



**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 (24)

2401- Le modèle « rat » est particulièrement pertinent pour l'étude de la toxoplasmose. En effet, cet agent parasitaire infecte tous les animaux à sang chaud et les caractéristiques physiopathologiques chez cet animal sont très proches de celles retrouvées chez l'homme (ce qui n'est pas le cas de la souris). Des études récentes (2014) montrent qu'il existe des rats consanguins complètement réfractaires (LEW, LOU, BDIX, WKYO, WF) et, à l'opposé, des rats sensibles à la toxoplasmose (F344, BN, DA, ACI). Ces auteurs ont clairement identifié l'implication du gène NLRP1 dans cette différence de sensibilité. Ayant largement participé à ces travaux, certains résultats préliminaires seraient en faveur de la présence de 2 facteurs génétiques impliqués et distincts dans cette résistance/sensibilité : NLRP1 est le premier, le second est encore non-identifié. Pour prouver cela et pour l'identification du second gène, nous proposons de réaliser des tests sur ces différents types de rats : les rats LEW, LOU, BDIX, WKYO, WF (résistants), les rats F344, BN, DA, ACI (sensibles) et des rats hybrides F1 (croisement F1 LEW x F344 par exemple).

Nous réaliserons chez ces rats une étude *in vivo* (infection expérimentale sans conséquence clinique, suivi d'un titrage sérologique et d'une quantification de kystes cérébraux). Nous utiliserons pour cela une souche de *Toxoplasma gondii* de type II faiblement virulente et correspondant aux souches naturellement retrouvées dans la nature. Nous évaluerons différentes conditions expérimentales (inoculum, souche, inflammation digestive) pouvant modifier la sensibilité de l'infection.

En pratique, cette étude sera réalisée sur un maximum 100 animaux, elle correspond à un gavage de kystes (de 20 à 1000 kystes infectieux), un suivi pondéral de sécurité, une seule prise de sang/animal (à J21) et une mise à mort entre 5 et 7 semaines post-infection (J42 +/- 7) avec prélèvements sanguins et tissulaires réalisés après mise à mort.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes sociaux harmonieux ; dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

2402- Afin qu'un nouveau composé chimique devienne un médicament sûr et efficace, un ensemble d'études expérimentales utilisant des animaux est nécessaire.

Dans ce contexte, il s'agit de tester les propriétés décurarisantes d'un composé sur le blocage neuromusculaire induit par administration d'agents curarisants. Ce projet utilisera 27 rats, nombre minimal d'animaux pour pouvoir valider l'efficacité du composé. Un suivi de la force musculaire sera effectué. A la fin de la manipulation, les animaux seront euthanasiés.

Les animaux seront hébergés selon les standards en vigueur et feront l'objet d'une surveillance sous le contrôle d'un vétérinaire. En cas de signes cliniques, des mesures appropriées seront prises pour éviter la souffrance des animaux.

2403- Le glioblastome multiforme est le cancer du cerveau le plus fréquent et le plus dévastateur. Malgré l'utilisation d'une thérapie agressive basée sur la chirurgie associée à la chimiothérapie et radiothérapie le pronostic de ces patients reste très faible avec un taux de survie inférieur à 30 % à un an. De nouveaux traitements doivent être développés en complément des thérapies actuelles. Récemment, des médecins ont essayé une combinaison de chimiothérapie et radiothérapie avec de l'immunothérapie dans l'espoir d'améliorer les résultats. La revue des essais montre qu'il existe une augmentation de la réponse au traitement lorsque l'immunothérapie est ajoutée à la chimiothérapie ou la radiothérapie.

Le premier objectif de notre projet est de mettre en évidence l'effet bénéfique de la combinaison d'un anticorps médicament ciblant les cellules cancéreuses aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie existants dans des modèles animaux de tumeurs cérébrales. Nous utiliserons à cette fin des souris chez qui seront greffées avec des tumeurs cérébrales. Nous utiliserons des cellules cancéreuses de souris qui seront greffées dans des souris possédant un système immunitaire fonctionnelle. Ce modèle nous permettra d'étudier les répercussions de la chimiothérapie et radiothérapie sur le système immunitaire. Les souris porteuses de tumeurs cérébrales seront groupées en différents groupes qui seront traités chacun soit

avec l'anticorps médicament seul, soit avec la radiothérapie seule. Dans un deuxième temps, les combinaisons de l'immunothérapie avec la chimiothérapie (dose = 25 mg/kg/souris), puis avec la radiothérapie et avec les deux thérapies standards seront étudiées. L'efficacité de chacun des traitements sera comparée afin d'identifier la combinaison la plus efficace. Ces données serviront de base à la conception d'un essai clinique chez l'homme.

La deuxième partie de notre projet consiste à étudier l'influence de l'immunothérapie, seul ou en association, sur les populations de cellules souches tumorales de glioblastome. De nombreuses études ont montré l'implication de ces cellules souches dans les phénomènes de résistance aux thérapies standard et de rechute des patients. Au laboratoire nous avons ciblé ces cellules souches tumorales humaines à l'aide de notre anticorps médicament *in vitro*. Pour compléter cette étude, nous utiliserons des cellules cancéreuses humaines qui seront greffées dans des souris possédant un système immunitaire non fonctionnelle. Ce modèle nous permettra d'étudier les répercussions des différents traitements sur ces populations cellules souches humaines. Ces données serviront de base à la conception d'un essai clinique chez l'homme.

Afin d'établir les groupes d'expériences et les groupes contrôles, un nombre total de 365 souris est estimé (305 C57BL6 albinos et 60 souris NSG). Dans l'objectif de réduire ce nombre d'animaux, nous travaillerons à une dose unique sans effet toxique observable de chimiothérapie de 25 mg/kg/souris, correspondant à la dose du traitement d'initiation chez l'homme. Pour leur confort, les animaux seront hébergés en groupe (5 max) avec enrichissement et surveillés quotidiennement. Ces études nécessitent impérativement un tissu tumoral en place dans un système physiologique pharmacodynamique et comprenant un réseau vasculaire capable de se remodeler à partir de toute cellule de l'organisme. Il n'existe aucune procédure *in vitro* qui puisse remplacer ces expériences.

2404- Le développement de certains composés pharmaceutiques requiert des explorations *in vivo* chez l'animal, à part des études réglementaires à proprement parler. Ces études peuvent être demandées ou non par les autorités réglementaires, pour affiner ou mettre en place des conditions expérimentales, ou pour répondre à des questions de sécurité, ou pour explorer les mécanismes d'action. Ces études peuvent donc servir à affiner les expériences en amont des études réglementaires qui devront être réalisées par la suite, en permettant de limiter le nombre global d'animaux utilisés dans le développement d'un produit. Elles peuvent aussi directement contribuer à assurer la sécurité non-clinique des médicaments en comprenant mieux leurs mécanismes. Pour répondre à ces questions il n'existe à ce jour pas de méthode alternative *in vitro*, en raison notamment de la complexité que représente un organisme vivant.

Selon les homologues avec l'homme, le primate non humain peut être la seule espèce appropriée pour ces essais. Dans tous les cas, l'usage du primate est raisonné, avec l'ambition d'atteindre les objectifs avec un nombre d'animaux minimal mais suffisant. Lorsqu'elles sont réalisées avant le démarrage d'études réglementaires avec des conditions particulières (voie d'administration ou investigations particulières), ces études avec peu d'animaux permettent d'assurer le succès des expérimentations requises par les autorités et qui nécessitent des nombres plus importants d'animaux, en évitant ainsi le risque de devoir les répéter.

