocampe des souris. Dans notre expérience, cette technique permettra simplement d'activer l'hippocampe « sur commande ».

La microdialyse repose sur l'implantation d'une membrane semi-perméable dans le striatum de nos animaux. Cette membrane sera perfusée avec un liquide d'une composition équivalente au milieu cérébral. Ceci permettra de collecter des dialysats qui seront le reflet de la composition du milieu extracellulaire. Nous y doserons la donc dopamine.

Parallèlement, le comportement des souris sera évalué par différents tests comportementaux, non-invasifs. Ces tests permettront de visualiser les effets de la stimulation de l'hippocampe en considérant l'animal dans son ensemble.

Enfin, les cerveaux des animaux seront examinés *post mortem* afin de valider la localisation des éléments implantés (fibres optiques et sonde de microdialyse) et pour évaluer les effets tissulaires de l'expérimentation.

Globalement, ce travail permettra de contribuer à l'identification détaillée des populations neuronales impliquée dans l'anxiété/dépression et ses conséquences comportementales. Ceci constitue une étape fondamentale pour le design de nouvelles stratégies thérapeutiques qui seraient plus ciblées et de ce fait certainement plus efficaces.

2353- Le clignement des yeux et l'exposition au milieu extérieur provoquent des lésions chroniques de certaines cellules de la cornée. Les cellules endommagées sont remplacées par de nouvelles cellules formées à partir d'un petit nombre de cellules souches : les cellules limbiques localisées à la périphérie de la cornée dans une zone appelée le limbe. Une perte des cellules souches limbiques à la suite d'une blessure ou d'une maladie se traduit par une incapacité de réparer les lésions de la cornée et une perte de vision significative.

Des recherches récentes ont permis d'améliorer les techniques de culture *in vitro* des cellules souches limbiques ainsi que les techniques de transplantation de cellules souches embryonnaires ou de cellules induites à la pluripotence (iPS).

Dans le cadre d'un essai préclinique mené chez la souris pour tester le pouvoir régénératif de cellules souches humaines mésenchymales, un modèle d'abrasion du limbe cornéen à l'aide d'une fraise à cornée (Algerbrush) est mis au point chez la souris. La démonstration de la technique par un ophtalmologiste de renom se déroulera sur 10 souris pour évaluer la possibilité de transfert en interne du modèle vers une souris immunodéprimée (9 pour le transfert et 110 pour le test d'efficacité)

A la fin du projet, les animaux seront euthanasiés avec analyse histologique des tissus.

Le nombre d'animaux utilisé est adapté à la nécessité d'une formation de qualité, d'un transfert efficace et de l'analyse statistique des données générées sur la partie de l'expérimentation qui vise à établir l'efficacité thérapeutique de cette greffe. Les animaux font l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. En cas de signes cliniques, des mesures appropriées seront prises pour éviter la souffrance des animaux.

2354- Les produits testés pour ces projets sont destinés à être utilisés chez le poulet pour le traitement : d'infection bactérienne, d'infection parasitaire, de la douleur,....

Ces projets ont pour objectif d'évaluer la pharmacocinétique (devenir d'une substance active dans l'organisme après son administration) des produits étudiés.

Ainsi, après administration du produit testé chez les animaux, des prélèvements biologiques seront réalisés afin d'étudier la libération et la diffusion de la substance active du produit.

Les quatre grands processus qui composent la pharmacocinétique sont :

- o l'absorption (passage de la molécule étudiée du site d'absorption vers le sang pour pénétrer dans la circulation systémique),
- o la distribution (liaison aux protéines plasmatiques et accumulation dans certains organes ou tissus),
- o le métabolisme (transformation du médicament par le système enzymatique de l'organisme),
- o l'élimination (élimination du principe actif par l'organisme sous forme inchangée, ou sous forme de métabolites).

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 statut physiologique, leur nombre, leur poids, les doses sélectionnées et les voies d'administrations) est basée sur les lignes directrices en vigueur, les informations disponibles issues des études in vitro, les données bibliographiques ainsi que sur l'utilisation clinique ultérieure prévue.

Grâce à une bonne standardisation des essais le nombre d'animaux est optimisé tout en évitant de compromettre les objectifs du projet. Ainsi, un total de 1000 poulets maximum sera utilisé au cours du projet sur une période de 5 ans. Ce nombre a été déterminé en fonction des données déjà disponibles sur les molécules étudiées et en fonction des analyses statistiques réalisées.

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 ce projet permettront d'obtenir le profil pharmacocinétique des produits étudiés ; et donc de vérifier si ils présentent une bonne diffusion et un profil pharmacocinétique favorable (zone requise pour exercer un effet thérapeutique sans entraîner de toxicité et durée d'action).

2355- La dépression est la pathologie mentale la plus fréquente. Elle nécessite une prise en charge très longue et sera, en 2030, au plan mondial, une des pathologies les plus importantes en termes de santé et société. En plus du stress chronique, la douleur chronique est un facteur déterminant dans son apparition puisque la co-morbidité douleur chronique/dépression atteint 50%. Nous faisons l'hypothèse que des modifications de la neuroplasticité du cortex cingulaire antérieur (CCA), sous-tendent la dépression induite par la douleur chronique. Nous proposons une étude génomique et protéomique pour rechercher chez l'animal les changements moléculaires du CCA et de sa connectivité. Le projet nécessitera 280 souris de la lignée C57BL/6J et 40 souris génétiquement modifiées de la lignée Thy1-Channelrhodopsin2-YFP dans laquelle il est possible d'activer spécifiquement les neurones pyramidaux. Le projet sera conduit en respectant la règle des 3R visant à remplacer ou réduire chaque fois que possible le nombre d'animaux ainsi qu'à optimiser les procédures. En effet, les expériences seront réalisées en minimisant autant qu'il en est possible de nombre d'animaux par condition expérimentale. Elles seront réalisées dans l'optique d'obtenir le maximum d'informations scientifiques par test, pour cette raison en fin d'expérimentation, les tissus seront prélevés sur les animaux sacrifiés pour analyser les changements moléculaires. Pour pouvoir raffiner les protocoles, les animaux seront observés tous les jours et leur comportement sera suivi afin de déceler tout comportement d'inconfort.

Au regard des données de la littérature et de la variabilité phénotypique inter-individuelle, les groupes expérimentaux, explorant les comportements anxio-dépressifs liés à la douleur neuropathique, seront constitués de 20 souris. Ce projet comporte 6 procédures expérimentales, mais certains d'entre elles font partie d'un enchaînement et utilisent les mêmes animaux ce qui limite considérablement leur nombre. Le nombre d'animaux prévus est de 320.

2356- Les baies d'Açaï (*Euterpe oleracea*) sont très largement consommées au Brésil sous forme de boissons, de sorbets ou d'entremets. L'Açaï est un aliment particulièrement riche en polyphénols dont les effets bénéfiques sur la santé ont déjà été maintes fois évoqués. L'insuffisance rénale chronique touche en France 3 millions de personnes et représente un risque majeur de mortalité cardiovasculaire. L'IRC s'accompagne d'une inflammation chronique et d'un état de stress oxydant très délétères pour le système cardiovasculaire. Nous nous proposons d'étudier dans un modèle animal d'insuffisance rénale chronique (IRC), induite chez la souris par un régime alimentaire spécifique, le bénéfice d'une supplémentation quotidienne en extrait d'Açaï. L'extrait d'Açaï (0.3%), fournit par l'Institut de Nutrition de l'Université d'Etat de Rio de Janeiro (U.E.R.J, Rio de Janeiro, Brésil) sera administré aux animaux dans l'eau de boisson pendant 4 semaines et l'impact de cette supplémentation sera étudiée sur divers paramètres de l'inflammation, du stress oxydant ou du système cardiovasculaire. Quatre groupes de 10 souris noires seront utilisés soit un total de 32 animaux (16 animaux contrôle et 16 animaux insuffisants rénaux). Nous espérons observer un bénéfice "santé" pour les animaux IRC supplémentés en Açaï (réduction de l'inflammation, du stress oxydant, des lésions vasculaires) permettant d'envisager son utilisation chez l'Homme.

La présente étude est raffinée par l'utilisation d'un nouveau modèle non chirurgical pour induire l'IRC qui ne s'accompagne d'aucune douleur, détresse ou mortalité pour les animaux à comparaison du modèle chirurgical traditionnel de néphrectomie.

2357- Les volailles peuvent être sujettes à de nombreuses affections de l'appareil digestif, dont certaines peuvent être mortelles en l'absence de soins, qu'elles soient d'origine parasitaire, bactérienne, ou non infectieuses (par exemple provoquées par des mycotoxines). Au niveau mondial, on estime à 800 millions de dollars par an le préjudice économique causé par l'affection parasitaire qu'est la coccidiose. Les volailles peuvent également être responsables du portage de bactéries en cause dans des zoonoses.

L'objectif de ce projet est de tester différentes stratégies permettant de valider des solutions efficaces de lutte contre ces différents agents pathogènes, voire, le cas échéant, de constituer une alternative efficace aux antibiotiques actuellement utilisés.

Dans le cadre de ce projet, mené sur des volailles car il s'agit de l'espèce qui est sensible à ces maladies, les critères retenus pour discriminer les différentes solutions sont le gain de poids, la consommation, l'efficacité alimentaire, la mortalité et la morbidité, ainsi que des critères d'anatomie pathologique ou de biochimie spécifique des contaminations concernées. Les données de ce projet étant destinées aux différentes filières avicoles, il est indispensable de pouvoir conduire les travaux sur chacune des espèces : poulets, dindes, canards, perdrix, et ce sur les tranches d'âge correspondant aux périodes d'élevage habituelles respectives de ces espèces.

Dans le cas de certaines solutions testées, une sélection de produits pourra être faite au préalable par une méthodologie in vitro. Cependant, l'efficacité in vitro ne garantit pas que le produit ait le même comportement dans le contexte du tube digestif, ce qui explique la nécessité de pouvoir valider l'action de ces produits sur les animaux.

Les animaux seront logés en cases collectives, dans des conditions de logement similaires à celles rencontrées en élevage (en terme par exemple de densité ou de litière).

Un suivi quotidien de l'état de santé des animaux sera effectué, afin de réaliser un traitement adapté le cas échéant. L'enrichissement des cases est réalisé par la fixation de ficelles avec lesquelles les animaux peuvent jouer.

Le projet aura une durée de 14 mois, impliquant au total 2880 volailles (1440 poulets, 480 canards, 480 dindes, 480 perdrix).

2358- Les ruminants ont un système digestif très particulier puisqu'ils possèdent un estomac à plusieurs compartiments (Rumen, réseau, feuillet, caillette). Cette particularité anatomique et notamment le rumen permet à ces animaux de digérer et valoriser les parois cellulaires végétales (plus de 90% de la digestion des fibres a lieu dans le rumen), par le biais des microorganismes présents au niveau du rumen qui dégradent ces fibres par fermentation anaérobie. Lors de ces fermentations les microorganismes se multiplient et produisent des acides gras volatiles (AGV). Les AGV sont utilisés comme source d'énergie, la biomasse microbienne comme source de protéines par les ruminants. A l'inverse, parfois les microorganismes peuvent détruire certains nutriments essentiels, présents dans la ration, alors que ceux-ci sont nécessaires à l'animal. Cette étape de fermentation ruminale est donc essentielle dans le processus général de digestion chez les ruminants, mais le fonctionnement des microorganismes reste encore peu connu, et fait toujours l'objet de nombreuses recherches. Dans le contexte actuel de raréfaction des ressources naturelles et d'optimisation de l'efficacité alimentaire des animaux, il est aujourd'hui nécessaire d'affiner nos connaissances sur ce point, notamment sur l'évolution des divers composants de la ration au sein du rumen, afin d'optimiser les apports et minimiser les pertes et les rejets dans l'environnement. L'objectif de ce projet est donc d'étudier la physiologie digestive des ruminants au niveau du rumen. Ce projet concerne à la fois les fermentations qui ont lieu au sein du rumen, mais aussi l'évolution des produits issus de cette étape de fermentation (absorption sanguine, rejet etc ...). Le contenu ruminal est un milieu très complexe. Et à ce jour, la composition précise du « cocktail » de microorganismes présents n'est pas totalement connue et donc non reproductible par culture 100% in vitro. La culture in vitro est possible, mais nécessite du jus de rumen pour apporter ce cocktail de microorganismes. De ce fait, le recours à l'animal (utilisé en tant que tel ou comme donneur de jus de rumen) reste indispensable. Le modèle animal retenu est l'utilisation de vaches canulées du rumen. La canule permet en effet un accès direct au rumen sans douleur pour l'animal, quel que soit le nombre de manipulations. Plusieurs essais peuvent donc être réalisés sur le même animal, ce qui permet de minimiser le nombre d'animaux utilisés. L'utilisation de dispositif en carré latin (chaque animal est son propre témoin) lors des procédures permet également de minimiser le nombre d'animaux utilisés. L'accès direct au rumen via la canule permet ainsi d'évaluer, par des méthodes standardisées, la fermentescibilité et la valeur nutritionnelle des différents composants de la ration. Cela permet également d'évaluer l'effet des matières premières et/ou des additifs sur l'activité fermentaire et la production de produits de fermentation. Pour cela, différents indicateurs sont suivis tel que la concentration en AGV, ou en ammoniacale. L'accès au rumen permet également d'étudier l'effet des différents composants de la ration sur l'évolution du pH, paramètre essentiel pilotant l'activité des microorganismes. Ces vaches canulées au niveau du rumen sont aussi utilisées comme "donneuses" de jus de rumen. Le jus de rumen est prélevé par la canule et est utilisé comme inoculum au sein de dispositifs in vitro. Ce type de dispositif permet d'évaluer un grand nombre de composants simultanément et de réduire le nombre d'animaux qui auraient été nécessaires si ces tests avaient dû être réalisés in vivo. Il permet aussi de tester in vitro l'effet de composants de rations ou d'additifs à des doses potentiellement toxiques, sans aucun risque pour l'animal (uniquement donneur de jus). Ces méthodes in vitro ne peuvent cependant pas totalement se substituer aux méthodes in vivo (directement sur les animaux), car elles n'intègrent pas les effets potentiels de la rumination, de la salivation, de la taille du rumen et de la capacité d'adaptation des microorganismes in vivo. La canule présente sur les vaches est également utilisée pour maîtriser précisément les quantités de matières premières ou d'additifs administrés par vache. Suite au passage dans le rumen, ces différents composants d'intérêt de la ration et/ou les produits des fermentations ruminales peuvent être dosés au niveau sanguin ou urinaire, permettant d'évaluer leur absorption ou digestibilité post ruminale. Certaines des vaches présentes au niveau de l'EU sont également munies d'une canule au niveau du duodénum (début de l'intestin grêle). Cette canule permet de suivre, contrôler, mesurer les produits et résidus de fermentations issus du rumen. Cette canule permet également via la méthode dite des "sachets mobiles", d'évaluer précisément la digestibilité (quantité réellement absorbée par l'animal) des différents composants de la ration. Lors de ce projet, les animaux seront logés dans un bâtiment d'élevages équipé de logettes munies de tapis de couchage, et d'une aire d'exercice. Entre les procédures, les animaux peuvent également avoir accès à une aire paillée, ou à la pâture. Les animaux seront quotidiennement suivis par un animalier qualifié et formé, afin de détecter le plus rapidement possible les éventuels comportements anormaux (manque d'appétit, boiterie, posture anormale)

18 vaches maximum sont impliquées dans ce projet, qui durera 5 ans.