En général ces études consistent en l'administration d'un produit pharmaceutique chez le macaque crabier ou le macaque rhésus. La fréquence et la durée d'administration sont variables en fonction des composés à tester, de l'objectif de l'étude, et de l'application chez l'homme. La voie d'administration est celle utilisée chez l'homme (orale, application dermale, intraveineuse, intra articulaire, etc.). Lorsqu'il s'agit de valider des techniques particulières, un soluté physiologique ou un produit de référence peuvent être utilisés au lieu d'un composé pharmaceutique à tester.

Le nombre d'animaux utilisé dans le cadre de ce projet est très variable selon le protocole expérimental. Il est déterminé à minima afin d'obtenir des résultats robustes et ainsi d'atteindre tous les objectifs spécifiques de l'étude en procédant à toutes les analyses nécessaires sur un nombre d'animaux optimisé. Il est attendu d'utiliser au maximum 320 macaques crabiers et 72 macaques rhésus sur les 5 ans de la durée du projet. 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 intra vitrée par exemple), 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).

2405- Dans le contexte actuel des changements globaux, il paraît essentiel de connaître les limites de la flexibilité phénotypique des espèces vivantes afin d'appréhender les effets des variations environnementales sur la survie des espèces. Parmi les facteurs impliqués dans les capacités de résilience des espèces, le maintien de la stabilité génomique (en particulier par des processus de réparation somatique) est crucial, faisant de la fonction télomérique un paramètre clé dans la survie des espèces. Ceci est d'autant plus vrai chez des espèces hibernantes, caractérisées par une très grande discrimination entre les phases de repos métabolique hivernales et les phases estivales de reproduction. En effet, il a été démontré que la longueur des télomères varie de manière saisonnière en fonction de l'état physiologique d'une espèce hibernante, affectant ainsi potentiellement les processus de réparation somatique et le vieillissement.

Nous proposons d'étudier le rôle de la fonction télomérique chez un prosimien qui présente des variations saisonnières extrêmement marquées dans ses paramètres tant comportementaux que physiologiques, comme pour la masse corporelle par exemple. L'expression de la torpeur journalière, utilisée de manière extensive en saison hivernale pour faire face aux périodes de faible disponibilité en nourriture et en eau, témoigne de l'extrême flexibilité de l'organisme vis-à-vis des conditions

externes. Certains chercheurs considèrent même que ce mécanisme serait à l'origine de la grande longévité de cette espèce. En effet, ce prosimien peut atteindre l'âge de 12 ans, ce qui est tout simplement exceptionnel comparativement à sa taille. Cette grande longévité en fait un modèle primate majeur d'étude du vieillissement de par l'émergence avec l'âge de déficiences comportementales et endocriniennes ayant de fortes similitudes avec le vieillissement humain.

Ce projet de recherche vise donc à répondre aux questions suivantes :

- Existe-il une variation saisonnière de la longueur des télomères chez un prosimien saisonnier ?

- L'effet de l'âge sur la fonction télomérique est-il dépendant de la saisonnalité?

Afin de répondre à l'exigence de réduction du nombre d'animaux mais assurer tout de même un pouvoir statistique suffisant, ces expériences seront réalisées sur un nombre maximal de 12 animaux par groupe expérimental. Ainsi, 48 animaux au total (12 mâles adultes de 2 à 4 ans puis 12 mâles âgés de 5 à 7 ans; 12 femelles adultes de 2 à 4 ans puis 12 femelles âgées de 5 à 7 ans) seront suivis longitudinalement et sur lesquels deux types de prélèvements seront réalisés:

- Un prélèvement urinaire pour mesurer le niveau du stress oxydatif

- Un prélèvement sanguin à partir duquel sera mesurée la longueur des télomères.

Ces deux prélèvements seront réalisés sur le même animal à deux périodes différentes de l'année, une première fois en fin d'été et une seconde fois au milieu de l'hiver, pour tester l'effet de la saison.

Le but de ce projet étant de suivre les modifications physiologiques spontanées qui apparaissent au cours de l'année chez cette espèce, une grande attention sera apportée pour préserver au maximum l'animal dans ses conditions habituelles d'hébergement en essayant d'être le moins intrusif possible. L'indicateur privilégié pour le suivi du bien-être de l'animal sera les variations anormales de masse corporelle. Dans le contexte saisonnier, les variations de poids peuvent aller jusqu'à 10% de variation en une semaine. Une perte de poids sera considérée comme pathologique à partir du moment où ce seuil sera dépassé. Ce critère sera pris en compte avec d'autres critères comme la prostration, l'état de forme général de l'animal (réactivité, agressivité, etc). Enfin, un maximum d'attention sera également apporté à la maîtrise des techniques utilisées afin de limiter au maximum le stress et la douleur chez les animaux expérimentés.

2406- Le choc cardiogénique est lié à une défaillance du cœur (principalement suite à un infarctus) entraînant des désordres de la circulation sanguine (hémodynamique) et ainsi des problèmes métaboliques et viscéraux. C'est une pathologie fréquente dans les services de réanimation et malgré les progrès de la prise en charge, sa mortalité reste élevée (50 %).

Actuellement, il n'existe aucune étude s'intéressant au niveau optimal de pression artérielle moyenne (PAM) lors de la prise en charge du choc cardiogénique sous assistance circulatoire totale. Basées sur les données du choc septique, les recommandations internationales sur le monitoring hémodynamique donnent un objectif de PAM à 65 mmHg, alors que le consensus Allemand-Autrichien recommande une PAM entre 65-75 mmHg. Des objectifs de PAM plus élevés (85 mmHg) pourraient améliorer la microcirculation des patients en choc cardiogénique compliqué de syndrome d'ischémie-reperfusion. Nous proposons d'étudier l'impact de l'objectif de pression artérielle moyenne (bas ou haut) sur la microcirculation dans un modèle animal de choc cardiogénique ischémique sous assistance artério-veineuse totale.

Le modèle animal de cochon est utilisé pour sa similitude avérée, en terme d'hémodynamique et de morphologie cardiaque, avec les processus physiologiques rencontrés en clinique.

Ce projet utilisera 24 cochons (poids = 50-60kg). Sous anesthésie générale, le cochon sera placé en choc cardiogénique suite à un infarctus provoqué par l'occlusion d'une artère coronaire puis placé sous assistance circulatoire. Alors 3 groupes d'animaux seront établis afin de tester le niveau optimal de PAM (basse = 50mmHg ; standard = 70mmHg et haute = 80mmHg). Les objectifs de PAM seront atteints avec une injection de noradrenaline. Différents paramètres permettant d'apprécier la microcirculation et la récupération cardiaque seront évalués.

Nous avons établi des points limites qui ne seront pas dépassés grâce aux procédures médicamenteuses disponibles au laboratoire (analgésie contrôlée, anesthésie chirurgicale).

Ce modèle est déjà en place dans notre structure permettant de réduire le nombre d'animaux. Ainsi, le nombre d'animaux serait de n=24 (comprenant une mortalité prématurée maximale de 30%) permettant ainsi une étude statistiquement exploitable.

Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (établissement points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique permettent ainsi un raffinement de la méthodologie.

2407- Ce projet a pour but d'évaluer les effets de différents candidats médicaments sur les paramètres cardio-vasculaires chez la souris vigile en utilisant la télémétrie. La télémétrie permet de mesurer différents paramètres physiologiques chez l'animal vigile non contraint.

Au cours de chaque étude, les souris, une fois instrumentées, sont traitées avec le candidat-médicament testé à 3 ou 4 doses différentes ou avec un véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée. Chaque animal reçoit tous les traitements et un total de 8 animaux est prévu par étude. Pour ce projet, il est prévu un nombre maximum de 400 animaux sur 5 ans.

Ce projet est réalisé sur le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences in vitro) pour évaluer les effets d'un candidat médicament sur la fonction cardio-vasculaire. A ce jour, la souris est une des espèces rongeurs qui est la plus adaptée pour évaluer les effets de certains candidats médicament. Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux

suffisant pour réaliser une analyse statistique (Règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement). Les mêmes animaux sont utilisés pour évaluer toutes les doses de produit.

Dans ce projet, le raffinement est effectué par la mise au point de procédures rigoureuses, la formation du personnel, un suivi quotidien de l'état de santé des animaux, le recours à des procédures peu invasives, la recherche des points limites, le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire, un suivi quotidien de l'état de santé des animaux ainsi que les soins post-opératoires suite à l'instrumentation, l'utilisation de la technique de télémetrie permettant de mesurer en continu des paramètres physiologiques sur animal vigile non contraint.

2408- L'objectif du projet est de mettre en place des modèles d'accident vasculaire cérébral (AVC) chez la souris, afin de tester, *in vivo*, des approches thérapeutiques innovantes pour réduire l'infarctus cérébral à la phase aiguë de l'ischémie/reperfusion dans le but de l'appliquer chez l'homme. Les AVC représentent la 3ème cause de mortalité chez l'adulte en France. La prévalence du diabète de type 2 à la Réunion est 3 à 4 fois plus importante qu'en métropole et la surmortalité associée y est 3,5 fois plus importante. L'augmentation des facteurs de risque (obésité, surpoids, sédentarité, mauvaise alimentation) laisse présager une augmentation de la prévalence du diabète à la Réunion. L'hyperglycémie à la phase aiguë de l'infarctus cérébral est un facteur reconnu de mauvais pronostic associé aux complications hémorragiques. Elle représente également une contre-indication (Glu>400mg/ml) à l'administration de thrombolyse en raison de ce risque de transformation hémorragique de la zone infarctée.

Nous souhaitons mettre en place deux modèles permettant de reproduire un accident vasculaire cérébral ischémique :

- par un monofilament, qui permet de contrôler le moment de la reperfusion,
- thrombo-embolique, par injection d'un thrombus autologue, plus proche de la physiopathologie, mais dont la reperfusion ne peut pas être contrôlée.

2409- Le modèle au monofilament permet d'étudier le phénomène d'ischémie/reperfusion car le temps d'occlusion de l'artère peut être contrôlé (de 90 minutes à 4 heures en fonction de la taille d'infarctus voulue).

Pour le modèle thrombo-embolique, l'injection d'un caillot de sang autologue est réalisée sans contrôle de la reperfusion.

Dans les deux modèles, la réussite du geste opératoire sera évaluée à 24 heures par détermination du volume d'infarctus à l'aide d'un colorant vital (les zones nécrosées ne sont pas colorées), nécessitant le sacrifice de l'animal.

La mise en place des modèles nécessite des microscopes chirurgicaux. Deux opérateurs seront formés dans le cadre du projet micro-chirurgie.

Dans un premier temps, les opérateurs s'entraîneront sur des cadavres pour la dissection de la carotide commune. Par la suite, le projet nécessitera 5 souris par opérateur pour la partie de mise en place du monofilament et l'injection du thrombus (soit 20 souris), qui ne seront pas réveillées. Dans une deuxième phase, 10 souris par modèle seront réveillées puis sacrifiées à 24 heures pour évaluer la variabilité du volume d'infarctus (total de 40 souris).

Nous réaliserons par la suite une deuxième procédure consistant en la réalisation, de façon reproductible, d'une lésion de type AVC ischémique droit sur des lignées de souris différentes (hyperglycémie aiguë après injection intra-péritonéale de G30% chez des WT, Db/Db et WT). Le nombre de souris nécessaire sera de 10 par groupe, soit 30 souris.

Enfin une troisième procédure sera mise en place avec l'étude sur le modèle monofilament (MCAO) de l'effet bénéfique de l'injection d'HDL (high density lipoprotein), en intra carotidien chez les différentes lignées de souris étudiées dans la procédure 2 (WT avec hyperglycémie et WT), sur la taille des lésions ischémiques ainsi que sur les risques de transformation hémorragique. Dans cette procédure 30 souris seront nécessaires (10 par groupe avec un groupe contrôle).

Au total 100 animaux seront nécessaires afin de mettre au point les modèles.

Durant les phases de surveillance post-opératoire la souffrance des animaux sera évaluée. Pendant l'heure qui suit la chirurgie, l'animal sera observé : son comportement, son activité (s'il est isolé, passif), sa posture (s'il est prostré), son pelage (s'il est hérissé, s'il y a perte de poils), sa respiration (si le rythme est rapide ou saccadé), les mouvements qu'il effectue. En cas de signe de souffrance nous augmenterons la dose d'analgésique buprénorphine à 0.1mg/kg. Si le traitement ne suffit pas et qu'une souris est en décubitus latéral avec une détresse respiratoire, elle sera euthanasiée par dislocation cervicale. De plus les souris bénéficieront d'un enrichissement de leur environnement (cages individuelles en post chirurgie) afin de limiter leur stress et anxiété (abris en polycarbonate de couleur rouge leur offrant un abri obscur et permettant leur surveillance, musique, croquettes d'alimentation préalablement hydratées afin de faciliter leur assimilation)

2410- La pollution lumineuse est due aux éclairages artificiels nocturnes. Ce phénomène est en expansion en raison du développement des zones urbaines et des réseaux de transport. De part les processus physiques de diffusion de la lumière, le phénomène touche en réalité la majeure partie de la France métropolitaine et de l'Europe. La modification de la photopériode altère le rythme d'activité journalier mais également la production de mélatonine. Cette molécule est centrale dans la synchronisation des rythmes biologiques avec la photopériode et joue un rôle plus direct dans de nombreuses régulations (métabolisme, système immunitaire, stress oxydatif). On ne connaît actuellement que peu de chose sur les conséquences physiologiques de la pollution lumineuse chez les organismes, notamment chez les espèces nocturnes. Les premiers stades de développement, en particulier chez les organismes présentant une phase larvaire autonome, sont potentiellement très exposés. Les amphibiens constituent d'une manière générale un groupe au statut de conservation défavorable dont les populations sont affectées par la perte d'habitat, les contaminants chimiques ou encore certains pathogènes. Etant donné le faible niveau de connaissances actuelles sur les effets de la pollution lumineuse, il est important d'évaluer les risques liés à ce stress environnemental pour ce groupe. En conséquence, le projet se propose de quantifier la perturbation causée par la

pollution lumineuse lors du développement chez une espèce d'amphibien commune. Cette première expérience vise à développer une approche dose-réponse en utilisant comme proxy des marqueurs biométriques et endocriniens. Les têtards sont élevés depuis le stade œuf jusqu'au dernier stade larvaire sans autre intervention que celles nécessaires pour le soin. Elles sont nourries quotidiennement et la qualité du milieu est assurée par des changements d'eau régulier. La température est constante à un niveau naturellement rencontré en condition naturelle. Les intensités et le spectre lumineux nocturnes et diurnes ne conduisent à aucun effet délétère direct. Aucune procédure induisant directement une souffrance avérée n'est utilisée. La perturbation physiologique attendue ne doit pas non plus entraîner d'effets susceptibles de générer de la douleur. On s'attend à ce qu'elle modifie les capacités de résistance de l'individu aux stress en conditions naturelles après la métamorphose. Ces conditions ne sont pas rencontrées au laboratoire. En outre, l'expérience ne mesure pas cette question directement et s'arrête avant la métamorphose. Au total, 405 individus seront testés dans cette expérience.