2359- La caractérisation des composants des aliments (matières premières, minéraux, additifs...) est un point primordial en nutrition animale, et cela quelle que soit l'espèce animale. Cette caractérisation permet d'ajuster la formule des aliments pour apporter la quantité nécessaire de nutriments (énergie, protéine et acides aminés, matière grasse...) en fonction de l'âge de l'animal. L'objectif est donc de connaître la qualité nutritionnelle de tous les constituants des aliments.

Cela est réalisé en déterminant la composition chimique d'une part et en évaluant la digestibilité iléale (à la fin de l'intestin grêle) et caecale (à la fin du tube digestif) d'autre part. Il n'existe pas aujourd'hui de méthode in vitro permettant cette

évaluation. Le coq adulte est utilisé comme modèle pour l'évaluation de la digestibilité iléale et caecale d'un grand nombre d'espèces monogastriques (volailles, porcs, chiens, chats, aquaculture...). Ce modèle a été choisi car il permet de discriminer de manière sensible des matières premières ayant un profil analytique identique. Par ailleurs, le temps de transit dans le tube digestif du coq est plus court que chez les autres monogastriques, ce qui permet de réaliser une mesure rapide et sans période d'accoutumance au régime. Les mesures réalisées sont très reproductibles.

L'évaluation de la digestibilité consiste à réaliser un bilan entre la quantité d'aliment ingérée et la quantité excrétée dans les fientes. La digestibilité iléale est réalisée sur des coqs caectomisés, c'est à dire que les caeca (dernière partie du tube digestif) ont été supprimés pour éviter les fermentations microbiennes qui y ont lieu. Chez le coq (et les oiseaux en général), la partie caecale du tube digestif se présente sous la forme de 2 sacs indépendants et reliés à l'iléon, ils sont donc facilement retirés lors d'une opération chirurgicale simple à la différence des autres monogastriques (comme le porc ou l'homme) chez lesquels le caecum est une continuité de l'intestin grêle.

Un bilan démarre par la mise à jeun des animaux pendant 24h afin que le tube digestif ne contienne plus d'aliment. Ensuite, l'ingestion précise de la matière d'intérêt permet de connaître la quantité de composants (protéine, énergie, matière grasse...) ingérée, mais aussi de limiter les écarts entre animaux dus au comportement individuel. Les fientes sont collectées pendant 48h, temps nécessaire à une digestion totale, puis analysées.

Au total 256 coqs seront utilisés pendant la durée du projet. L'évaluation de la digestibilité iléale et caecale de la matière d'intérêt est réalisée en 4 jours sur 12 coqs entiers (non opérés) et 12 coqs caectomisés, suivis de 10 jours de repos. Ce nombre d'animaux a été défini comme étant le nombre minimal permettant d'obtenir des données fiables et une quantité de fientes minimale nécessaire pour les analyses chimiques. En 1 an, un animal donné sera impliqué dans maximum 24 bilans digestifs. Les animaux sont logés en cage individuelle afin de pouvoir récolter les fientes de chacun. Un enrichissement du milieu est réalisé par la suspension de ficelles avec un nœud.

2360- Cette expérience s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche scientifique en environnement polaire. Ce programme est intitulé "Les manchots Adélie bioplateformes de l'environnement marin polaire". Dans ce cadre l'expérience dite de réponse au stress est soumise pour évaluation au comité d'éthique.

Les oiseaux génèrent des réponses au stress individuelles pour faire face aux changements à court terme dans leur environnement. Les stimuli, comme par exemple la dégradation des conditions environnementales ou l'intensification des activités humaines, provoquent l'augmentation de la corticostérone plasmatique et sont appelés des facteurs de stress. La sécrétion de corticostérone peut ainsi influencer sur la physiologie et le comportement de prospection alimentaire et de reproduction. L'expérience de réponse au stress est une approche validée scientifiquement pour mettre en évidence les niveaux d'hormones de stress basaux et la réponse hormonale des oiseaux en situation stressante. Cette approche consiste en deux prises de sang séparées par 30 minutes de contention entre les genoux de l'expérimentateur simulant un épisode de stress. En fonction des conditions environnementales, nous sélectionnerons des manchots Adélie mâles et/ou femelles à un stade précis de la reproduction (l'incubation) dans un même état nutritionnel (jeûne total) mais dans différentes zones géographiques : 3 sites, plus ou moins éloignés du cœur de la base (niveau de présence humaine décroissant), et 2 sites « témoins » dans des zones peu/pas visitées. Le succès reproducteur de ces oiseaux sera également quantifié à différents moments clés du cycle reproducteur. Par rapport à la règle des 3R, le nombre total d'animaux concernés par l'expérience oscillera entre 80 et 110 individus (réparti sur les 5 sites d'études). Ce nombre correspond à l'effectif minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement significatifs, sachant l'influence que la variabilité individuelle peut avoir sur un résultat en écologie. En outre, il n'est pas possible de Remplacer l'espèce cible puisqu'il s'agit d'une étude visant à estimer l'impact des activités humaines sur l'activité des manchots Adélie dans leur milieu naturel. En termes de raffinement, toutes les précautions connues permettant de réduire la douleur sur les manchots sont scrupuleusement suivies (maintien entre les jambes de l'utilisateur, ailerons le long du corps, dans un sac de contention pour éviter les blessures). Notez qu'il s'agit toutefois d'une expérience visant à évaluer la réponse au stress ce qui implique d'induire une situation stressante.

2361- L'insuffisance cardiaque est une pathologie chronique fréquente en France (3 millions de patients). La dégradation de la contraction du ventricule gauche est aggravée par la désynchronisation de ses parois. Les différentes parois du ventricule gauche ne se contractent plus simultanément.

En effet, l'influx électrique cardiaque chemine dans un faisceau spécifique (appelée le faisceau de His) qui se divise en deux branches, pour le ventricule droit et le ventricule gauche. Une lésion de la branche gauche va engendrer un ralentissement de l'influx électrique dans le ventricule gauche et donc une désynchronisation de ses parois. Lorsque cette lésion de la branche gauche (ou bloc de branche gauche) survient dans une maladie cardiaque, elle va, par la désynchronisation qu'elle entraîne, aggraver l'insuffisance cardiaque.

La stimulation cardiaque, par pace maker ou défibrillateur peut permettre de resynchroniser les parois du ventricule gauche, mais chez un tiers des patients, la stimulation cardiaque est inefficace. Les raisons de ces non réponses restent obscures.

Ce projet permettra de valider un modèle d'insuffisance cardiaque à coronaires saines avec désynchronisation, proche de la clinique humaine et de valider la performance et les résultats d'un capteur permettant de faciliter la surveillance et les réglages du stimulateur/défibrillateur cardiaque. Il permettra également mieux comprendre ces pathologies et de développer de nouvelles thérapeutiques.

Dans un premier temps, l'implantation d'un défibrillateur/stimulateur automatique (DAI), sera réalisée. La stimulation cardiaque continue sur plusieurs semaines, va induire une dilatation progressive du ventricule gauche avec altération de la

fonction ventriculaire gauche. La taille de ces appareils utilisés en clinique humaine est faible (35cc) et les stimulations cardiaques non ressenties.

Dans un second temps, après deux semaines, par cautérisation (radiofréquence) on crée une désynchronisation.

Dans un troisième temps : différents traitements médicamenteux de l'insuffisance cardiaque au nombre de trois seront utilisés afin de d'évaluer la capacité du capteur intégré dans une des sondes du défibrillateur, à enregistrer les variations de la fonction cardiaque.

Outre la surveillance clinique, le suivi sera assuré par un boîtier de télémétrie implantable (enregistrement continu), de nombreuses données seront également récupérées dans les mémoires du défibrillateur, l'appareil étant doté d'une fonction de surveillance à distance. La surveillance portera également sur des données échographiques et biologiques.

Les animaux seront nés et hébergés en élevage, jusqu'à un poids de 30kg. Ils sont alors transférés dans notre bâtiment et surveillés quotidiennement pendant 3-5 jours dans des box individuels. Si une pathologie est détectée après leur arrivée (absence de prise alimentaire, prostration, manque de défécation, de diurèse) ils ne seront pas inclus dans l'expérimentation.

Ce projet prend en compte la règle des 3R.

Nous avons réduit le nombre d'animaux à 17 porcs au total pour cette étude (nombre minimal permettant une analyse statistique des résultats). Les animaux seront leur propre témoin. Le choix du modèle porcin est justifié par la similitude de son anatomie et de son influx électrique cardiaque avec ceux de l'homme.

Ce type d'étude ne peut se faire que sur animal vivant et ne peut être remplacé par un modèle cellulaire ou procédure ex vivo.

Enfin, le raffinement a été pris en compte puisque sur l'ensemble de la durée du projet, les animaux sont hébergés en box individuel adaptés à l'espèce (d'une surface de 3m² et d'1m de hauteur, caillebotis au sol), aux parois permettant de sentir et voir leur congénères dans une salle commune de 18 box. Le cycle nyctéméral est respecté, température constante à 23+/- 2°C. La ration journalière respecte les apports journaliers recommandés pour l'espèce. Les signes de mal être seront recherchés. Les traitements anesthésiques et analgésiques ont été mis au point par des médecins anesthésistes réanimateurs dans le but de réduire la souffrance des animaux lors de l'implantation des dispositifs et au cours du suivi. Un cahier de suivi est complété quotidiennement afin de colliger les médicaments administrés, l'ensemble des procédures et le comportement de l'animal.

2362- L'œuf des oiseaux est un ovocyte entouré de réserves nutritionnelles et d'une enveloppe protectrice (la coquille). C'est dans cette enceinte close naturelle autosuffisante et stérile, que l'embryon va se développer sans contacts maternels. Les oiseaux femelles doivent donc anticiper l'ensemble des besoins nécessaires à l'embryon et déposer dans l'œuf la totalité des ressources utiles à son développement (nutriments, systèmes de protection, molécules régulatrices...). La coquille assure la protection physique de l'œuf et protège l'embryon au cours de son développement dans le milieu extérieur. Cette coquille est impénétrable à toutes bactéries lorsqu'elle reste intacte et assure le maintien de la stérilité de l'œuf.

Notre étude vise à comprendre les mécanismes de formation de la coquille, afin d'identifier des voies d'améliorations des défenses naturelles de l'œuf et renforcer la sécurité alimentaire des œufs de consommation. Nous souhaitons étudier la coquille d'œuf de pintade qui produit des œufs d'une solidité exceptionnelle. Les informations recueillies permettront de déterminer les particularismes de cette espèce et ouvriront des pistes de compréhension pour améliorer la solidité de la coquille des œufs de poule et renforcer la sécurité alimentaire des œufs de consommation.

Les animaux utilisés seront des pintades de souche commerciale. Sur chaque animal sera effectuée une injection de prostaglandines de manière à recueillir la coquille en formation à différents stades physiologiques. Cette méthode reproduit les contractions de l'utérus comme elles se produisent naturellement lors de la ponte de l'œuf. Les animaux sont élevés pendant 4 à 6 mois correspondant à la période de recueil des œufs. Le nombre d'animaux maximum sera de 60 par an, soit un total de 180 pour les 3 ans d'étude.

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

Remplacer : Il n'existe pas de modèle in vitro ou cellulaire qui permet de caractériser les protéines impliquées dans la minéralisation de l'œuf

Réduire : Pour chaque lot, le nombre d'animaux a été réduit à son minimum mais reste suffisant pour garantir une précision de la variance qui permettra de détecter les transcrits différentiels

Raffiner : L'injection de prostaglandines permet de recueillir la coquille en formation à différents stades physiologiques. Cette méthode reproduit les contractions de l'utérus comme elles se produisent naturellement lors de la ponte de l'œuf et est sans conséquences sur le comportement et les capacités de ponte de l'animal par la suite. 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.

2363- L'ataxie spinocérébelleuse 7 (SCA7) est une maladie héréditaire dominante se déclarant à l'âge adulte et menant à une atteinte de la coordination fine des mouvements volontaires. Aux stades avancés de la maladie, les patients souffrent de détresse respiratoire, pouvant évoquer une atteinte des systèmes nerveux et musculaires, et meurent généralement de pneumonie d'aspiration. Il existe des formes juvéniles sévères, où les jeunes patients souffrent d'hypotonie musculaire compromettant leur développement. Actuellement, aucun traitement ne permet de prévenir ou retarder les symptômes de cette maladie, dont la pathogenèse est encore mal comprise.

Ainsi l'étude des symptômes de cette maladie ne peuvent se faire en remplaçant l'animal par une méthode in vitro. Nous avons généré un modèle souris génétiquement modifié qui récapitule la pathologie SCA7. Le but principal de ce projet est de faire une exploration de l'activité motrice de ces souris, en combinant une série de tests moteurs standards.

Réduction: Nous envisageons une étude longitudinale avec une cohorte de 40 souris (20 souris sauvages et 20 souris SCA7 hétérozygotes) afin de raffiner l'aspect qualitatif et quantitatif de l'étude, et de réduire le nombre d'animaux requis.

A terme, les résultats pourraient permettre non seulement de comprendre les atteintes des systèmes nerveux et musculaires, mais aussi de développer et tester des stratégies thérapeutiques afin d'alléger les souffrances liées à la pathologie chez l'Homme.

Enfin, afin de raffiner le projet, les animaux feront l'objet d'un suivi rapproché afin d'éviter tout stress et toute souffrance. Ainsi, toute procédure stressante sera réalisée sous anesthésie générale.

2364- Contexte: L'infection est un motif fréquent d'admission en réanimation et le choc septique, stade le plus grave de l'infection, est responsable chaque année de nombreux décès (30 à 45%) malgré une prise en charge optimale. Les raisons pour lesquelles une bactérie peut être responsable d'une infection contrôlée ou d'un choc septique fatal ne sont pas encore complètement comprises. Une des principales caractéristiques du choc septique est le développement d'une inflammation excessive et non contrôlée, qui a des conséquences délétères sur l'organisme pouvant conduire au décès.

Certains mécanismes de défense contre l'agent microbien (le pathogène) ont été récemment mis en évidence. Il s'agit de certains types de globules blancs du sang, appelés polynucléaires neutrophiles, qui peuvent libérer des « filets » appelés « NETs » (Neutrophil Extracellular Traps), capables de capturer des agents pathogènes pour limiter leur dissémination. Les plaquettes sont elles aussi des éléments du sang, bien connus pour leur rôle clé dans l'arrêt du saignement. Plus récemment, leur rôle dans l'initiation et la propagation des mécanismes immunitaires de défense contre les agents pathogènes a été évoqué, bien que les mécanismes mis en jeu soient encore mal connus.

Le choc septique est un phénomène multifactoriel qui implique plusieurs types de cellules et des intercommunications qui ne peuvent pas être reproduites de façon complète in vitro, tant sur le plan des identités des cellules et des mécanismes en jeu que sur le plan temporel. Des modèles expérimentaux in vivo sont donc nécessaires pour évaluer i) l'identité de chaque type cellulaire impliqué, ii) le rôle de ces cellules et les mécanismes moléculaires mis en jeu et iii), le déroulement des événements.

Objectifs: Le but de notre travail est d'étudier le rôle des plaquettes dans la défense de l'organisme contre les bactéries, en particulier leur rôle dans l'activation des neutrophiles. Ce travail portera sur un modèle de souris en choc septique, d'origine polymicrobienne, par péritonite.

Résultats espérés: Une meilleure compréhension physiopathologique du rôle des plaquettes sanguines dans la défense de l'organisme contre les bactéries permettra potentiellement l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le choc septique.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Ces nombres d'animaux est fixé à 10 par condition. Le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- les animaux seront hébergés en cages disposant de carrés de cellulose et de tunnels ;
- le maximum d'expériences sera réalisé sur des animaux anesthésiés;
- en fin d'expérience, le sang sera prélevé à l'aorte des animaux anesthésiés, qui seront ensuite mis à mort en vue de prélever différents tissus.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront remplacées par des études in vitro sur cellules.

L'ensemble de ces expériences nécessitera 120 souris.

2365- La tomodensitométrie par rayons X (CT) est une technique d'imagerie médicale en coupe, qui permet d'explorer de façon non-invasive les modifications morphologiques et physiologiques liées à la présence de différentes pathologies. Une méthode complémentaire, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), à la différence de l'imagerie X, offre un très bon contraste des tissus mous. Cependant la résolution spatiale est plus faible.

Une innovation technologique très récente au niveau des détecteurs de rayons X, les détecteurs à comptage photonique, permet potentiellement de s'affranchir d'un certain nombre de limites de la technique CT standard. Cette innovation permet d'obtenir une information très spécifique sur la présence des différents éléments chimiques dans l'échantillon traversé par les rayons X et d'en obtenir une cartographie de leur distribution, ainsi qu'une quantification

Dans le contexte de cette technologie nouvelle et innovante, il est crucial de développer des nouvelles stratégies d'acquisition d'images dans un but diagnostique permettant d'exploiter pleinement les avantages préconisés par cette technologie.

Si la règle de remplacement ne peut pas être appliquée dans ce projet, des phases préliminaires de tests sur fantômes ont permis de mettre en place des protocoles de premier niveau nous permettant de passer sur des modèles in vivo dont le nombre peut être réduit.

La règle de réduction s'applique pleinement, en effet, le lapin est très adapté à notre projet par la taille des grands vaisseaux (l'aorte, la veine cave) qui est très proche de la taille des vaisseaux de moyen et petit calibre chez l'homme (artères carotides et coronaires), ainsi les stratégies d'imagerie développées seront facilement transférables vers la clinique. S'agissant d'animaux sains, une accumulation tissulaire n'est pas attendue. En relation avec la demi-vie sanguine courte, chaque animal pourra être utilisé pour les deux stratégies (angiographie et perfusion), diminuant ainsi le nombre total d'animaux

nécessaires. Enfin la règle de raffinement est aussi appliquée, par l'utilisation de cages enrichies avec des bâtons et blocs de cellulose à ronger pour les lapins.

Notre projet vise à développer des stratégies d'acquisition d'images sur un nouveau prototype de système d'imagerie spectrale X à comptage photonique et d'évaluer les limites de détection de différents agents de contraste, in vivo chez 36 lapins sains en 3 ans. Des agents de contraste standard couramment utilisés en clinique, mais également des nouveaux produits seront testés chez le lapin. Les images obtenues en scanner à comptage photonique seront comparées sur ces mêmes animaux aux images en IRM.

2366- La viande bovine pâtit aujourd'hui d'une image dégradée (émission de gaz à effet de serre, image nutritionnelle défavorable) et d'une baisse de consommation, le tout dans un contexte économique mondial hautement concurrentiel. Les enjeux sociétaux sont pourtant cruciaux car ils impactent l'autonomie alimentaire du pays, la durabilité des systèmes d'élevage et l'aménagement du territoire, le bien-être animal et au final l'image de marque de la viande bovine et, plus largement, des productions animales.

Dans ce contexte, le principal objectif du projet EPS est de démontrer et de quantifier l'efficacité d'ingrédients alimentaires naturels actifs (noyau EPS actif) sur la réduction des émissions de gaz à effet de serre par les bovins viande en croissance et en finition. De plus, le projet vise une amélioration de l'efficacité énergétique de l'aliment complet des bovins viande et l'amélioration nutritionnelle des produits finis. En effet, le noyau actif, de par son mode d'action sur les fermentations ruminales, combiné à une formulation adaptée de l'aliment complet, devrait modifier de façon notable et bénéfique le profil en acides gras (AG) de la viande en augmentant les teneurs en AG insaturés et notamment en acide linoléique conjugué (CLA) connus pour leurs bénéfices sur la santé humaine. Ce processus pourrait également modifier la composition en protéines et, plus particulièrement, celles du tissu conjonctif et des fibres musculaires et ainsi améliorer la qualité sensorielle de la viande.

Ainsi, le projet EPS offre un réel bras de levier sur la diminution du pouvoir de réchauffement global en France, sur l'amélioration des qualités de la viande bovine sans surcoût de production, tout en offrant une réelle opportunité de relocalisation compétitive des productions bovines en France.

Pour réaliser ce projet, les animaux utilisés seront obligatoirement les animaux cibles, c'est à dire les ruminants, le but final étant de mesurer des performances zootechniques ainsi que la qualité de la viande pour le consommateur (avec dégustation de certains morceaux de viande). Cette étude ne peut donc pas être réalisée sur des animaux modèles ou in vitro. Le nombre d'animaux recruté (32 taurillons) est ajusté au mieux pour que les résultats soient exploitables statistiquement. Les aliments distribués sont ceux habituellement donnés aux animaux d'élevage, n'entraînant donc aucun inconfort particulier. Enfin, les mesures réalisées sur animal vivant sont celles pratiquées habituellement en exploitations agricoles (pesées, essentiellement). De plus, 2 prises de sang (une en début et une en fin de période de finition) et une prise de contenu ruminal (début de période de finition) par animal seront réalisées selon les bonnes pratiques d'élevage par des agents habilités.

2367- Le présent projet vise à déterminer l'aptitude de produits laitiers, céréaliers et de produits à base d'oeufs à rendre utilisables pour l'organisme des molécules bioactives seules (acide docosahexaénoïque=DHA, anthocyanes=AC, β -glucanes=BG) ou en combinaison (DHA+AC, DHA+BG) en utilisant le porc comme modèle de l'Homme. Lors d'une première procédure expérimentale, du DHA a été incorporé dans des produits à base d'oeufs de composition identique mais de structure différente (omelette, oeuf dur, mousse) et l'influence de la structure de l'aliment sur la biodisponibilité de cet acide gras a été évaluée. Dans une seconde procédure expérimentale, 3 aliments (1 produit laitier, 1 produit céréalier et 1 produit à base d'oeuf) seront comparés pour leur aptitude à rendre biodisponibles les molécules bioactives d'intérêt. Cette étude animale permettra de sélectionner l'aliment conduisant aux plus fortes bioaccessibilité (proportion d'un nutriment libérée dans la lumière du tube digestif et disponible pour être absorbée) et biodisponibilité (proportion d'un nutriment qui a été digérée et absorbée et est disponible pour les fonctions métaboliques de l'organisme) des molécules bioactives. Cet aliment sera alors testé dans une étude clinique chez l'homme (relevant d'un autre projet) afin de déterminer si les molécules bioactives insérées dans les aliments fonctionnels permettent de diminuer le risque de développement d'un syndrome métabolique chez le sujet à risque.

Afin d'évaluer la bioaccessibilité et la biodisponibilité des molécules bioactives ainsi que de s'assurer de la digestibilité des aliments, les aliments seront distribués sous forme de repas test, à 24 animaux, équipés d'un cathéter placé au niveau de la veine jugulaire et d'une canule duodénale (bioaccessibilité) pour 12 d'entre eux ou d'une canule iléale (digestibilité) pour les 12 autres. Si la pose de 2 canules (duodénale et iléale) sur un même animal actuellement testée (Dossier N°2015062211322340) s'avère possible, le nombre total d'animaux sera divisé par 2. Pour ce faire, les animaux subiront une intervention chirurgicale sous anesthésie générale et l'utilisation raisonnée d'antalgiques permettra de réduire les souffrances de l'animal à leur minimum. Ainsi il sera possible de collecter les effluents et le sang tout au long du processus digestif et de déterminer les cinétiques de bioaccessibilité et de biodisponibilité des molécules bioactives. Le dispositif prévu est un carré latin où tous les aliments sont testés sur chaque animal.

La règle des 3R a été prise en compte dans la conception des procédures expérimentales. En effet pour ce type d'études, il n'existe pas de méthodes in vitro ce qui nécessite l'utilisation d'animaux. De plus, ce protocole sur animal permettra de choisir l'aliment le plus apte à réduire le risque de développement d'un syndrome métabolique chez l'homme et réduira ainsi considérablement l'ampleur de l'étude clinique humaine visant à valider l'effet bénéfique chez l'homme. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum grâce à la pose de canules digestives et de cathéter sanguin qui permettra de ne travailler que sur 24 animaux pour les 3 aliments alors que sans cela il faudrait abattre un animal pour chaque point de mesure, soit 192 animaux par aliment.

2368- Les émissions de gaz à effet de serre (GES) liées aux activités humaines sont dues à l'élevage pour une part significative (14,5%). A l'échelle de la ferme, les ruminants, et plus particulièrement les bovins, sont les principaux contributeurs avec une production de méthane entérique qui représente plus de 50% de leurs émissions de gaz à effet de serre. Ainsi, un des enjeux des élevages bovins est de proposer des solutions permettant de réduire les émissions de méthane tout en maintenant l'efficacité des productions animales afin d'assurer les besoins en nutrition humaine. D'autre part, peu d'indicateurs périphériques de la méthanogenèse ruminale ont été étudiés jusqu'à aujourd'hui.

De nombreux leviers d'action sont testés pour réduire ces émissions de méthane entérique, en particulier l'alimentation. L'apport en lipides dans l'alimentation des ruminants est une stratégie nutritionnelle efficace pour diminuer de façon permanente la production de méthane ruminale chez la vache laitière. Par ailleurs, les suppléments lipidiques modifient fortement la composition en acides gras (AG) du lait. Ainsi, une supplémentation lipidique peut à la fois moduler la méthanogenèse et la composition en AG du lait (soit par la production d'intermédiaires de la biohydrogénation ruminale des AG polyinsaturés, soit au niveau de la synthèse de novo des AG du lait via les produits terminaux de la digestion des glucides). Dans ce contexte, nous avons exploré la possibilité de prédire la production de méthane chez la vache laitière à partir du profil en acides gras du lait. Une relation étroite entre certains acides gras du lait (corrélation positive pour les AG saturés et négative avec les isomères trans du C18 :1) et la production de méthane a été montrée chez la vache laitière alimentée avec des régimes enrichis en lipides du lin. Avec des suppléments lipidiques différents, d'autres équations de prédiction de la méthanogenèse ont été publiées par des équipes de recherche européenne et canadienne. Il convient donc d'augmenter la précision des équations prédictives avec les rations enrichies en lipides, mais également d'élargir leur domaine d'application à tous types de rations.

L'objectif de cette action de recherche sera de confirmer la pertinence des AG du lait comme marqueurs périphériques de la méthanogenèse chez le bovin laitier en production dans diverses conditions nutritionnelles. Notre finalité est de développer des indicateurs non invasifs et facilement utilisables sur le terrain.

2369- Pour cela, 2 essais sur vaches laitières seront réalisés à une année d'intervalle (essai 1 en 2015 et essai 2 en 2016) sur une vingtaine d'animaux au total afin de tester les conditions nutritionnelles manquantes et/ou particulièrement intéressantes à étudier. Le choix de ces rations se fera après une première étape d'analyse des données de la littérature et d'une base de données comportant des données bibliographiques et expérimentales. Ces dispositifs permettent de réduire le nombre d'animaux utilisés et sont adaptés en terme statistique pour identifier les marqueurs périphériques de la production de méthane.

Les principales mesures seront : production et composition du lait, quantités ingérées, production de méthane, digestibilité de la ration.

Des analyses ponctuelles sur différentes matrices corporelles (sang, urine, fèces, contenu de rumen) seront réalisées parallèlement pour une meilleure compréhension de la méthanogenèse et des phénomènes biologiques relatifs aux acides gras du lait identifiés comme marqueurs pertinents.

Les animaux seront surveillés tous les jours lors de la distribution de l'alimentation par un animalier responsable de la mise en oeuvre et du suivi du protocole. L'évaluation de la gêne et de l'angoisse générées par les procédures est faite par observation du comportement des animaux. En cas de signes inhabituels, le vétérinaire référent de l'UE sera contacté immédiatement et un traitement approprié sera administré.

2370- La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par des troubles cognitifs et psycho-comportementaux entraînant une perte d'autonomie. Avec le vieillissement de la population, cette maladie représente un véritable enjeu scientifique, humain, social et économique.

Dans des études antérieures, l'équipe a montré que deux gènes *Nxn1* et *Nxn2* codaient pour des facteurs impliqués dans la survie des photorécepteurs à cônes au niveau de la rétine, le RdCVF « Rod-derived Cone Viability Factor » et le RdCVF2. Contrairement au gène *Nxn1*, l'expression du gène *Nxn2* n'est pas restreinte aux photorécepteurs. Ce dernier s'exprime dans d'autres régions du système nerveux central (SNC) comme les neurones olfactifs. Ces deux gènes codent chacun pour une forme courte et une forme longue de la protéine (RdCVF/RdCVFL et RdCVF2/RdCVFL2).

Nous avons aussi montré que c'est l'interaction entre la forme longue du RdCVF2 et la protéine TAU, qui prévenait cette dernière de modifications délétères comme observé dans le cerveau de patients atteints de la MA.

De manière intéressante, un variant modifié de la forme longue du RdCVF2 a été identifié dans le cerveau de patients atteints de la MA. Le but de notre étude est d'étudier le rôle protecteur des de la forme longue normale et modifié du RdCVF2 dans le SNC. Ces analyses seront réalisées un modèle murin de la MA [souris ThyTAU]. Des tests de comportements et de mémoires seront réalisés à l'Institut de la Clinique de la souris. Les tests de mémoires ne peuvent être réalisés in vitro. Les animaux seront ensuite euthanasiés et les cerveaux récupérés pour analyses biochimiques et histologiques complémentaires. Au total 126 animaux seront nécessaires à ce projet.