2411- L'objectif de ce projet est de déterminer l'impact du premier fluide issu de la glande mammaire, appelé colostrum, sur la maturation du système immunitaire en début de vie, et, à l'âge adulte, la régulation des réponses immunitaires et le métabolisme lipidique et glucidique. Les implications de ce projet sont la prévention des allergies et de l'obésité avec ses complications telles que le diabète par des approches nutritionnelles en début de vie. Cet objectif est important en terme de santé publique car ces maladies sont chroniques, sans traitement curatifs disponibles et touchent une proportion croissante de la population dans les pays industrialisés (30 % souffrent d'allergie et 10% de diabète).

Ce projet est justifié sur le plan scientifique car, si l'impact du lait maternel sur la santé est bien étudié, très peu de données sur l'impact du colostrum sur la santé sont disponibles tant chez l'homme que chez l'animal. De plus, dans plus de la moitié des cas, les mères qui souhaitent allaiter, ne donneront néanmoins que partiellement le colostrum à leur nouveau-né et donc, il est important de connaître les conséquences d'un défaut d'administration de colostrum. La composition du colostrum a été étudiée et suggère des effets bénéfiques par sa teneur élevée en anticorps, en facteur de croissance, en vitamines telles que la vitamine A, en oligo-éléments tels que le Zinc ou encore oligosaccharide. Il est par contre plus pauvre en lactose et lipides. La composition du colostrum semblerait dès lors particulièrement adaptée à apporter les molécules nécessaires au développement du nouveau-né. Cela doit cependant être démontré dans des études in vivo.

Nos résultats obtenus dans le cadre d'un projet accepté, ont démontré que les souris privées de colostrum avaient un défaut de prise de poids et une susceptibilité accrue aux allergies. Nous souhaitons dans ce projet déterminer par quels mécanismes le colostrum induit ses effets protecteurs et étendre notre analyse aux maladies métaboliques.

Ces expériences nous permettront de démontrer si le colostrum exerce des effets bénéfiques à court et long terme sur les réponses immunitaires et sur le métabolisme et si des compléments nutritionnels peuvent exercer des effets similaires. La réalisation de ce projet visera à respecter rigoureusement la règle des 3R. Réduction : en nous basant sur des données bibliographiques et notre expérience sur les modèles expérimentaux murins, nous avons établi que pour ce projet nous utiliserons un maximum de 828 souris pour une période de 3 ans. En utilisant les souris femelles pour l'analyse des réponses allergiques et les souris mâles pour les réponses métaboliques, nous réduirons le nombre d'animaux nécessaires en utilisant à la fois les femelles et les mâles issus des portées ; notre expérience dans les modèles d'études d'allergie et de diabète nous permet d'utiliser des protocoles reproductibles et de calculer le nombre adapté d'animaux pour obtenir des résultats concluants. Nous répéterons dans un deuxième temps sur les sexes opposés uniquement les expériences dont les résultats sont concluants. Raffinements : les conditions d'hébergement des souris sont optimisées pour minimiser le stress des animaux et le statut sanitaire des zones où nos animaux sont hébergés permet une très bonne reproductibilité des observations. Une grande partie des analyses expérimentales se fait sur des animaux euthanasiés. Nous évaluerons le comportement des souris et leur signe de souffrance tout au long de notre expérimentation au minimum 2 fois par semaine. Un point limite précoce a été établi pour les expériences qui pourraient être associées à un inconfort comme l'induction de diarrhée allergique. L'euthanasie des souriceaux a été adaptée à leur résistance à l'anesthésie gazeuse et se fait exclusivement par injection létale de barbituriques. L'isolement des souris sera réalisé pour une durée limitée avec une surveillance très proche de la souris pour les études métaboliques. Des mesures d'enrichissement sont prises de façon systématique, telles que l'ajout d'igloo et de coton dans les cages. Enfin, des mesures de remplacement sont d'ores et déjà établies car nous développons en parallèle une étude chez le nouveau-né prématuré humain du rôle bénéfique du colostrum à court terme sur sa croissance et les risques de maladies infectieuses en cours d'hospitalisation. Les études chez la souris restent à ce stade indispensables car elles nous apporteront en plus des informations sur les conséquences à long terme de l'apport de colostrum et sur les mécanismes d'action du colostrum.

2412- La malnutrition désigne un état pathologique causé par la carence (sous-nutrition) ou l'excès d'un ou de plusieurs nutriments (sur-nutrition). Elle peut être provoquée par un apport alimentaire insuffisant, un déséquilibre de la balance nutritive, ou à une altération de la digestion et une mal absorption des nutriments.

Actuellement, la sous-nutrition est considérée comme un problème de santé majeure dans les pays à faible revenu. En effet, la sous-nutrition chronique, notamment chez les enfants, affecte la santé de l'hôte et son développement (un retard de croissance juvénile sévère). La sous-nutrition n'est pas simplement provoquée par une carence alimentaire mais résulte également d'une interaction complexe « environnement-hôte » et est souvent associée à un changement significatif dans la composition du microbiote intestinal (dysbiose) et de sa fonctionnalité. Les essais cliniques ont montré, que une intervention nutritionnelle thérapeutique seule est insuffisante pour restaurer un microbiote intestinal sain et améliorer l'état de santé des enfants sous-nourris, montrant ainsi la nécessité de comprendre le rôle du microbiote dans la régulation de l'homéostasie de l'hôte et d'identifier les causes de son dysfonctionnement qui peuvent contribuer à la malnutrition.

Le microbiote intestinal peut être modulé par plusieurs facteurs comme dans le cas de l'utilisation de certains médicaments, des nutriments ou même des bactéries lactiques de type lactobacille (gram-positif). Des données récentes ont montré le rôle important de ces dernières dans le maintien de l'équilibre du microbiote intestinal et de l'homéostasie de l'hôte. De plus, nos données au laboratoire ont permis de mettre en évidence un rôle bénéfique de certaines souches de lactobacille sur la promotion de la croissance chez des larves de drosophile et chez la souris monosémique (dont le microbiote intestinal est réduit à une unique souche bactérienne) mises sous carence nutritionnelle. Ces résultats sont intrigants d'autant plus qu'une baisse de la population des lactobacilles est observée dans le microbiote des souris conventionnelles mises sous régime carencé.

De ce fait, nos résultats suggèrent fortement que ces micro-organismes pourraient être utilisés comme un probiotique pour traiter la malnutrition et les pathologies qui y sont associées notamment le retard de la croissance juvénile.

Ces observations légitiment la réalisation d'une étude scientifique qui devrait permettre de mieux comprendre:

- 1) les relations entre la sous-nutrition et le retard de croissance,
- 2) l'impact de la sous-nutrition sur la composition du microbiote intestinal dans un contexte génétique spécifique,
- 3) d'évaluer les effets bénéfiques de souches de lactobacilles, dont la fonctionnalité a été qualifiée à l'aide du modèle drosophile, sur la restauration de la dysbiose intestinale ainsi que le retard de croissance observé chez les souris juvéniles.

Nous pensons que notre étude va identifier un rôle important de l'utilisation de souches de lactobacilles sélectionnées qui, combinée à une thérapie nutritionnelle, va permettre d'améliorer l'état de santé de l'hôte (ex: restauration du retard de croissance juvénile) dans des conditions de malnutrition chronique. Cette dernière est connue pour toucher actuellement plus de 160 millions d'enfants âgés de moins de 5 ans dans les pays à faible et moyen revenu.

Nous prévoyons l'utilisation d'un maximum de 384 souris sur une période de 3 ans tout en respectant les règles des 3R : en utilisant le nombre d'animaux à minima dans notre étude et tout en respectant leur bien-être et en soulageant leur douleur si elle est provoquée. Ce nombre de souris nous permettra de tester l'effet protecteur du probiotique *Lactobacillus* sur l'équilibre entre les différentes communautés microbiennes et contre le développement du retard de croissance provoqué par le régime de sous-nutrition. L'utilisation d'animaux est essentielle parce que les interactions entre microbiote et hôte ne peuvent pas être étudiées *in vitro*. La validation des résultats obtenus chez la *Drosophile* à l'aide d'un organisme modèle mammifère comme la souris est nécessaire afin d'envisager la transposition de nos découvertes chez l'homme.