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

2371- La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative incurable qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales et notamment de la mémoire. Les symptômes de la maladie d'Alzheimer sont liés à des altérations du fonctionnement de l'activité des synapses qui permettent la communication entre les neurones. Dans ce contexte la visualisation d'une diminution de l'activité métabolique cérébrale par Tomographie par Emission de Positons s'est révélée être un indicateur fiable des troubles synaptiques neuronaux précoces qui apparaissent bien avant les pertes neuronales. En plus d'être un biomarqueur, le métabolisme du glucose cérébral est essentiel aux fonctions neuronales ainsi qu'à l'intégrité du tissu nerveux. Bien que ses altérations précoces dans la MA puissent être à l'origine, ou tout du moins contribuer aux processus neurodégénératifs tardifs, il n'existe toujours pas à l'heure actuelle d'explication à ces déficits métaboliques. Les travaux menés depuis dix ans ont montré que des cellules du système nerveux appelées astrocytes contribuent significativement à l'activité des synapses ainsi qu'au métabolisme du glucose. Ce projet, financé par l'Agence Nationale de la Recherche et par l'association France Alzheimer a pour objectif de déterminer à l'aide de nouvelles approches expérimentales, encore jamais utilisées dans le contexte de la maladie Alzheimer, le rôle de ces astrocytes dans un modèle rongeur de la maladie. Pour mener à bien ce projet, plusieurs expertises (in vivo, ex vivo, imageries cellulaires...) seront combinées. Les chercheurs testeront de nouveaux axes thérapeutiques visant à restaurer des fonctions vitales normalement assurées par les astrocytes et à en tester l'efficacité grâce à la mise en œuvre d'études précliniques. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité. Leur nombre a été réduit au maximum (160 souris) afin d'obtenir des données suffisantes pour répondre aux questions scientifiques posées. L'évaluation fonctionnelle sera menée en utilisant des techniques d'imagerie sur tranches de cerveau. Les protocoles d'anesthésie et d'analgesie des procédures chirurgicales ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Des échelles cliniques journalières et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des animaux et un environnement enrichi sera fourni aux animaux (nid végétal)

2372- L'obésité est tout à la fois invalidante et un facteur de risque pour d'autres maladies potentiellement mortelles. Il n'existe pas de traitement simple pour la vaincre de façon durable. L'intervention chirurgicale la plus efficace est irréversible et complexe. Nous avons mis au point une solution plus simple, potentiellement réversible visant à combattre l'obésité morbide. Cependant notre solution nécessite d'être améliorée et validée avant la transposition à l'homme. En effet, une étude précédente chez l'animal a montré les défauts de nos solutions technologiques sans pour autant remettre en cause l'efficacité. La rupture précoce des électrodes n'a pas permis de suivre dans la durée l'efficacité. Ce point est capital avant la transposition à l'homme car de nombreuses thérapeutiques sont incapables d'avoir un effet qui perdure dans le temps. Notre stratégie consiste à stimuler tout au long de la journée deux nerfs qui relient le tube digestif au cerveau (nerfs vagues). Elle demande la pose chirurgicale de façon minimalement invasive d'électrodes dans l'abdomen ainsi que la pose d'un neurostimulateur. L'étude menée précédemment nous a permis de maîtriser la pose chirurgicale des appareils de façon minimalement invasive i.e. dans des conditions identiques à celles présumées chez le patient. L'objectif de notre étude est donc de montrer qu'un profil de neuromodulation innovant et couplé avec une nouvelle conception d'électrodes plus solides dans le temps et implantées à abdomen fermé induit une réduction pondérale durable chez des miniporcs rendus spontanément obèses par l'ingestion d'un régime de type européen. Le comportement alimentaire des animaux sera suivi durant 6 mois. Tout au long de cette période, l'état d'obésité des animaux sera caractérisé en mesurant la répartition des graisses par scanner. L'impact de la stimulation sur le cerveau sera suivi par imagerie nucléaire. Cette mesure permettra un ajustement des paramètres de stimulation. Une possible altération de la fonction cardiaque sera envisagée par l'évaluation non invasive de la variabilité du rythme cardiaque. Le métabolisme glucidique sera évalué au moyen de la mesure terminale de la sensibilité à l'insuline de l'organisme et des organes cibles (cerveaux, foie et muscle). Pour cela nous aurons besoin de 22 miniporcs obèses (20 plus 2 pour les aléas chirurgicaux), répartis dans 2 groupes de 10, un groupe témoin et un groupe avec une stimulation vagale chronique. Notre programme fait appel à de nombreuses méthodes non ou minimalement invasives afin de respecter l'objectif de réduction et de raffinement de la règle des 3R. Toutes les méthodes employées constituent l'état de l'art en la matière. Elles sont également minimalement invasives de façon à limiter le nombre d'animaux soumis au volet chirurgical qui est lui même réalisé par coelioscopie, une méthode qui limite la douleur post-opératoire et qui favorise une récupération post-chirurgicale précoce. L'objectif de remplacement n'est pas accessible pour deux raisons. D'une part, il s'agit de tester les composants qui seront réellement utilisés chez l'homme et une miniaturisation permettant l'implantation chez le rongeur n'est pas techniquement possible. D'autre part, l'imagerie fonctionnelle cérébrale exige un cerveau de taille importante et présentant des circonvolutions proches de celles de l'homme afin d'avoir une résolution spatiale suffisante. Ces deux particularités conduisent à l'utilisation de l'espèce porcine comme modèle animal.

2373- La sélection des porcs est évaluée au travers de la mesure de leurs performances de croissance lorsque les animaux reçoivent des aliments de bonne qualité leur permettant d'exprimer leur potentiel de croissance. Actuellement, des aliments contenant des matières premières à forte teneur en fibres sont de plus en plus utilisés dans les élevages. Il est probable que la sélection des porcs basée uniquement sur des critères de performances évalués avec des aliments de « bonne » qualité ne permette pas d'identifier les animaux les plus à même de valoriser au mieux ces aliments, alors qu'il existe une variabilité génétique dans la capacité digestive des porcs. Il serait donc nécessaire de caractériser la capacité digestive des porcs. Pour cela, la technique de référence impose de placer les animaux pendant 3 semaines dans une cage à digestibilité afin de collecter totalement leurs fèces, et de réaliser un grand nombre d'analyses de laboratoire. Il est également possible d'utiliser des

marqueurs indigestibles autorisant un prélèvement ponctuel de fèces, mais l'analyse au laboratoire de ces marqueurs est longue et difficile. Le développement de technologies analytiques rapides (notamment spectrométrie proche infra-rouge – SPIR) permet de caractériser un grand nombre d'échantillons à moindre coût, pour peu que des équations de prédiction des teneurs en nutriments et en marqueurs indigestibles dans les fèces de porcs aient été établies. L'objectif de l'expérimentation est de produire une collection d'échantillons pour la mise au point d'une méthodologie d'estimation rapide de la capacité digestive des porcs en utilisant :

- Un marqueur indigestible permettant une collecte ponctuelle des fèces

- La SPIR comme méthodologie de dosage du marqueur indigestible et des nutriments dans les aliments et les fèces en mettant au point les équations de calibration.

L'expérimentation sera conduite sur 60 porcs issus de 3 races différentes (Large White, Piétrain et Duroc) et au cours de 4 périodes successives (de 3 semaines chacune) afin de mesurer la digestibilité d'un régime standard et d'un régime riche en fibres au stade croissance (environ 40 kg) et au stade finition (environ 80 kg). Les deux régimes seront supplémentés en marqueurs indigestibles. La combinaison de différentes races, différents stades physiologiques et différents aliments permettra de générer de la diversité dans les valeurs de digestibilité afin de mettre au point les équations de calibration. Enfin, 10 animaux supplémentaires recevront, au cours de deux semaines successives, l'un des deux aliments ne contenant pas de marqueurs indigestibles afin de récolter des fèces sans marqueurs nécessaires pour la calibration des technologies SPIR.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de mettre au point une méthode d'estimation de l'utilisation digestive des nutriments chez le porc et il n'existe pas de modèle mathématique ou in vitro permettant d'atteindre cet objectif. Réduction : le nombre d'animaux et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin de disposer de suffisamment d'échantillons pour développer et valider les équations tout en limitant le nombre d'animaux. Raffinement : afin de limiter l'hébergement en cage à digestibilité limitant les mouvements de l'animal, les animaux passeront la première semaine de chaque période dans des cages leur permettant de se retourner. Les cages seront placées de façon à permettre un contact visuel, sonore, olfactif et tactile entre les animaux.

2374- L'objectif du projet est de caractériser les conséquences d'une pratique courante autorisée en élevage porcin : l'épointage des dents des huit dents de lait, très pointues, présentes à la naissance à l'avant des mâchoires. Elle est réalisée en prévention des blessures que pourraient infliger les porcelets sur la vulve et surtout les mamelles des truies ou sur les autres porcelets lors des bagarres. Deux techniques sont utilisées : la coupe et le limage. Dans les heures qui suivent, l'épointage induit des réponses comportementales et physiologiques de douleur mais les conséquences à moyen et long terme sont très mal connues car très peu d'observations ont été faites. Nous cherchons donc à mieux préciser l'expression et les conséquences de cette douleur, à court et moyen terme, sur le comportement, la physiologie et la neurobiologie. En effet, on peut supposer que l'épointage des dents induit un état de douleur chronique lui-même à l'origine d'un état de stress chronique, les deux étant préjudiciables au bien-être des porcs.

Le projet donnera des informations sur le ressenti des porcelets ce qui permettra de sensibiliser les éleveurs aux conséquences potentiellement négatives de l'épointage des dents et de choisir la technique la moins nocive dans le cas où le maintien de l'épointage serait nécessaire pour éviter des problèmes importants de lésions cutanées sur les truies ou les porcelets.

La règle des 3R est respectée :

Réduction. Nous étudierons la réaction à l'épointage par coupe ou limage sur des porcelets issus de 20 portées. Pour augmenter la puissance statistique et réduire le nombre d'animaux, nous avons choisi d'appliquer les traitements intra-portées. Trois traitements seront appliqués à une partie des porcelets de chaque portée : coupe, limage ou aucune intervention. L'objectif est de comparer 24 animaux (12 femelles et 12 mâles) de chaque traitement pour le suivi comportemental jusqu'à 6 semaines d'âge, 8 animaux (seulement des femelles) de chaque traitement pour l'étude neurobiologique à 1 et 6 semaines d'âge, soit un total de 120 porcelets issus de 20 portées. C'est le nombre minimal d'animaux pour réaliser des analyses statistiques sur les mesures effectuées.

Pour les animaux dédiés à l'étude du comportement, nous observerons la réaction lors du traitement, puis dans les heures qui suivent, et une fois par semaine. Les observations seront réalisées soit dans la loge d'élevage soit lors d'un test dans un petit parc où l'animal restera seul pendant 5 minutes avant de revenir dans sa loge.

Pour les mesures physiologiques et neurobiologiques, nous réaliserons une prise de sang sur les porcs vivants puis nous prélèverons les dents, les ganglions nerveux à proximité des mâchoires et le cerveau sur les porcs euthanasiés. L'euthanasie sera réalisée après sédation par surdosage d'anesthésique suivie de la saignée selon un protocole éprouvé et dans le respect de la réglementation. Il n'est pas possible de mettre en place de méthode de substitution qui évite l'emploi d'animaux vivants.

L'épointage et les procédures expérimentales seront effectués par du personnel qualifié en respectant les règles d'hygiène et de sécurité et en minimisant les risques de stress et de douleur pour les animaux grâce à une manipulation et à une surveillance adaptées. Les procédures expérimentales appliquées pour évaluer les conséquences de l'épointage des dents affecteront peu le bien-être des porcs (sévérité classée légère).

Raffinement. Tout au long du projet, les animaux seront suivis quotidiennement au moment des repas par les personnes en charge de l'expérience ou par les animaliers formés pour l'expérimentation animale. Tout animal souffrant sera soigné en fonction de son état, selon les conseils vétérinaires.

Remplacement. Il est impossible de substituer l'étude sur animaux vivants par une méthode alternative dans notre projet qui cible l'évaluation de la douleur animale et ses conséquences en terme de stress.

2375- La castration des porcs mâles est pratiquée pour pallier la présence de scatol responsable des odeurs de mâle dans la viande de porc. Le scatol est un métabolite du tryptophane (acide aminé apporté par les aliments) dont la dégradation par le foie est inhibé par les androgènes, d'où sa concentration plus importante dans le tissu adipeux des animaux mâles.

La castration chirurgicale à vif n'est plus acceptable dans notre société et incompatible avec la notion de bien-être des animaux d'élevage.

Les représentants européens de la filière porcine ont signé une déclaration auprès de l'union européenne pour tenter de parvenir à l'arrêt de la castration chirurgicale à vif en 2018 à la condition que des solutions efficaces soient trouvées.

Trouver une alternative à la castration chirurgicale qui soit à la fois éthiquement acceptable pour l'animal et la sécurité du consommateur devient donc une évidence.

Par ailleurs, il existe aujourd'hui un vaccin sur le marché mais celui-ci est plus ou moins bien toléré par l'animal.

De récentes enquêtes montrent que la majorité des consommateurs européens préfèrent la vaccination comme alternative à la castration chirurgicale douloureuse pour les porcelets, néanmoins les vaccins actuellement sur le marché doivent être améliorés.

La présente étude vise à étudier l'efficacité d'un nouveau type d'immunisation anti-GnRH sur 40 porcs mâles d'élevage de race Large White.

Le candidat vaccin est constitué d'une protéine recombinante couplée au GnRH et d'un adjuvant sans mercure (émulsion d'acide oléique d'origine végétale). Il devrait permettre l'immunocastration de porcelets plus jeunes et une seule injection pourrait être suffisante par rapport aux produits déjà sur le marché.

Les essais préliminaires ont montré une bonne efficacité et une bonne tolérance du vaccin sur des rongeurs et des porcs sauvages. Si son efficacité est validée, ce nouveau vaccin devrait réduire l'impact négatif de l'immunocastration pour l'animal à trois niveaux :

- animaux jeunes donc plus facile à manipuler par l'éleveur
- réduction du nombre de manipulations donc réduction du stress et diminution de la douleur pour l'animal
- meilleure tolérance au niveau du site d'injection, les produits actuellement sur le marché induisant des effets indésirables importants allant, dans de rares cas, jusqu'à la mort des individus vaccinés.

Cette étude concerne la validation clinique d'une alternative à la castration chirurgicale du porcelet, elle ne peut être réalisée sur une autre espèce.

Les tests statistiques de puissance utilisés pour prédire l'efficacité du modèle expérimental proposé montrent que 40 animaux sont le minimum nécessaire pour mettre en évidence le différentiel attendu sur les indicateurs mesurés au cours de cette étude (masse testiculaire, concentration plasmatique de testostérone, nombre de tubes séminifères présentant une spermatogenèse normale...).

Le contact quotidien avec les agents (habituations) et l'enrichissement (ballons) devrait permettre d'améliorer le bien-être des animaux pendant l'étude

2376- L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe des médicaments ayant un intérêt thérapeutique dans le domaine de l'athérosclérose. Le principal objectif de l'étude est d'évaluer les effets d'un traitement chronique par 2 extraits naturels sur l'athérosclérose chez un modèle de souris KO ApoE développant spontanément des plaques d'athérome. Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de détailler l'efficacité et les mécanismes d'action de leurs composés.

Le présent projet consistera à administrer par voie orale les 2 extraits naturels, seuls (une dose par extrait) ou en combinaison (à deux doses dans ce cas), à des souris KO ApoE pendant 2 à 16 semaines afin d'étudier l'impact de ces traitements sur le développement des plaques d'athérome au niveau de l'aorte ainsi que sur le métabolisme lipidique. L'étude nécessitera ainsi 5 groupes expérimentaux (contrôle, extrait 1, extrait 2, combinaison 1, combinaison 2; n=22 par groupe), les effectifs de ces groupes étant répartis sur 5 séries expérimentales (I à V).

Chaque série permettra d'explorer l'impact des traitements sur le métabolisme lipidique ainsi et/ou le développement des plaques d'athérome selon des modalités différentes (études histologiques sur coupes d'aorte transversales ou longitudinale, étude d'expression ARNm de biomarqueurs spécifiques).

L'étude complète nécessitera l'utilisation d'un total de 110 souris, dont 90 seront traitées pendant 16 semaines, et 20 pendant 2 semaines.

A l'issue du traitement:

- les 90 animaux des séries I à III, traités pendant 16 semaines, seront envoyés par un transporteur agréé à un laboratoire partenaire (Belgique) pour réaliser des prélèvements (crosses aortiques, sang) afin d'analyser l'impact du traitement sur le développement des plaques d'athérome et sur le métabolisme lipidique. Cette partie de l'étude, réalisée par le laboratoire partenaire, fait parallèlement l'objet d'une demande d'autorisation spécifique auprès d'un comité éthique belge.
- un prélèvement sanguin terminal suivi d'une euthanasie sera réalisé pour les 20 animaux de la série IV ayant été traités pendant 2 semaines (dosage des polyphénols).

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

- Raffinement: Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur le développement de l'athérosclérose.

Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout incofort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages collectives et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos de nidification. Enfin, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par le laboratoire belge partenaire sur l'analyse des paramètres d'intérêt sur le modèle de souris ko ApoE. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté pour chaque série expérimentale en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

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

2377- La dissection sous muqueuse endoscopique (Endoscopic submucosal dissection ou ESD) permet le traitement des cancers superficiels de l'œsophage en évitant le geste chirurgical lourd que représente la résection complète de l'œsophage. Cependant, le développement de cette technique se heurte à une cicatrisation anormale de l'œsophage qui a tendance à se rétrécir. Le rétrécissement -ou sténose de l'œsophage- empêche le patient de s'alimenter normalement et nécessite des interventions endoscopiques répétées pour dilater l'œsophage. La formation de la sténose cicatricielle est liée à l'exposition de la zone opérée au contenu de l'œsophage (aliments, reflux acide, bactéries et champignons). Un gel contenant un peptide auto-assemblé (self assembling peptide ou SAP), se solidifiant au contact des tissus, a reçu un marquage CE pour arrêter les saignements sur les plaies opératoires. En effet, ce gel adhère à la plaie opératoire plusieurs jours avant d'être détruit et éliminé par l'organisme, permettant ainsi aux processus de coagulation et de cicatrisation de débiter. Ce gel, en protégeant la plaie de l'œsophage après l'intervention endoscopique, pourrait induire une cicatrisation harmonieuse de l'œsophage.

Nous souhaitons évaluer la capacité du gel appliqué sur la plaie œsophagienne consécutive à une dissection sous muqueuse endoscopique, à prévenir la formations d'une sténose œsophagienne cicatricielle. Pour ce faire, nous souhaitons réaliser une première étude de faisabilité sur 8 animaux étudiant 4 techniques d'application du gel sur deux animaux chacun.

Une fois cette étude pilote réalisée, nous réaliserons une étude comparative évaluant chez 14 porcs (7 traités par gel et 7 contrôles) l'effet de l'application de gel sur la survenue d'une sténose de l'œsophage après dissection sous muqueuse endoscopique.

Afin de préserver le bien-être des animaux, le protocole expérimental a été raffiné: en minimisant la durée de l'étude, en définissant des points limites, et en réalisant tous les gestes potentiellement douloureux ou inconfortables sous anesthésie générale ou après le sacrifice des animaux.

Le modèle porcin est un excellent modèle du fait de ses dimensions voisines de celles de l'Homme permettant d'utiliser le même type de matériel endoscopique. En outre, les phénomènes étudiés étant liés à la cicatrisation de l'œsophage, ils sont dynamiques et requièrent l'utilisation d'animaux vivants. L'étude in vitro de ces phénomènes n'est pas envisageable compte tenu de la multiplicité des types cellulaires qui entrent en jeu dans la cicatrisation.

Enfin, le nombre d'animaux a été réduit au maximum au moyen d'un calcul d'effectif d'une part, et d'autre part d'une étude de faisabilité préliminaire permettant de tester une seule condition d'application du gel dans l'étude contrôlée.

2378- Les canaux ioniques représentent une vaste famille de protéines qui assurent le passage des ions au travers des membranes cellulaires. Ils participent virtuellement à tous les processus biologiques en initiant ou modulant de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. En provoquant le passage de ces ions au travers de la membrane plasmique en réponse à divers stimuli, ces protéines permettent en effet à la cellule de communiquer avec son environnement et d'engager des réponses cellulaires appropriées (e.g. prolifération, migration,...). En raison de leur importance biologique, de leur accessibilité à une modulation pharmacologique et de leur exposition à la surface cellulaire, ils constituent une cible majeure des médicaments actuels. Néanmoins, bien que souvent exprimés de façon aberrante dans les tumeurs où leurs fonctions premières semblent détournées pour promouvoir notamment la prolifération cellulaire ou la formation de métastases, ces protéines membranaires restent aujourd'hui une classe encore sous-explorée de cibles thérapeutiques dans le cancer. Cet état de faits peut être expliqué d'une part par le peu de données actuellement disponibles sur l'identité des canaux impliqués et les rôles exactes qu'ils jouent dans la tumorigenèse d'un type de cancer particulier et d'autres part, par le manque cruel d'inhibiteurs spécifiques des canaux exprimés dans les cellules tumorales.

L'objectif de ce projet est donc de développer des modulateurs de l'activité de canaux ioniques. Les nouvelles molécules seront tout d'abord testées pour leur tolérance en administration unique et répétée sur souris saines puis pour leur efficacité anti tumorale dans différents modèles de tumeurs humaines (sein, prostate, ovaire et colon) chez la souris.

Dans un premier temps nous validerons des canaux comme cibles thérapeutiques dans des modèles de tumeurs utilisant des lignées tumorales génétiquement modifiées pour exprimer ou pas ces canaux. (10 canaux, 8 modèles, 36 souris par modèle soit 2880 souris)

Dans un deuxième temps nous évaluerons les modulateurs développés par nos chimistes pour leur tolérance in vivo (660 souris) et leur efficacité dans des modèles de tumeurs. (4920 souris)

Ce projet utilisera au maximum 8460 souris sur 5 ans (Ne pouvant pas connaître à l'avance le nombre de canaux ioniques validés comme cibles et le nombre de molécules modulatrices de ces canaux qui aboutiront au stade in vivo ce chiffre est une estimation haute)

Afin de répondre à la règle des 3 R, les souris sont suivies quotidiennement selon une grille de score permettant d'évaluer le degré de douleur et d'y remédier avec un traitement analgésique approprié. L'apport de l'imagerie permet de réduire le

nombre d'animaux utilisé et de mieux évaluer l'état d'envahissement tumoral. Par ailleurs les souris sont groupées à 5 par cage avec des petits morceaux de papiers leur permettant de faire un nid.

2379- L'objectif de ce projet est de développer une nouvelle molécule thérapeutique anticancéreuse qui cible une protéine surexprimée dans certains cancers. Le projet se base sur des données obtenues sur cellules cancéreuses au sein du laboratoire et publiées précédemment, qui sont encourageantes pour le développement d'une thérapie. En effet, la preuve de concept in vitro ne suffisant pas à ce jour pour valider le développement de nouveaux médicaments, nous devons utiliser des modèles animaux. Ces modèles nous permettront d'évaluer de manière efficace si l'injection de cette nouvelle molécule anticancéreuse est capable d'induire la régression, voire l'élimination des tumeurs induites, et de limiter le nombre de métastases. Nous testerons la dose minimale efficace et la voie d'administration à préférer pour une meilleure efficacité.

Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril l'interprétation statistique des résultats. Une surveillance adaptée des animaux est mise en place (tous les deux jours) afin d'éviter toute souffrance; de plus, des points limites ont été établis pour définir à quel moment décider de la mise à mort des animaux en cas de non tolérance à la procédure.

Au total 2100 souris sont incluses dans ce projet qui s'étale sur 5 ans.

2380- Dans le cadre du traitement des plaies chez les équidés, un laboratoire souhaite lancer une nouvelle gamme s'adaptant le plus possible aux différentes phases de la cicatrisation cutanée (schématiquement phase de détersion, phase de granulation et phase de maturation). Des études réalisées in vitro ont montré l'intérêt des principes actifs étudiés (évaluation de l'effet sur des cultures de fibroblastes équins). Avant réalisation de tests cliniques, le laboratoire souhaite évaluer la galénique des différentes formulations élaborées (4 produits pour 5 formes galéniques au total) afin de sélectionner la ou les plus compatibles avec l'utilisation pour les soins cutanés chez les équidés.

L'objectif du projet présenté ici est de tester différentes formulations sur des chevaux témoins, tant sur le plan de la galénique (évaluation de la facilité d'application, de la tenue sur les zones traitées...) que sur le plan de la tolérance des zones traitées, le traitement s'effectuant sur peau saine.

Deux chevaux sains sont inclus dans le protocole. Chaque cheval sera traité sur 24 zones distinctes, permettant l'application des 5 formes galéniques sur le tronc à l'air libre et sur les membres avec ou sans bandage. Les applications seront effectuées quotidiennement durant 3 jours. Les zones traitées seront évaluées une à deux fois par jour (selon la présence d'un bandage) durant une durée de 7 jours.

2381- D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la pollution par les particules fines et ultrafines est responsable d'un nombre croissant de pathologies et constitue un problème sanitaire majeur. Dans les zones périurbaines les particules émises par l'activité humaine ont principalement pour origine l'agriculture, la combustion de matières organiques, les transports... Les ventes françaises de pesticides positionnent la France comme le premier consommateur européen en herbicides, fongicides, insecticides. Un rapport récent de l'Institut de Veille Sanitaire a mis en évidence que les concentrations urinaires de métabolites de familles particulières de pesticides (organophosphorés et pyréthrinoides) atteignent des valeurs significativement plus élevées que celles détectées en Allemagne, au Canada et aux États-Unis (InVS, Exposition de la population française aux substances chimiques de l'environnement, Tome 2, Avril 2013). Par ailleurs, il a été établi que 98% des insecticides pulvérisés et 95% des herbicides n'atteignent pas les espèces ciblées, 30 à 50% des quantités utilisées étant libérées dans l'atmosphère. Une préoccupation environnementale majeure réside par conséquent dans le fait que la plupart des pesticides sont persistants et peuvent être transportés loin de leur source d'émission sous forme de particules fines et ultrafines, qui contiendront en outre des éléments comme la silice, du carbone inorganique. Ces aérosols de particules se surajouteront à ceux composés de dérivés de combustion tels que les HAP, dioxines ou méthoxyphénols.

Des études préliminaires in vitro menées au Laboratoire sur des cellules exposées à des polluants, représentatifs de ceux détectés en région PACA, nous ont permis de sélectionner six composés parmi les plus génotoxiques et/ou les plus présents dans l'atmosphère (mesures sur site du Laboratoire et source AIRPACA). Les modèles in vitro ne permettent cependant pas de simuler et d'intégrer l'ensemble des réactions biologiques et biogénotoxicologiques survenant lors d'expositions atmosphériques dans des conditions réalistes, lorsque les polluants sont transportés sous forme d'aérosols de particules fines et ultrafines jusqu'aux alvéoles pulmonaires. De ce fait, le recours à l'expérimentation animale est primordial en association avec le développement au Laboratoire d'un dispositif original de production et nébulisation de particules sèches dans une enceinte de contention de 60 litres permettant de contenir 6 animaux à la fois qui peuvent se mouvoir librement. Ces aérosols diffusés dans l'enceinte sont de concentration, humidité et taille en particules constantes sur la période d'exposition choisie (concentration massique en particules 13 µg/m³; 2 h/jour ; 5 jours/semaine pendant 20 semaines), ces paramètres étant mesurés en continu par un dispositif couplé à celui de production. Des expériences de validation menées en 2012 au Laboratoire ont montré qu'un nombre minimal de 12 rats est nécessaire et suffisant pour chaque groupe expérimental afin d'obtenir des résultats significatifs sur l'ensemble des paramètres sanguins, tissulaires et hémodynamiques. Ce projet nécessitera donc l'utilisation de 84 rats Sprague Dawley, répartis en 7 groupes, un groupe témoin exposé à un flux d'air et 6 groupes d'animaux exposés à des flux de particules ultrafines contenant chacun des 6 polluants sélectionnés. Les rats seront hébergés dans des conditions conventionnelles de température, d'exposition à la lumière et d'hygrométrie dans des cages adaptées par groupe de 4 individus. Les animaux auront libre accès à l'eau de boisson et à leur alimentation et disposeront d'un environnement enrichi. Aucune souffrance n'est attendue lors des expériences d'exposition, les animaux étant exposés à des atmosphères réalistes en particules, équivalentes aux concentrations atmosphériques auxquelles sont soumis les

habitants en région PACA. Enfin, nous nous assurerons que les expérimentations se déroulent dans des conditions optimales de confort, à l'aide d'examen visuels, les animaux étant filmés durant l'ensemble de l'expérimentation. Une attention particulière sera portée à l'examen clinique de chaque animal avant, durant et après les phases d'exposition afin de détecter tout signe de stress ou de lésions (peau, muqueuses, yeux). A l'issue de ces expositions, les animaux seront euthanasiés par injection de pentobarbital et les fluides et organes seront prélevés pour analyse. Le principe des 3Rs sera respecté.

2382- Le virus respiratoire syncytial (VRS) est le principal agent impliqué dans les pathologies respiratoires des jeunes bovins. Il s'agit d'une affection particulièrement contagieuse qui touche la presque totalité des jeunes bovins de moins de 1 ans et qui favorise la survenue d'infections bactériennes ce qui conduit fréquemment à l'usage d'antibiotiques en élevage. Il existe déjà des vaccins commercialisés contre le VRS bovin mais leur efficacité est limitée et ils n'empêchent pas la dissémination du virus au sein du troupeau.