2413- Le marqueur CD45RC permet de distinguer les cellules effectrices des cellules régulatrices. En effet, les lymphocytes T (LT) CD4+ et CD8+ exprimant faiblement le marqueur CD45RC ont des propriétés immunosuppressives alors que les cellules exprimant fortement ce marqueur ont un profil effecteur. Ainsi, l'élimination des cellules effectrices par le ciblage du marqueur CD45RC à l'aide d'un anticorps permettrait, en agissant sur la balance du système immunitaire, de maîtriser les réponses immunes contre le greffon lors d'une greffe d'organe solide et les réactions du greffon contre l'hôte (GVH) lors de greffes de cellules hématopoïétiques.

L'objet de cette saisine est d'évaluer le potentiel thérapeutique d'un anticorps anti-rat CD45RC dans un modèle de GVH allogénique et un modèle d'allogreffe de cœur chez le rat.

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

- Remplacer : Des études fonctionnelles ont été réalisées *in vitro*, 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*.

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit au 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 escomptés pour la mise au point du modèle de GVH au laboratoire est de 48, pour le test de thérapie dans le modèle de greffe 120, et pour le test de thérapie dans le modèle de GVH 100. L'anticorps sera testé dans le modèle d'allogreffe cardiaque dans un premier temps et si, et seulement si les résultats sont positifs, nous mettrons au point le modèle de GVH puis nous testerons le traitement de la GVH par l'anticorps.

- 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 à Jour 10 pour valider la déplétion des cellules par l'anticorps. 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 l'infiltration des cellules dans les tissus inflammés.

Les résultats obtenus permettront d'établir une preuve de concept quant à l'utilisation d'un anticorps ciblant la molécule CD45RC dans les réponses inflammatoires. Ainsi, nous déterminerons le potentiel thérapeutique de l'anticorps anti-CD45RC sur les réponses immunes intervenant dans des contextes de GVH et d'allogreffe, la durée de traitement nécessaire et suffisante à envisager pour un traitement chez l'Homme, et les mécanismes d'action de l'anticorps sur les cellules. Cette étude est soutenue par l'INSERM transfert, l'anticorps anti-CD45RC faisant l'objet d'un brevet 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.

2414- Les cancers de la peau non mélanocytaires sont les cancers les plus fréquents chez l'adulte. Ces cancers se développent à partir des cellules de l'épiderme appelées kératinocytes et sont également appelé carcinomes épidermoïdes cutanés.

L'incidence de ces tumeurs kératinocytaires augmente fortement chez les personnes exposées au soleil tout au long de leur vie, mais également avec le tabagisme et certaines infections virales. La majorité des tumeurs se développe sur le visage et les mains.

Les carcinomes épidermoïdes cutanés sont résistants aux traitements conventionnels de types chimiothérapie ou radiothérapie, le traitement de référence restant aujourd'hui la chirurgie. Ce traitement présente un préjudice esthétique plus ou moins important en fonction de la taille et de la localisation des tumeurs, et ne permet pas le traitement des métastases. La recherche d'autres traitements pour ces carcinomes est donc un défi important.

De nombreuses études ont démontré qu'il existe un lien très fort entre l'inflammation et le cancer. Dans les conditions physiologiques, l'inflammation est un processus bénéfique qui, à la suite d'une infection ou d'une blessure, permet à l'organisme d'éliminer les pathogènes et de réparer les tissus endommagés. Si le système immunitaire joue un rôle dans le contrôle de l'évolution des tumeurs, dans certains cas les cellules tumorales peuvent détourner les médiateurs de l'inflammation sécrétés par les cellules du système immunitaire pour promouvoir leur croissance et leur vascularisation.

Notre laboratoire étudie le rôle de médiateurs sécrétés par les cellules du système immunitaire, les cytokines pro-inflammatoires, sur les kératinocytes afin de mieux comprendre leurs implications dans la croissance tumorale.

Nous avons montré sur des modèles de culture cellulaire qu'une de ces cytokines, l'oncostatine M (OSM) était capable de moduler l'activation, la migration et la différenciation cellulaire, qui sont des étapes fondamentales dans les mécanismes de développement tumoral.

Nous prévoyons maintenant d'étudier le rôle joué par cette cytokine dans le développement tumoral in vivo. Pour cela nous avons déjà modélisé, chez la souris, le développement des cancers de la peau par injections de kératinocytes malins en sous-cutané et nous allons maintenant étudier l'implication de l'Oncostatine M dans le développement tumoral.

Un total de 720 souris sera nécessaire pour mener à bien l'ensemble du projet. La « Règle des 3 R » établie par Russel et Burch, a été prise en compte afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude interprétable sur le plan statistique. La notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation et d'élevage qui sont optimisées (hébergement en groupe, nid, enrichissement, sédation et/ou analgésie pour toute manipulation douloureuse ou stressante ...) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales. Cette étude ne peut pas être remplacée car elle fait suite à des études réalisées in vitro et il est maintenant indispensable de prendre en compte in vivo le microenvironnement global des cellules tumorales.

Ces travaux pourraient permettre de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des carcinomes épidermoïdes cutanés. En effet, les thérapies anti-cytokines, à l'aide d'anticorps bloquant par exemple, sont actuellement en plein essor pour de nombreuses pathologies inflammatoires et tumorales et donnent des résultats remarquables.

2415- Les maladies cardiovasculaires sont une des causes de mortalité principales en France. Les dyslipidémies contribuent au développement de l'athérosclérose, un élément important de ces maladies. Parmi les déséquilibres observés figurent un excès de LDL-cholestérol ou un défaut de la voie antiathérogène du HDL-cholestérol, qui peuvent se résumer à un défaut d'élimination du cholestérol. L'excrétion trans-intestinale directe du cholestérol (TICE) est une nouvelle voie d'élimination du cholestérol, complémentaire à la voie hépatobiliaire. Cette voie reste à ce jour très mal caractérisée et représente un espoir dans le développement de nouvelles thérapies et la compréhension du mode d'action de cette voie est une étape initiale cruciale. De nombreuses études réalisées chez la souris ont permis d'apporter quelques éclaircissements dans la compréhension du mode d'action de cette voie. Cependant ce modèle présente certaines limites anatomiques et métaboliques par rapport à la physiologie humaine. Le porc constitue un modèle plus proche de l'anatomie intestinale humaine et du métabolisme du cholestérol humain.

Le but de notre programme de recherche est de mettre en place un nouveau modèle de mesure du TICE chez le porc via l'utilisation d'un cholestérol fluorescent qui sera visualisé par endomicroscopie confocale.

Le nombre total d'animaux requis pour réaliser ce protocole est de neuf. Trois seront nécessaires pour faire la preuve de l'efficacité de la méthode et optimiser les doses à injecter. En cas d'échec de cette première partie, le projet sera interrompu. Dans le cas contraire, nous réaliserons une étude complémentaire pour valider l'inductibilité du TICE dans ce modèle : nous testerons l'effet des statines (un médicament hypolipémiant connu pour activer le TICE chez la souris). Nous mesurerons le TICE sur six porcs avant le traitement. Après une semaine de récupération, les porcs recevront un traitement quotidien de statines (Atorvastatine : 80mg/j) pendant 15 jours, une seconde mesure du TICE sera réalisé à l'issu de cette période.