Les enjeux majeurs en vaccination contre le VRS sont d'induire une immunité stérilisante (i) qui bloque la propagation du virus en élevage et (ii) qui permette de faire la différence entre des animaux infectés et des animaux vaccinés (vaccin DIVA). Notre candidat vaccin, inerte, de type sous-unitaire, est basé sur l'utilisation de deux protéines recombinantes, la nucléoprotéine N et la protéine de fusion F qui sont deux antigènes majeurs du virus impliqués dans la protection. Ces protéines seront testées ensemble ou séparément avec un adjuvant vétérinaire classique. Le veau est l'hôte naturel du VRS bovin et présente des signes cliniques lors de l'infection. Evaluer un candidat vaccin dans l'espèce cible, avec des conditions représentatives du terrain est un atout majeur pour bien identifier les mécanismes de la protection et être capable de proposer une démarche vaccinale adaptée et efficace.

18 veaux mâles seront utilisés dans ce projet de manière à constituer des groupes homogènes (sur la base de la présence d'anticorps d'origine maternelle transmis par le colostrum) et d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Les veaux seront suivis tout au long de l'expérience, avec une attention particulière à la qualité de leur alimentation à partir de la naissance (prise de colostrum et de lait maternel avant passage à du lait en poudre et des granulés). Les veaux pourront être traités avec des anti-inflammatoires ou des antalgiques en cas de réaction à la vaccination. Des points limites précis ont été définis lors de l'épreuve virale et le statut clinique des veaux sera évalué deux fois par jour. Deux vétérinaires seront présents pendant la phase d'épreuve virale.

Remplacement : Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de remplacement à l'animal entier pour évaluer l'immunogénicité d'un vaccin et sa capacité à protéger contre une épreuve virale

Raffinement : La présence d'un éthologue pendant la phase infectieuse permettra de déceler précocement des signes de mal être et ainsi d'intervenir rapidement dans le cadre de ce projet. La pose de thermobolus ruminiaux permettra l'enregistrement en continu des températures sans manipulation et stress des animaux.

Réduction : l'expérience d'études antérieures a permis de définir à 6 le nombre optimal d'animaux en fonction des signes cliniques et des lésions attendues

2383- Le mélanome est une tumeur maligne qui se développe à partir des cellules de la peau. C'est la forme la plus agressive des cancers cutanés chez l'homme. Son incidence s'accroît régulièrement. De plus sa résistance aux traitements actuels (chimiothérapie, radiothérapie et immunothérapies) ne laisse qu'une faible espérance de survie aux patients présentant un stade avancé de la maladie. Il demeure nécessaire de développer des travaux visant à mieux comprendre les mécanismes de prolifération et d'invasion des cellules de mélanome afin de mettre au point de nouvelles thérapies.

Les mini-porcs de souche MeLIM ont la particularité de développer des mélanomes héréditaires qui régressent totalement et spontanément indépendamment de tous facteurs externes. Alors qu'il existe de fortes similitudes physiologiques et morphologiques entre la peau humaine et celle des porcins, ce phénomène de régression spontanée du mélanome est quasi inexistant chez l'homme. Ces animaux présentent donc une opportunité unique d'étudier les mécanismes complexes de développement et de régression du mélanome. L'objectif étant la mise au point d'outils pronostiques ou thérapeutiques.

Ce projet vise à maintenir et développer une cohorte d'animaux présentant des particularités génétiques de développement et de régression spontanée de mélanome cutané. Il s'inscrit dans une démarche translationnelle en appui aux études visant à rechercher des gènes de susceptibilité, à valider dans les familles humaines de prédisposition au mélanome, à définir les facteurs de régression tumorale notamment génétiques.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est estimé à 150 et sera réduit au strict nécessaire des besoins expérimentaux. Les protocoles intègrent en premier lieu la nécessité d'éviter toute souffrance pendant le développement métastatique du mélanome et lors des interventions sur animaux. Le suivi quotidien des animaux avec l'élaboration d'une grille individuelle de suivi permet de garantir le bien-être des animaux. Dès l'apparition de troubles du comportement, le vétérinaire de l'installation est alerté et met en place le traitement adapté à la douleur (analgésique et/ou morphinique). Tous les prélèvements seront effectués en salle d'opération et sous anesthésie générale.

2384- Le traitement chronique par des opioïdes concerne de nombreux patients en France dans le cadre d'une douleur chronique par exemple, ou d'un traitement substitutif après sevrage d'une toxicomanie. Une complication de ce traitement, fréquente mais peu connue, est étudiée depuis quelques années : l'Hyperalgésie Induite par les Opioïdes (HIO). On définit celle-ci par un état de sensibilisation à la douleur (processus pro-nociceptif induit par une exposition chronique aux opioïdes), avec amplification paradoxale de la douleur malgré une augmentation des doses consommées. La douleur diminue paradoxalement en supprimant ou en diminuant la dose d'opioïde. La physiopathologie de l'HIO est complexe et encore mal connue, de nombreux mécanismes ont été proposés mais aucun n'a encore été prouvé.

Dans ce contexte, la prise en charge d'une douleur aiguë (traumatique ou post opératoire) dans la population de patients traités au long cours par des opioïdes reste difficile, à cause de cette hyperalgésie mais aussi d'une crainte de la part des soignants de répondre à une demande exagérée par le patient de produit opioïde, avec risque de « réactivation » d'une dépendance sevrée. Aucune recommandation de prise en charge standardisée n'est disponible à ce jour dans la littérature.

2385- Cette étude expérimentale concernant la prise en charge de la douleur chez l'animal sous traitement chronique par buprénorphine a donc pour but, à terme, de définir et valider un protocole d'analgésie efficace et précoce chez des sujets sous traitement chronique par opioïdes et présentant une douleur aiguë.

Les bénéfices escomptés lors de la réalisation de cette étude, pourraient permettre d'étayer des recommandations concernant la douleur, utiles à la pratique quotidienne des médecins prenant en charge ces patients.

L'objectif principal est de déterminer la meilleure prise en charge analgésique d'une douleur aiguë chez des souris sous traitement chronique par buprénorphine.

L'objectif secondaire est de rechercher la présence d'une hyperalgésie induite par les opioïdes chez la souris sous buprénorphine, à l'état basal et lors d'une douleur aiguë; le cas échéant de la prendre en charge.

Ce travail doit être réalisé sur animaux vivants puisqu'il comporte la recherche d'une douleur. Le même niveau d'information ne pourrait pas être apporté par un autre protocole n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants.

La validation du modèle murin de traitement chronique par buprénorphine sera la première étape du projet, reproduisant le plus fidèlement possible un traitement chronique de substitution chez l'humain, ceci afin de pouvoir, à long terme, extrapoler nos résultats à la pratique clinique.

Nous utiliserons des souris mâles C57BL/6J. Les souris seront hébergées dans un établissement doté d'une structure du bien être animal, le nombre d'animaux nécessaire sera minimisé grâce à une méthode statistique utilisant des tests non paramétriques.

Toute forme d'inconfort, de douleur ou d'anxiété des animaux sera limitée au maximum, régulièrement recherchée par analyse comportementale des souris. La douleur sera prise en charge rapidement par une dose analgésique efficace de morphine.

60 souris seront nécessaires à la réalisation du projet : validation du modèle murin de traitement chronique par buprénorphine, évaluation de l'hyperalgésie induite par les opioïdes, prise en charge analgésique et hyperalgésique par stratégie multimodale.

2386- Au cours de ces dernières années, la production de poulets a fortement augmenté dans les pays du Sud où sévissent des températures ambiantes élevées. En Europe et en Amérique du Nord, avec le réchauffement climatique, les poulets peuvent aussi être confrontés à des périodes de températures élevées durant l'ensemble de leur élevage. Les poulets exposés à la chaleur de façon chronique diminuent leur production de chaleur interne en limitant leur consommation d'aliment ce qui induit une baisse de croissance. La chaleur induit également un stress oxydant qui peut avoir des effets négatifs sur la santé des poulets. Ce stress peut être limité par une supplémentation nutritionnelle en antioxydants. Une molécule a été développée récemment. Elle présente une biodisponibilité élevée et elle associe un précurseur de l'acide aminé méthionine avec du sélénium, tous deux impliqués dans les mécanismes antioxydants. Ce projet a pour objectif de tester une supplémentation alimentaire avec cette molécule en comparaison avec un régime contrôle sur 980 poulets exposés ou non à un stress thermique (32°C de 3 à 5 semaines d'âge). Il s'agira d'analyser la réponse des poulets en termes de performances de croissance et de capacité à répondre à un stress oxydatif. Réduction : pour limiter le nombre d'animaux mis en élevage, l'expérimentation ne portera que sur des poulets mâles ; ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour échantillonner suffisamment de tissus et tirer des conclusions significatives selon notre expérience. Remplacement : Compte tenu de l'objectif appliqué du projet en nutrition animale et zootechnie, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico. Raffinement : les poulets seront élevés en conditions standards et feront l'objet d'une surveillance quotidienne. Toute manifestation de symptômes comportementaux persistants définis par un point limite entraînera le retrait de l'animal de l'expérimentation.

2387- L'obésité est un problème de santé publique du fait des complications métaboliques qu'elle favorise (diabète et maladies cardiovasculaires). Par analogie, l'absence de tissu adipeux (lipoatrophie) est aussi délétère car elle induit des complications similaires à l'obésité.

Nos travaux préliminaires au sein du laboratoire ont permis de mettre en évidence le rôle des vésicules extracellulaires (VE) sur la régulation du stockage des lipides au niveau du tissu adipeux. Ces VE sont de petites vésicules obtenues par bourgeonnement de la membrane plasmique qui portent à leur surface différentes protéines selon leur origine cellulaire.

Ainsi, nous avons pu caractériser deux populations de VE dérivées des cellules adipeuses in vitro : de petites vésicules ayant une taille inférieure à 100nm nommées exosomes (Exo) et des vésicules de plus grande taille (entre 100 et 500 nm) nommées microparticules (MP). Nos résultats sur différents modèles cellulaires montrent que ces deux sous-populations de VE modulent différemment le stockage lipidique.

De plus, notre laboratoire travaille aussi depuis de nombreuses années sur un type particulier de VE qui portent le morphogène Sonic Hedgehog (Shh), que l'on appelle MPSHh+ et qui module la différenciation des préadipocytes en adipocytes matures.

L'objectif de ce travail est double :

1) Caractériser les populations de VE dérivées des dépôts adipeux sur différents modèles murins d'obésité ou de lipoatrophie. Ainsi, des modèles de souris obèses (ob/ob et souris C57Bl6 sous régime gras et normal) et de souris lipoatrophiques (cav1 KO et Mfge8 KO) seront utilisées afin d'analyser les VE adipocytaires circulantes (mesurées à partir de prélèvements sanguins) ou les VE dérivées des adipocytes (par mise en culture des dépôts adipeux prélevés après sacrifice des souris).

2) Etudier l'effet de l'injection de différents types de VE (MP et Exo adipocytaires d'une part, et MPSHh+ et MPSHh- d'autre part) qui induisent une modulation du stockage lipidique sur le phénotype métabolique des souris.

Dans ce contexte, ces différents types de VE seront injectées en intraveineuse à des souris obèses (ob/ob et sous régime gras) et de souris lipoatrophiques (cav1 KO et Mfge8 KO).

Le phénotype métabolique des souris sera évalué sur la base de leur dépense énergétique, de leur tolérance au glucose ainsi que de la mesure de paramètres métaboliques (cholestérolémie, triglycéridémie, glycémie, insulïnémie) à partir d'échantillons sanguins prélevés sur animaux injectés. Enfin, une étude histo-morphologique de différents tissus (tissus adipeux, foie, pancréas) prélevés sur animaux sacrifiés complètera cette analyse métabolique.

Tout au long de l'étude, nous veillerons à respecter la règle des 3R ('Replacement, Reduction, Refinement') tout au long de l'étude. Ainsi, le nombre d'animaux utilisés a été restreint à son minimum sans compromettre les objectifs du projet et l'interprétation statistique des résultats expérimentaux. 207 souris de chacun des 8 modèles étudiés (obèses ou lipoatrophiques), soient 1656 animaux au total sur une durée de 5 ans, seront utilisées. De plus, afin de minimiser le plus possible toute douleur, stress ou dommage durables, les animaux seront surveillés quotidiennement en termes d'aspect, de prise alimentaire et de vitalité. Une grille présentant les points limites (Annexe 1) sera utilisée pour déterminer la conduite à avoir.

Une telle étude nous permettra de mieux comprendre le rôle des VE dans le stockage des graisses et dans le développement des complications métaboliques associées. Elle est un préalable à l'utilisation de ces VE comme vecteurs thérapeutiques dans les pathologies liées à l'obésité ou aux lipoatrophies.

2388- La ribavirine a été utilisée comme antiviral à large spectre pour traiter de nombreuses maladies virales, en association avec l'interféron et d'autres antiviraux. De fait, la ribavirine induit un vieillissement prématuré des globules rouges dont la durée de vie est fortement diminuée et conduit à l'anémie, un effet indésirable gênant qui contraint certains patients à arrêter leur traitement malgré son efficacité. Nous avons démontré grâce à un test *in vitro* que la DHEA (déhydroépiandrostérone) pouvait grandement inhiber cet effet comme nous l'avons publié dans un article princeps et repris dans deux lettres publiées dans de grandes revues internationales. Avant d'envisager une application clinique, nous devons vérifier cet effet chez l'animal et nous proposons d'utiliser dans un premier temps les hématies murines comme modèle avant de faire un essai préclinique chez la souris. Un groupe de 30 souris et un groupe de 6 rats seront prélevés pour récupérer les hématies qui seront traitées par la ribavirine à différentes doses pour vérifier l'induction de l'hémolyse ou par l'association ribavirine-DHEA toujours à différentes doses pour vérifier l'effet inhibiteur de la DHEA sur l'hémolyse. Les souris et les rats seront sacrifiées dès leur arrivée sous anesthésie générale. Notre objectif est de démontrer de façon certaine que la DHEA a un effet inhibiteur de l'hémolyse induite par la ribavirine sur les hématies murines *in vitro* avant de commencer un essai préclinique.

2389- Les troubles anxieux et les troubles liés au stress sont particulièrement fréquents dans les pays industrialisés. Ainsi, on estime que 13 à 22% des habitants de ces pays développeront une pathologie anxieuse au cours de leur vie.

Le test de l'enfouissement défensif conditionné (EDC) est l'un des tests permettant d'évaluer l'anxiété chez le rongeur. Ce test est notamment connu pour sa sensibilité à la plupart des anxiolytiques (agents pharmacologiques qui réduisent l'anxiété) efficaces chez l'homme. C'est donc un outil de choix pour l'évaluation de nouveaux traitements.

Dans cette situation, le rat est placé dans un environnement connu dans lequel un élément nouveau a été ajouté : une électrode qui délivre un seul et unique choc lors du premier contact de l'animal avec l'une de ses pattes. En réaction, le rat projette la sciure disposée sur le sol vers l'électrode. Ce comportement d'enfouissement est directement corrélé au niveau d'anxiété des rats. Ainsi, les produits qui présentent des propriétés de type anxiolytiques réduisent la durée d'enfouissement.

Le comportement des animaux dans ce test est sensible aux conditions d'applications du test. Les facteurs connus pour faire varier le comportement des animaux sont, de manière non exhaustive, la souche de rat, l'intensité du choc, le type de sciure, le protocole d'habituation,...L'origine des rats (éleveur) et les conditions d'élevage et de stabulation peuvent également avoir un effet sur le comportement des rats, notamment l'enrichissement utilisé ou non. La maîtrise de ses facteurs est déterminante pour la qualité des études réalisées. Les effets de nouveaux traitements potentiellement peuvent ne pas être détectés si les animaux sont dans un état d'anxiété trop faible ou trop élevé, ou si leur comportement est trop variable.

L'objectif du présent projet est de comparer, dans les conditions de notre laboratoire, le comportement d'enfouissement des rats de souches Wistar Han et Sprague Dawley, placés en environnement enrichi, en fonction de l'intensité du choc pour déterminer les conditions optimales d'utilisation du test en fonction de la souche de rat. Nous avons en effet des demandes pour la réalisation d'études sur le comportement d'enfouissement sur la souche Sprague-Dawley nécessitant donc des étapes de validation. La souche Sprague-Dawley étant moins sensible que la souche Wistar, nous avons choisi de tester l'intensité de 2 mA que nous utilisons pour la souche Wistar, et une intensité plus forte de 4 mA. Une validation pharmacologique avec du diazépam sera également réalisée.

Dans ce projet, 80 rats seront utilisés, répartis en 2 séries expérimentales successives de 40 rats chacune.

L'expérience 1 consiste à déterminer l'intensité du choc afin d'obtenir une réponse optimale dans le comportement d'enfouissement en fonction de la souche de rat utilisée (et avec utilisation d'un dispositif d'enrichissement identique à celui

utilisé par le fournisseur des animaux (Enviro-dri). Chaque rat sera gavé avec de la méthyl cellulose par voie orale, afin de reproduire les conditions expérimentales des études de Pharmacologie qui seront réalisées par la suite (expérience 2). Les animaux seront habitués au gavage pendant les 3 jours précédents le test, puis recevront un 4ème gavage avec de la méthyl cellulose 1 h avant la mesure de l'anxiété le jour du test de l'EDC avec délivrance d'un choc électrique de 2 ou 4 mA. La méthyl cellulose sera administrée à un volume de 5 ml/kg. L'administration des traitements sera réalisée à l'aide d'une sonde de gavage adaptée à la taille des animaux.

L'expérience 2 a pour but de réaliser la validation pharmacologique du test par le diazépam chez les deux souches de rats (Wistar Han ou Sprague Dawley), suite au choix de l'intensité du choc électrique déterminée par l'expérience 1 et en utilisant le même dispositif d'enrichissement. Les animaux des groupes diazépam recevront pendant les 3 jours précédents le test et 1 h avant la mesure de l'anxiété le jour du test de l'EDC une dose de 3 mg/kg de diazépam, les animaux des groupes véhicule recevant de la méthyl cellulose.

Les animaux seront habitués au dispositif expérimental les 3 jours précédents le test : les animaux d'une même cage d'habitation sont placés ensemble dans le dispositif expérimental (cage standard dont le sol est couvert de 5 cm sciure présentant un orifice de 2 x 2 cm sur une des parois) pour une durée de 30 minutes. Ils sont ensuite immédiatement ramenés à l'animalerie. Le jour du test, 1h après l'administration orale du traitement, chaque rat est amené individuellement dans la salle de test. Il est placé dans le dispositif expérimental dans lequel une électrode a été insérée par l'orifice. Lors du premier contact des pattes de l'animal avec l'électrode, 1 seul et unique choc électrique d'une intensité de 2 ou 4 mA par un expérimentateur entraîné. Le comportement de l'animal est ensuite observé pendant 5 minutes. Les rats sont ensuite immédiatement ramenés à l'animalerie dans leur cage d'habitation.

Un contrôle du bien être des rats sera effectué quotidiennement tout au long de l'étude (vocalises, piloérection, cachexie,...). Les animaux ne répondant pas à ces critères seront exclus de l'étude et une mise à mort en conformité avec les recommandations éthiques sera effectuée.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets anxiolytiques de nouveaux produits car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) (remplacement). Les essais permettront de déterminer pour chaque condition expérimentale la variabilité dans le modèle en fonction de l'éleveur et de l'intensité du choc, ce qui permettra à l'avenir de réaliser des calculs de puissance statistique pour déterminer le nombre optimal d'animaux à utiliser pour chaque étude. Cela évitera d'utiliser trop (réduction) ou trop peu (raffinement) d'animaux et de permettre ainsi l'exploitation des résultats.

2390- Ce projet de recherche fondamentale a pour but de comprendre une question de santé, la douleur. La douleur chronique est un problème de santé majeur puisqu'elle touche un européen sur cinq. Le projet vise à élucider le rôle d'un gène des cellules microgliales, ou microglies, dans la perception et le contrôle de la douleur. Les microglies, sont l'un des types cellulaires du cerveau. Elles surveillent le système nerveux pour détecter la présence d'infections ou de lésions, et sont aussi des acteurs importants dans le contrôle de la douleur.

Afin de répondre à cette question, nous utiliserons des souris mutantes pour ce gène dans les microglies, qui seront comparées à des souris contrôles.

Le remplacement par des expériences in vitro est impossible car la douleur est un processus complexe dans un organisme intégré dont l'étude nécessite des tests comportementaux au niveau d'un organisme entier. Le modèle chez la souris est nécessaire dans le présent projet pour comprendre les relations entre les composants des systèmes de contrôle de la douleur tels que les neuromédiateurs, leurs récepteurs et les types cellulaires impliqués au niveau de l'organisme entier. La perception des messages douloureux se reprochent de celle perçue par les patients douloureux, et ne peuvent pas être remplacées par des études in vitro.

Le nombre d'animaux est réduit à 96. En effet, afin de garantir des résultats significatifs au niveau statistique et en tenant compte de la variabilité interindividuelle inhérente aux tests utilisés, le nombre de 16 souris par groupe (contrôle et mutés) et par genre, soit 96 souris au total, seront utilisées.

Raffinement : Les tests nociceptifs appropriés seront utilisés pour minimiser la douleur potentielle et augmenter le bien-être animal, en particulier l'utilisation de durées limites d'exposition aux stimuli nociceptifs.

Procédures et dommages attendus : les animaux seront analysés pour leur sensibilité de base aux stimuli douloureux. Les souris seront ensuite comparées pour leur sensibilité à la douleur inflammatoire induite localement à l'aide de l'Adjuvant Complet de Freund administré sous anesthésie. Le développement et la résolution de la douleur seront mesurés au cours du temps. Il n'y a pas de dommage attendu pour ce protocole, utilisé depuis longtemps dans la littérature sans dommage rapporté.

De plus, la définition des points limites éthiques permettra d'éviter toute douleur ou détresse inutile.

2391- Le présent projet concerne le contrôle réglementaire de l'innocuité de différents produits immunologiques destinés aux carnivores domestiques.

Il n'existe pas pour le moment de méthode alternative d'évaluation de l'innocuité de ces produits.

Deux procédures répétitives sont décrites dans le présent projet, réalisées sur rongeurs dans le cadre strict du contrôle qualité de chaque lot de fabrication en conformité avec différentes législations (nationales et/ou européenne).

Ce projet est conçu en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

- L'utilisation systématique d'un anesthésique dans le cas d'une des procédures,
- L'enrichissement apporté dans les cages des animaux,

- La surveillance renforcée des animaux et la définition de points limites adaptés permettant la réduction de la souffrance, le cas échéant.

Le nombre d'animaux envisagé sera de 8300 rongeurs pour l'ensemble du projet.

2392- Contexte: De grands progrès ont été réalisés au cours des derniers siècles en matière de compréhension, de prévention et de traitement des infections. Elles restent cependant un motif fréquent d'admission en réanimation et le choc septique, stade le plus grave de l'infection, est responsable chaque année de nombreux décès (30 à 45%) malgré une prise en charge optimale. Les raisons pour lesquelles une bactérie peut être responsable d'une infection contrôlée ou d'un choc septique fatal ne sont pas encore complètement comprises. La réponse de l'hôte, semble être un élément clé du problème. Une des principales caractéristiques du choc septique est le développement d'une inflammation excessive et non contrôlée, qui a des conséquences délétères sur l'organisme pouvant conduire au décès. Le traitement étiologique du choc septique consiste en une antibiothérapie précoce à large spectre, éventuellement un contrôle chirurgical du foyer infectieux, et un traitement symptomatique de l'insuffisance circulatoire aiguë et des défaillances d'organes secondaires.

Bien que les mécanismes de défense contre l'agent microbien (le pathogène) ne sont pas encore bien connus, il est établi que les polynucléaires neutrophiles, qui sont les cellules effectrices de l'inflammation, y jouent un rôle clé. En plus des neutrophiles, les plaquettes sanguines, bien connues pour leur rôle clé dans l'arrêt du saignement, pourraient jouer un rôle dans l'initiation et la propagation des mécanismes immunitaires de défense contre les agents pathogènes. Parmi les nombreux agents pro-inflammatoires participant au recrutement et à l'activation des neutrophiles, les nucléotides extracellulaires et leurs récepteurs P2 ont été proposés pour jouer un rôle. Ces récepteurs sont présents sur toutes les espèces cellulaires qui interviennent dans les mécanismes de défense contre les agents pathogènes (neutrophiles, plaquettes, cellules endothéliales). L'objectif de ce projet est d'évaluer le rôle des récepteurs P2 sur l'incidence et les mécanismes moléculaires du choc septique. Ce travail portera sur un modèle de souris en choc septique, d'origine polymicrobienne, par péritonite. Le choc septique est un phénomène multifactoriel qui implique plusieurs types de cellules et des intercommunications qui ne peuvent pas être reproduites de façon complète in vitro, tant sur le plan des identités et des mécanismes en jeu que sur le plan temporel. Des modèles expérimentaux in vivo sont donc nécessaires pour évaluer i) l'identité de chaque type cellulaire impliqué, ii) le rôle de ces cellules et les mécanismes moléculaires mis en jeu et iii), le déroulement des événements.

Résultats espérés: Une meilleure compréhension physiopathologique du rôle des récepteurs P2 dans la défense contre les agents pathogènes permettra potentiellement l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le choc septique.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Ces nombres d'animaux est fixé à 10 par condition par l'utilisation d'un test approprié (t-test, one way ou two-way ANOVA, selon les questions posées et les expériences). ». Le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal.

Raffiner : Afin de limiter l'anxiété, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées:

- le maximum d'expériences sera réalisé sur des animaux anesthésiés;

- en fin d'expérience, le sang sera prélevé à l'aorte des animaux anesthésiés, qui seront ensuite mis à mort en vue de prélever différents tissus.

Points limites : Les points limites sont établis en suivant les scores du tableau (Annexe). Lorsque le score de 2 est atteint, l'animal est sacrifié par inhalation de CO₂.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront remplacées par des études in vitro sur cellules.

L'ensemble de ces expériences nécessitera 136 souris.

2393- Tout expérimentateur est amené à acquérir, entretenir ou perfectionner une technique. Ce protocole est dédié à l'entraînement du personnel sur les gestes nécessaires à la bonne réalisation des projets de recherche existants, gestes acquis à l'occasion de formations, internes à l'entreprise ou externes (transmission des compétences, harmonisation des méthodes d'administration et de prélèvement). Ce projet a pour but principal de garantir la bonne réalisation des études, de la fiabilité des résultats, du respect du bien-être animal par des gestes maîtrisés. Il s'inscrit dans l'obligation réglementaire de s'assurer de la compétence du personnel, entretien régulier et entraînements spécifiques en vue de réaliser des techniques pointues ou peu réalisées au quotidien.

Des entraînements ont été testés sur des modèles ne nécessitant pas le recours à l'animal (rats synthétiques par exemple), mais malheureusement sans que cela soit concluant. Il est par exemple difficile de s'entraîner sur la contention d'un rongeur sans prendre en compte le fait que l'animal bouge.

Le type de geste et les espèces, rats et/ou souris et/ou hamsters, sont choisis et adaptés en fonction des besoins de perfectionnement pour les études prévues.

-Soit à l'état vigile pour les techniques de prélèvements de sang ou administrations de produits (IV, IP, PO, SC, IM, Intra-colonique (ICo)),

-Soit sous anesthésie suivie de réveil ou non (pose de cathéters, intracardiaque, aorte abdominale..).

Les animaux utilisés dans le cadre de ce protocole font essentiellement l'objet d'une réutilisation après un premier projet (animaux non traités et non inclus à l'issue des randomisations par exemple). Les animaux ne seront maintenus à l'issue d'un premier projet que quelques jours à quelques semaines avant d'être réutilisés dans le cadre de ce projet, dans la condition de leur bon état général.

Nous utilisons exclusivement des rats, des souris et des hamsters, réutilisés, issus de projets de degrés inférieurs à modérés, voire non inclus dans certaines études.

Les trois espèces sont hébergées en groupes sociaux tout au long des expérimentations, dans des cages enrichies respectivement de bâtonnet en bois à ronger et de « cocoon » afin de développer leur comportement de nidification pour les souris, de cubes de bois à ronger pour les rats et de lamelles de papier et bâtonnets de bois à ronger pour les hamsters.

On peut estimer à environ 500 le nombre d'animaux (rat, souris et hamsters) qui seront utilisés pour ce projet sur 5 années.

2394- Nous avons montré que la protéine IL34 de rat était capable d'induire une tolérance à l'allogreffe de cœur chez le rat. La protéine IL34 humaine est un candidat prometteur de thérapie active sur le système immunitaire humain notamment dans les contextes de développement d'une réaction du greffon contre l'hôte (GVH) lors de greffes hématopoïétiques et de rejet de greffe d'organe solide.

L'objet de cette saisine est d'évaluer le potentiel thérapeutique de la protéine humaine IL34 dans 2 modèles de souris humanisées développés par le laboratoire, à savoir un modèle de GVH xénogénique par injection de cellules humaines xénoréactives chez la souris humanisée, et un modèle d'allogreffe de peau humaine chez la souris NSG injectée avec des cellules humaines allogéniques.

Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie comme suit :

- Remplacer : Des études fonctionnelles ont été réalisées in vitro à partir de cellules humaines, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études in vivo. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité immunorégulatrice de la molécule dans un modèle vivo proche de l'Homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique est le modèle de souris dites «humanisées ».

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit à 20, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (Log Rank test pour les courbes de survie, description des tests statistiques utilisés détaillée ci-après). Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Un groupe est prévu pour optimiser le mode d'administration de la molécule (mini pompe osmotique pour libérer une dose continue de protéine) si les résultats sont encourageants avec la première voie d'administration (ip, classiquement utilisé et efficace) tels qu'un développement de GVH ou de rejet retardé mais déclaré avant J50. Le nombre total maximum d'animaux est de 160 (comprenant l'optimisation du protocole).