Ce projet a été construit avec la volonté de mettre en place et de respecter « la règle des 3 R ». Seules les expériences absolument indispensables au succès du projet seront mises en œuvre. Le nombre d'animaux nécessaires pour chaque expérimentation a été défini statistiquement. De façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, les animaux du groupe expérimental seront leur propre contrôle. Les procédures ont été réfléchies afin de réduire au maximum le stress et les souffrances des animaux soumis aux expérimentations. Ainsi toutes les procédures de ce projet sont réalisées chez des animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur sera donné si besoin en fonction de la procédure. Enfin, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes ex vivo / in vitro de remplacement à l'expérimentation animale mais nous maintenons nos efforts pour développer des méthodes alternatives notamment via la mise en place de lignées cellulaires intestinales compétentes pour le TICE.

2416- L'alimentation a un impact direct sur la santé du consommateur et plus particulièrement sur le développement de maladies cardiovasculaires qui représentent la première cause de mortalité dans le monde. Des composants naturels présents dans certains aliments ont un impact positif sur la santé et suscitent un intérêt scientifique et commercial important. A ce titre, les protéines laitières présentent non seulement un rôle nutritif important en terme d'apport en macro- et micro-nutriments, mais elles sont aussi la source principale de peptides bioactifs qui sont porteurs de nombreuses activités telles que des activités antihypertensives, anti-oxydantes, hypocholestérolémiantes ou encore anxiolytiques. L'enrichissement du bol alimentaire par ces composants bioactifs permettrait d'obtenir des aliments dits fonctionnels qui, au-delà de leur rôle nutritionnel, pourraient maintenir et promouvoir, dans le cadre d'une alimentation équilibrée, le capital-santé et le bien-être humains en permettant de réduire, entre autres, le risque cardiovasculaire.

Alors que de nombreuses études scientifiques effectuées avec des modèles cellulaires ont montré un effet positif de ces molécules, l'évaluation de ces effets sur la santé *in vivo*, de leur biodisponibilité ainsi que la compréhension de leur mode d'action reste limitée. Dans l'idée de pouvoir commercialiser ces peptides sous forme d'aliments fonctionnels pour l'homme, des études chez l'animal sont nécessaires. L'objectif principal du projet VASC_PEPT est donc d'évaluer l'impact de ces molécules issues du lait sur la réduction du risque cardiovasculaire de manière préventive dans un modèle animal (souris).

Ce travail sera effectué durant 10 semaines sur 48 souris mâles âgées de 3 mois : 2 groupes de 12 souris chacun recevront un régime standard, dans lequel les graisses ne représentent que 10% de l'apport calorique quotidien (sous forme de poudre), contenant ou pas les molécules bioactives et 2 groupes de 12 souris chacun recevront un régime riche en graisses représentant 60 % de l'apport calorique quotidien (sous forme de pâte), contenant ou pas également les mêmes principes bioactifs. Les peptides bioactifs seront mélangés à l'alimentation propre à chaque groupe. Etant donné la teneur importante en lipides dans le régime riche en graisses, la commercialisation de cet aliment sous la forme solide de croquettes n'est pas envisageable, seule une pâte peut être obtenue. Pour des raisons 1) d'uniformité et 2) de facilité d'incorporation des peptides dans l'aliment, le régime standard sera lui aussi donné sous une forme proche du régime riche en graisses. Les animaux seront préalablement habitués à l'apport de nourriture sous cette forme. De plus, les animaux seront hébergés individuellement par cage en milieu enrichi sur toute la durée de l'expérience pour 1) éviter la mise en place d'une hiérarchie de dominance dans la cage du fait du placement d'un récipient contenant l'aliment directement dans la cage et qu'une souris dominante empêche les autres d'accéder à la nourriture, 2) garantir et mesurer la prise quotidienne de nourriture, et 3) s'assurer de l'ingestion complète via la quantité de nourriture mise à disposition de la quantité de peptides bioactifs objets de l'étude. Cette expérimentation animale permettra, grâce à un suivi du poids des animaux, de la pression artérielle mesurée par plethysmographie et de la quantification des paramètres biochimiques (sur un échantillon de sang prélevé par voie mandibulaire tous les 15 jours, soit 6 prélèvements au cours de la période expérimentale), d'évaluer l'impact de ces molécules bioactives sur le développement du risque cardiovasculaire lié au régime alimentaire riche en graisses.

Par ailleurs, l'hypertension artérielle qui apparaît avec un tel régime alimentaire présente non seulement un risque pour le système cardiovasculaire, mais présenterait aussi un risque pour la mémoire, l'apprentissage ainsi que pour la santé mentale. De récentes études indiquent que les médicaments antihypertenseurs pourraient agir contre la dégradation des capacités cognitives. Ainsi, l'objectif secondaire de cette étude portera sur l'évaluation des effets comportementaux d'un régime riche en graisses, supplémenté ou non de peptides bioactifs, sur l'apprentissage spatiale à court terme ainsi que la mémoire de travail, sur l'anxiété et sur l'activité locomotrice. Pour cela, les animaux seront soumis respectivement aux tests suivant : le labyrinthe en Y, la piscine de Morris, le labyrinthe en croix surélevée et l'openfield. Ces tests comportementaux seront réalisés au terme des 10 semaines de régime standard ou riche en graisses additionnés ou non des peptides bioactifs. Les animaux seront mis à mort à l'issue du dernier de ces tests pour permettre le prélèvement des différents tissus sur lesquels seront évalués les effets des peptides ajoutés à l'alimentation par rapport à ceux du régime riches en graisses.

Ce type d'étude ne peut être réalisée que sur des animaux vivants, seul niveau d'organisation permettant d'évaluer le bénéfice de ces composants alimentaires sur la prévention du risque cardiovasculaire lié à l'état nutritionnel et l'âge (Remplacement). L'étude sera réalisée avec 48 souris réparties en 4 groupes de 12 souris chacune, nombre minimum nécessaire à l'évaluation de l'efficacité de ces produits (Réduire) tout en évitant le recours à un nombre excessif d'animaux (Raffinement). Enfin, la prise en compte de points limites appropriés permettra de juger du bien-être et d'éviter l'inconfort des animaux au cours de l'expérimentation de manière à garantir la qualité des résultats, le stress et le mal-être étant des facteurs connus de risque cardiovasculaire (Raffinement).

2417- Les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) sont des cancers agressifs du sang qui surviennent chez les enfants et les adultes. Bien que des médicaments aient été développés pour traiter cette maladie, dans certains cas la leucémie rechute sous une forme qui n'est pas curable et qui finit par être fatale. Au cours de ces dernières années, la communauté scientifique a découvert que les LAL- T dérivent des cellules souches leucémiques, c'est-à-dire des cellules qui favorisent la croissance de la leucémie et la résistance aux traitements. Ces cellules souches leucémiques prolifèrent de manière incontrôlée, en provoquant la maladie et la résistance aux thérapies conventionnelles. Pour guérir les LAL- T d'une manière définitive et éviter la rechute il est donc très important de développer de nouveaux traitements qui sont capables de tuer les cellules souches leucémiques. Notre objectif est de vérifier si le métabolisme des lipides régule la formation des cellules souches leucémiques. Cet étude nous permettra de développer de nouvelles thérapies qui, en ciblant le métabolisme des lipides, éradiquent les leucémies et préviennent la résistance aux médicaments et les rechutes. Pour atteindre cet objectif, nous allons utiliser des souris qui sont génétiquement modifiées et qui développent la maladie qui se vérifie dans les patients. Ces souris seront traitées avec une drogue qui inhibe le métabolisme des lipides. Successivement, nous vérifierons si ces traitements

empêchent la formation des cellules souches leucémiques murine. Puisque ces cellules sont définies par leur capacité à développer la leucémie murine dans trois générations successives des souris, nous allons vérifier si les traitements empêchent le développement de la leucémie.