-Raffiner : Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids, le développement de la GVH et/ou du rejet de greffe et des prélèvements sanguins seront effectués tous les 15 jours pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris NSG. Tous les animaux traités avec la molécule et ceux des groupes contrôles seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les organes dues à la réaction de GVH et dans le greffon, et par immunohistologie pour étudier la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action.

Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique de la protéine IL34 humaine sur les réponses immunes intervenant dans des contextes de GVH et d'allogreffe, de déterminer la dose efficace de la protéine IL34, de confirmer sa stabilité in vivo, de mieux comprendre ses mécanismes d'action par les analyses anatomopathologiques des organes des souris traitées. Cette étude est soutenue par l'INSERM transfert, la molécule IL34 faisant l'objet de 3 brevets quant à son potentiel thérapeutique prometteur dans le domaine de la transplantation d'organe solide et de cellules, mais aussi pour le traitement de maladies autoimmunes. La validation de la molécule dans ce modèle préclinique de souris humanisée est la dernière étape indispensable avant les tests cliniques.

2395- Le pansement de type film évalué chez le chien dans cette étude est déjà utilisé en dermatologie chez l'Homme. Un premier essai chez des chiens et des chats de propriétaires a mis en évidence une satisfaction des observateurs sur la cicatrisation (peau irritée). En pratique vétérinaire, le produit sera appliqué sur différents environnements cutanés impliquant une peau lésée.

La présente étude vise à vérifier rigoureusement l'innocuité sur peau saine du dispositif testé ce qui ne peut pas être réalisé dans un essai clinique. Ces tests seront faits sur six sites cutanés différents de 12 chiens de race Beagle : peau fine des ars (1 site), peau tondu au niveau des flancs (5 sites). Quatre sites de la peau tondu recevront une des procédures suivantes : application de deux agrafes sous anesthésie locale, application de deux sutures simples avec fil résorbable ou non-résorbable (2 sites différents) sous anesthésie locale, et enfin application d'un pansement sans suture.

Pour évaluer la tolérance du produit, une application quotidienne sera réalisée sur 8 chiens pendant 2 semaines et une application biquotidienne sur 4 chiens pendant 4 semaines. Ce type d'essais destinés à caractériser la tolérance d'une nouvelle préparation à visée thérapeutique vétérinaire doit être conduite dans l'espèce cible, ici le chien.

Le produit sera appliqué sur un des flancs et l'autre flanc ne sera recevrira aucun soin (Témoin). Chaque jour, avant l'application des produits, une photo de chacun des deux fois 6 sites sera prise et un scoring clinique sera effectué.

L'utilisation de chaque animal comme son propre témoin ainsi que l'application du produit en plusieurs sites sur le même animal permet de réduire de manière drastique le nombre d'animaux utilisés. La surveillance quotidienne des animaux et surtout le fait que le produit soit déjà utilisé chez l'Homme et qu'il ait déjà été évalué chez les carnivores domestiques sans présenter de toxicité permettent de penser que l'impact de cette étude sera minime sur les animaux. Par ailleurs, les chiens

recevront une friandise à chaque examen clinique et application de pansement, ce qui dans notre expérience semble compenser du point de vue de l'animal le désagrément lié au traitement.

2396- Contexte: Les infections constituent un motif fréquent d'admission en réanimation et le choc septique, stade le plus grave de l'infection, est responsable chaque année de nombreux décès (30 à 45%). Les raisons pour lesquelles une bactérie peut être responsable d'une infection contrôlée ou d'un choc septique fatal ne sont pas encore complètement comprises. Une des principales caractéristiques du choc septique est le développement d'une inflammation excessive et non contrôlée, qui a des conséquences délétères sur l'organisme pouvant conduire au décès.

Bien que les mécanismes de défense contre l'agent microbien (le pathogène) ne sont pas encore bien connus, il est établi que certains types de globules blancs dans le sang, les polynucléaires neutrophiles, y jouent un rôle clé. En plus des neutrophiles, les plaquettes sanguines, bien connues pour leur rôle clé dans l'arrêt du saignement, pourraient également y jouer un rôle notamment dans l'initiation et la propagation des mécanismes immunitaires de défense contre les agents pathogènes. Parmi les nombreux agents pro-inflammatoires participant à l'activation des neutrophiles, l'adénosine 5'-triphosphate (ATP) et ses récepteurs P2 ont été proposés pour jouer un rôle. Ces récepteurs sont présents sur toutes les espèces cellulaires qui interviennent dans les mécanismes de défense contre les agents pathogènes (neutrophiles, plaquettes, cellules endothéliales). L'objectif de ce projet est d'évaluer le rôle des récepteurs P2 sur l'incidence et les mécanismes moléculaires du choc septique. Le choc septique est un phénomène multifactoriel qui implique plusieurs types de cellules et des intercommunications qui ne peuvent pas être reproduites de façon complète in vitro, tant sur le plan des identités et des mécanismes en jeu que sur le plan temporel. Des modèles expérimentaux in vivo sont donc nécessaires pour évaluer i) l'identité de chaque type cellulaire impliqué, ii) le rôle de ces cellules et les mécanismes moléculaires mis en jeu et iii), le déroulement des événements. Ce travail portera sur un modèle de souris en choc septique, d'origine polymicrobienne, par péritonite.

Résultats espérés: Une meilleure compréhension physiopathologique du rôle des récepteurs P2 dans la défense contre les agents pathogènes permettra potentiellement l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le choc septique.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisé est réduit au minimum afin d'obtenir des données statistiquement significatives, fixé à 10 par groupe, par l'utilisation d'un test approprié (t-test, one way ou two-way ANOVA, selon les questions posées et les expériences). Le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal.

Raffiner : Afin de limiter l'anxiété, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées:

- le maximum d'expériences sera réalisé sur des animaux anesthésiés;

- en fin d'expérience, le sang sera prélevé à l'aorte des animaux anesthésiés, qui seront ensuite mis à mort en vue de prélever différents tissus.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront remplacées par des études in vitro sur cellules.

L'ensemble de ces expériences nécessitera 60 souris.

2397- Lors de la fécondation, les gamètes fortement différenciés subissent un intense remodelage de leur génome pour former l'embryon. Au cours des premières étapes de développement, les cellules qui composent cet embryon vont progressivement se modifier et se séparer en deux types de cellules : d'une part des cellules déjà différenciées, qui formeront plus tard le placenta, et d'autre part des cellules dites pluripotentes qui sont capables de se différencier en toutes les cellules de l'individu à naître et donc qui formeront le fœtus. Ce sont les mécanismes qui contrôlent ces phénomènes essentiels, très précoces, que nous étudions, dans le modèle de la souris. Nous nous intéressons à la régulation de l'expression des gènes impliqués dans ces phénomènes de dédifférenciation - différenciation, au rôle de l'environnement dans cette régulation et aux conséquences à plus ou moins long terme sur le développement de l'embryon.

Ce projet portant sur le développement embryonnaire, il nous est impossible de remplacer l'animal par un modèle cellulaire ou in silico. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont élevés à des fins expérimentales et dans des conditions d'hébergement standard de l'Unité Expérimentale.

Pour ce projet de 5 ans, nous utiliserons 1300 souris, (50 mâles et 1250 femelles). Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés nous procédons à un protocole de stimulation ovarienne qui permet de collecter deux fois plus d'embryons par femelles. Les souris sont ensuite accouplées et la présence d'un bouchon vaginal permet de s'assurer que la fécondation a bien eu lieu. Les embryons sont collectés après euthanasie de la femelle à différents temps (de 1 jour à 4 jours après la fécondation). En moyenne 18 embryons sont collectés par femelle.

Les expériences que nous réalisons sur les embryons nécessitent toutes des lots de 10 à 25 embryons. Ces techniques doivent être reproduites afin de garantir la fiabilité des résultats obtenus et permettre d'effectuer des tests statistiques adaptés aux petits échantillons.

Toutefois, nous essayons de réduire le nombre d'embryons utilisés en modifiant les techniques pour valoriser au mieux la faible quantité de matériel (protéines ou acides nucléiques) présent dans les embryons constitués de 1 à 64 cellules. Enfin, les individus et les embryons sont mutualisés entre sous-parties du projet et, dans la mesure du possible, avec d'autres projets de l'établissement utilisateur.

2398- Le service commun de production d'Anticorps de Lapin a pour but de fournir à la communauté de chercheurs un anticorps de lagomorphe de qualité, reconnaissant le peptide ou la protéine (Antigène) étudié par le demandeur.

Le projet porte sur 600 lapins environ sur 5 ans, soit 120 lapins par an. Chaque lapin ne recevra qu'un seul antigène, injecté par voie intradermique sous anesthésie générale. Les Anticorps récoltés dans le sérum serviront de marqueurs et permettront de retrouver la protéine étudiée dans une coupe de tissu, par exemple.

Dans un souci de respect à la règle des trois R, nous nous sommes attachés aux points suivants:

Réduction: Le protocole que nous avons établi est dicté par la volonté de réduire le nombre d'animaux nécessaire à la production. Plus efficace que par le passé, ce protocole nous fournit un taux de positivité plus élevé sans avoir à recourir à de nombreux essais sur davantage d'animaux.

Remplacement: Les Anticorps polyclonaux synthétiques n'existant pas, le passage par l'utilisation d'un animal est inévitable mais grâce au raffinement du protocole, le nombre d'animaux utilisé a été réduit de moitié.

Raffinement: Le choix de la voie d'injection, indolore sous anesthésie, ainsi que le grand nombre de points d'injections, et donc la diminution de la douleur aux sites injectés, permet d'obtenir un effet retard à l'immunisation et évite de ré-injecter l'animal à plusieurs reprises.

Pour éviter tout stress lié à l'effet de surprise un animalier est dédié à sa pièce d'animalerie. Un climat de confiance et d'habitudes s'établit, rendant ainsi les manipulations moins anxiogènes. Distribution de récompenses comestibles, anesthésie avec présence humaine au moment du réveil contribuent au raffinement de la présence de l'animal au laboratoire.

2399- Aujourd'hui, 30 ans après la découverte du VIH, le SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) reste un fléau qui affecte 34 millions de personnes dans le monde et, en France, on déplore encore environ 7000 nouvelles contaminations par an

En novembre 2010, le cinquième plan national de lutte contre le SIDA/VIH/IST 2010-2014 a été lancé par les pouvoirs publics et leurs partenaires scientifiques. Ce plan novateur vise à infléchir la dynamique de l'épidémie VIH et à réduire la morbi-mortalité liée au VIH et au SIDA. Une des mesures détaillée dans ce plan national est le recours à un traitement précoce et continu des personnes. Ce projet s'inscrit dans cette thématique en proposant la validation chez le singe d'un candidat vaccin thérapeutique visant à pallier, notamment, au déficit immunitaire induit par l'infection VIH.

La modélisation expérimentale *in vitro* d'une réponse immunitaire est rendue difficile par la complexité des systèmes biologiques reconnaissant et discriminant le « soi » et le « non soi ». Ce projet nécessite le recours à l'expérimentation animale pour modéliser la réponse induite par la vaccination chez l'Homme et valider le pouvoir immunogène du candidat vaccin.

Des études préalables réalisées sur rongeurs ont permis de valider l'intérêt du peptide à l'origine du candidat vaccin. Le choix de l'espèce primate utilisée dans ce projet (*Macaca fascicularis*) est basé sur la pertinence du modèle pour la thématique de réponse vaccinale contre le VIH.

Ce projet a déjà obtenu une autorisation de projet en 2015. Il s'agissait de pouvoir détecter un effet significatif du traitement (3 groupes de 3 animaux chacun recevant un candidat vaccin) et de caractériser les réponses immunes aux candidats vaccins (anticorps et cellulaires) évaluées *in vitro* à partir du sang prélevé.

Cette nouvelle demande modifie le premier projet en ajoutant deux groupes de 3 singes visant à tester deux nouveaux adjuvant qui donnerait des résultats prometteurs avec le conjugué vaccinal déjà testé (au total 5 groupes de 3 singes).

Le projet est réalisé dans une structure adaptée à l'hébergement des animaux utilisés et ne requiert qu'une procédure légère comprenant des injections sous-cutanées et des prises de sang dans le respect des recommandations propres à l'espèce. Dans un souci de respect de la règle des 3Rs, une attention particulière sera portée aux animaux afin de limiter au maximum les contraintes imposées par le protocole expérimental (hébergement en groupe social, enrichissement du milieu, tranquillisation pour les manipulations...). Le projet ne nécessite pas l'euthanasie des animaux.

2400- Le projet, réalisé dans un cadre réglementaire, a comme objectif de permettre l'évaluation du potentiel toxique d'un candidat médicament pendant son développement pré-clinique. Conformément à la ligne directrice " ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals; EMA/CPMP/ICH/286/1995; December 2009", l'évaluation du potentiel toxique d'un candidat médicament chez un non-rongeur est indispensable pour chaque nouveau candidat médicament avant de pouvoir démarrer les essais cliniques chez l'homme, et avant toute autorisation de mise sur le marché. Selon la guideline ICH Topic S6(R1), Step 4 Note for Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Products (EMA/CHMP/ICH/731268/1998 - adopté June 2011), l'espèce primate peut même être la seule espèce pertinente pour les essais pré-cliniques des composés biologiques (protéines thérapeutiques, anticorps monoclonaux, vaccins thérapeutiques anti-cancer...).

L'objectif étant de déterminer les effets potentiels du candidat médicament chez le primate, ce projet consistera donc en l'administration de ce candidat médicament par la voie prévue chez l'homme, et selon le même schéma de traitement.

Ce projet consiste en 3 procédures qui englobent toutes les études nécessaires au développement pré-clinique d'un candidat médicament chez le primate (études préliminaires, subchroniques et chroniques) dont la durée varie de 1 jour à 52 semaines (ou plus si jugé nécessaire par les Autorités). L'évaluation de la toxicité d'un candidat médicament ne peut pas être réalisée *in vitro*. Il n'existe pas de méthode alternative *in vitro* pour ce type de procédure de traitement identique à celle utilisée chez l'homme, en raison notamment de la complexité que représente un organisme vivant.

Le nombre d'animaux par groupe suit les recommandations des lignes directrices et inclut le nombre minimum d'animaux permettant une analyse statistique fiable des données. Il est attendu d'utiliser au maximum 1254 macaques crabiers et 66 macaques rhesus sur la durée du projet de 3 ans. Si nécessaire, l'administration du composé à tester est réalisée sous anesthésie générale pour permettre une injection en toute sécurité et sans douleur (voie intra articulaire ou intravitréenne, par exemple). Les doses de produit sont choisies en vue d'éviter toute toxicité excessive, néanmoins, des soins adéquats

seront appliqués pour éviter l'inconfort et l'on peut recourir à l'usage d'analgésiques pour diminuer la douleur si elle n'a pas pu être évitée. L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée. Les animaux sont hébergés dans la mesure du possible en groupe dans des cages conformes à la Directive 2010/63. Un soin particulier est accordé à l'enrichissement (renforcement positif, jouets, perchoirs, musique).