Pour atteindre l'ensemble de ces objectifs nous effectuerons d'abord des expériences préliminaires in vitro, qui nous permettront de remplacer les animaux par des systèmes cellulaires in vitro et ainsi de réduire le nombre d'animaux. Au total, 340 souris seront utilisées. Nous serons aussi très attentifs au bien-être des animaux. Afin de ne pas causer de douleur aux animaux, l'euthanasie sera précédée d'une anesthésie générale. Durant les protocoles expérimentaux, un suivi quotidien des animaux sera mis en place afin de surveiller tous les signes évoquant une douleur chez l'animal. Les souris seront sacrifiées dans un stade pré-leucémique c'est-

à-dire quand elles n'ont pas encore développé la leucémie de manière complète. De cette manière, la souffrance due au développement de la maladie sera réduite au minimum

2418- La toxine botulique A (TBA) est une toxine d'origine bactérienne qui bloque la sécrétion des neurotransmetteurs au niveau des terminaisons nerveuses périphériques. Elle a en premier lieu, une action paralysante en bloquant la transmission neuro-musculaire. Elle a aussi une action antalgique. Son utilisation est courante en pratique clinique dans les pathologies musculo-squelettiques.

Les lombalgies d'origine discale sont liées à une néo-innervation intra-discale par des fibres nociceptives (fibres de la douleur). La TBA bloquant la neurotransmission des fibres de la douleur, il est tentant de proposer des injections intradiscales de TBA pour tenter de les soulager. Cependant, le disque intervertébral étant à proximité des espaces médullaires, il convient d'explorer plus avant les répercussions que pourrait avoir une fuite de produit dans l'espace intra-thécal (c'est à dire au contact de la moelle).

Dans ce cadre il a été proposé une série d'études visant à étudier l'effet de l'administration intrathécale de TBA chez l'animal. Une première étude a porté sur l'analyse de la toxicité motrice et sensitive de la TBA en injection intrathécale chez le rat. Les premiers résultats ont révélé un faible effet moteur ainsi que pratiquement pas d'effets généraux, même avec des doses élevées.

Nous proposons maintenant d'analyser les effets vésico-sphinctériens d'une administration intra-thécale de TBA chez le brebis, effets qui ne peuvent être observés chez le rat vigile. Ce modèle animal est pertinent car il procure une possibilité d'analyser des phénomènes de troubles urinaires qui, en dehors des troubles moteurs, pourraient être une conséquence de l'injection de TBA chez les humains.

S'agissant d'un modèle très complexe, il n'existe pas de méthode non animale qui permette de répondre à l'objectif de cette étude. Il s'agit d'une étude de faisabilité qui se limitera à 5 animaux, nombre minimum pour une analyse statistique des résultats. Les animaux seront suivis quotidiennement de façon à détecter d'éventuels effets délétères inattendus.

2419- Compte tenu des souffrances liées à la castration chirurgicale des porcelets mâles, la filière porcine s'est engagée dans une démarche d'abandon de cette pratique d'ici 2018. Une des alternatives proposées est l'élevage de mâles entiers. Cependant, l'élevage de mâles entiers soulève des inquiétudes concernant la qualité de la viande, liée à la présence de défauts d'odeurs (= odeurs sexuelles).

L'objectif de ce projet est de contribuer à mieux comprendre le déterminisme génétique des odeurs sexuelles en lien avec le développement pubertaire des mâles entiers. Les connaissances acquises doivent permettre de trouver des prédicteurs, de type métabolites, qui pourront être utilisés en sélection pour réduire le risque d'apparition des odeurs sexuelles sans pénaliser les performances de reproduction.

Au total, 120 porcs seront mis en expérience. Les mesures sur animal vivant concerneront le développement pubertaire (prises de sang, prises de salive), pour des mesures métaboliques et hormonales, et la concentration en odeurs sexuelles dans le tissu gras, lieu privilégié de stockage des molécules odorantes. Les performances de reproduction seront estimées par la caractérisation de la semence.

Le porc étant l'espèce cible du projet et sachant qu'il s'agit de déterminer la qualité de la viande, il n'est pas envisageable de remplacer cette espèce par une autre. Afin de mesurer avec une méthode de référence le risque d'odeur chez les verrats, sans abattre les animaux, une biopsie de gras dorsal sera réalisée autour de l'âge usuel d'abattage des animaux. Cette mesure de référence sera utilisée pour proposer, à partir des mesures effectuées dans la salive et le sang, des prédicteurs du risque d'odeur. La biopsie sera faite à l'aide d'une méthode récemment élaborée par une équipe de chercheurs suisses et déjà validée par leurs services vétérinaires. Par ailleurs, les procédures de prises de sang et de biopsie seront réalisées par du personnel qualifié en respectant les règles d'hygiène et de sécurité. Sur une partie des animaux, l'utilisation d'information génomique permet de cibler, à partir d'une valeur génomique estimée, les animaux les plus informatifs.

2420- Les études de la pharmacocinétique sanguine, de la distribution tissulaire et de l'élimination de candidats médicaments biologiques représentent une étape essentielle dans le développement d'un médicament. Ces études, demandées par les conseils scientifiques des entreprises clientes, ont pour but la compréhension et l'analyse du devenir du médicament dans l'organisme, d'évaluer une potentielle accumulation de ce dernier dans les organes et/ou tissus et ainsi de pouvoir mieux appréhender d'éventuels effets indésirables.

Ces études in vivo s'inscrivent dans un contexte d'études répétitives car elles seront réalisées selon un même schéma directeur expérimental ayant pour unique objectif l'étude pharmacologique de sélection de candidats médicaments biologiques.

Les variations peuvent porter sur l'espèce animale sélectionnée pour l'évaluation du candidat (rats ou souris), le mode d'administration du candidat, le nombre d'animaux par groupe, le nombre de groupes (différentes doses et/ou différents temps d'euthanasie à analyser)

Ces études in vivo sont menées à partir de l'administration de candidats médicaments préalablement marqués par un isotope radioactif de faible énergie afin de tracer et de quantifier ces candidats dans les différents tissus et fluides biologiques d'intérêt. La radioactivité est administrée à des doses ne présentant aucun effet nocif pour la santé de l'animal.

L'évaluation de la distribution tissulaire et sanguine de 15 à 20 molécules médicaments sera réalisée annuellement, nécessitant un nombre d'animaux total pouvant varier de 180 à 960 rats et/ou souris. Ainsi sur 5 ans, le nombre total d'animaux nécessaires pour l'évaluation de 75 à 100 molécules est de 900 à 4800 rats et souris confondus.

L'ensemble de ces expérimentations in vivo respecte la règle des 3R, comme mentionnée dans la directive européenne 2010/63/UE. En effet, les procédures utilisées ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par des méthodes alternatives in vitro n'impliquant pas des animaux vivants. La précision et la reproductibilité de la méthode de détection radioactive permettent de réduire le nombre d'animaux par groupe tout en prenant en compte la variabilité interindividuelle.

Le respect du bien-être animal passe par des conditions d'hébergement adéquates, un suivi quotidien des animaux, des méthodes utilisées visant à réduire le plus possible toute forme de douleur, souffrance ou stress de l'animal ainsi que l'instauration de points limites pertinents et précoces.

Enfin, les milieux d'hébergement sont enrichis avec du papier accordéon pour faciliter la nidation (souris) ou des tunnels rouges (rats).

2421- L'ostéoporose est une maladie se caractérisant par un dérèglement du métabolisme et du calcium qui se caractérise par une masse osseuse diminuée, un risque accru de fragilité osseuse et un risque de fracture. La perte osseuse est causée par un déséquilibre du remodelage osseux. La résorption osseuse ostéoclastique est supérieure à la formation osseuse ostéoblastique. Elle peut aussi être due à une période d'immobilisation post-chirurgicale ou à une maladie génétique.

Avec les changements démographiques, l'ostéoporose et les fractures vont bientôt devenir une charge économique encore plus lourde pour les systèmes de soins de santé à travers le monde. En 2000, le coût direct estimé de l'ostéoporose était de 31,7 milliards d'euros en Europe. Il devrait augmenter à 76,7 milliards de dollars en 2020. Cette pathologie est dévastatrice pour la santé et les médicaments existants ont de nombreux effets secondaires. Il est nécessaire d'élaborer une alternative supplémentaire, qui permettra de maintenir un bon équilibre entre la résorption osseuse des ostéoclastes et la formation osseuse ostéoblastique en limitant les effets secondaires.

Avec des partenaires académiques ou privés, nous souhaitons étudier l'effet de nouveaux médicaments potentiels sur la minéralisation. Pour modéliser l'immobilisation chez l'homme ou étudier l'effet de médicaments sur la densité osseuse, des souris seront suspendues par la queue pendant 4 semaines. Elles auront leur liberté de mouvement grâce à un système à l'extérieur de la cage. Ce protocole est souvent utilisé pour ce genre d'étude.

Nous suivrons l'évolution des os des souris sous l'action de différents traitements. Nous analyserons la densité osseuse in-vivo sur des souris, grâce à une méthode non-invasive, la tomodynamométrie (TDMX). Les souris seront imagées toutes les deux semaines.

Cette méthode permettra de minimiser le nombre de souris utilisé dans cette étude.

A terme cette étude permettra de mieux comprendre la perte osseuse et de proposer des pistes pour améliorer la densité osseuses des patients (en préventif, pendant une pathologie-immobilisation ou en curatif).

80 souris seront utilisées dans ce protocole sur une durée de 13 semaines.

La règle des 3R sera respectée car les animaux seront suivis quotidiennement durant le protocole. Une grille d'évaluation de la souffrance et du stress permet de prendre les décisions adéquates en fonction de l'état sanitaire de l'animal. Les animaux seront placés seuls dans des cages avec des éléments d'enrichissements. Eau et nourriture seront fournis ad libitum. Les animaux seront placés en cycle jour/ nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie réglementaire. L'imagerie in vivo permettant de pouvoir suivre un animal sur le long terme, elle permet de réduire le nombre d'animaux à inclure dans les protocoles. Cette étude visant à étudier les effets de traitements sur l'ostéoporose ne peut se faire que chez l'animal vivant.

2422- Dans le cadre de l'enseignement de la licence pro, les étudiants de la filière animale ont un module obligatoire, le niveau 2 d'expérimentation animale et les travaux pratiques sur animaux vivants font partie intégrante de la formation légale.

Dans un premier temps les animaux sont manipulés sans qu'il ne soit effectué de gestes techniques pour que les étudiants apprennent à gérer leurs propre stress et rassurer l'animal en habituant celui-ci à main de l'homme.

Puis nous apprenons aux étudiants à réaliser les deux gestes qui nécessitent que l'animal soit vigile.

Le Gavage pour conserver le réflexe de déglutition.

L'injection en intra péritonéale pour anesthésier les animaux

Le reste des gestes techniques que nous enseignons (pesée, marquage, injection intraveineuse, intramusculaire, prélèvements etc.... se fera sur des animaux anesthésiés le dernier geste sur animal vivant est l'injection intracardiaque pour euthanasier les animaux par un sur dosage de Thiopental

Les cadavres nous servent ensuite pour effectuer des travaux pratiques d'anatomie

La licence parcours animal s'adresse à 15 étudiants par an et ceux-ci bénéficient de 4 TP en comptant l'examen final il nous faudra donc une soixantaine de rats et autant de souris par année scolaire. Ce qui représente un total de 600 animaux pour les cinq prochaines années scolaires.

La règle des 3 R est enseignée aux étudiants lors des cours qui leurs sont dispensés pour l'obtention du niveau 2 en expérimentation animale et leur est constamment rappelée aux cours des travaux pratiques.

2423- Le marché des matériaux nanoadditivés - c'est-à-dire contenant des matériaux de taille nanométrique comprise entre 1 et 100 nm - croît de façon exponentielle, depuis le début des années 2000. De même, le nombre de produits issus des nanotechnologies dédiés à l'habitat - produits de construction additivés de nanomatériaux comme des mortiers de béton, du ciment, des revêtements, des peintures et des matériaux d'isolation - est en constante évolution. L'association de nanomatériaux aux produits de construction du bâtiment vise généralement à améliorer ou à leur conférer de nouvelles propriétés, telles que résistance mécanique, durabilité, isolation thermique, auto-nettoyabilité, épuration, automodification des couleurs, etc... Parmi les nombreux types de nano-objets actuellement employés et notamment les nanoparticules d'oxyde de zinc (nano-ZnO), de silice (nano-SiO₂), d'alumine, d'argent, du noir de carbone et des nanotubes de carbone, le dioxyde de titane (nano-TiO₂) est l'un des plus employés (en France plusieurs milliers de tonnes par an) notamment en raison de sa stabilité, de son faible coût et de sa facilité de mise en œuvre. Il est utilisé dans des ciments, des revêtements, des enduits, des bétons, des murs, du verre, des membranes d'étanchéité, des peintures, des tuiles, des céramiques et des sprays de revêtement.

Les problématiques sanitaires et environnementales soulevées par l'usage à grande ampleur des nano-objets sont aujourd'hui posées dans la communauté scientifique et notamment à travers l'exposition potentielle des populations aux nanomatériaux manufacturés, susceptibles d'être libérés involontairement, sous la forme de particules « grossières » produites par des usages courants tels que le nettoyage ou le ponçage, et des facteurs environnementaux tels que la pluie, la chaleur, l'abrasion et les rayonnements UV. Les observations par microscopie de ces nano-objets relargués illustre une hétérogénéité des formes : les nano-objets peuvent être isolés sous forme de nanoparticules ou plus généralement encapsulés dans la matière constituant le produit.

Or les travaux toxicologiques actuellement menés sur cette problématique, s'intéressent uniquement à la toxicité du nanomatériau seul et non à la toxicité du nanomatériau mélangé aux composés du produit considéré - dans sa complexité de composition et de forme et quasiment jamais dans le contexte d'une exposition réaliste. Ainsi, l'utilisation accrue de nanomatériaux dans de nombreux produits de consommation dédiés à l'habitat, s'accompagne d'interrogations légitimes des pouvoirs publics et de la population générale quant à leur devenir et leur impact potentiel sur l'environnement et la santé humaine. Plusieurs études épidémiologiques évoquent en particulier l'idée d'un lien possible entre l'exposition à des nanomatériaux et les maladies neurodégénératives. Ainsi, les agrégats d'alpha-synucléine, un marqueur pathologique de la maladie de Parkinson, seraient plus élevés chez des sujets, même jeunes, résidant dans des villes à l'air pollué. Par ailleurs, une large étude américaine vient de montrer que chaque augmentation de la concentration aérienne en particules fines de 1 microgramme par mètre cube d'air était associée de manière statistiquement significative à une élévation de 8% du risque d'être hospitalisé pour une maladie de Parkinson dans l'année. En conséquence il est nécessaire et indispensable de mener des études visant à clarifier ces questions.

Le présent projet de recherche vise à apporter des connaissances nouvelles concernant l'impact potentiel des nano-objets issus de matériaux nano additivés, relargués au cours de leur usage, sur les fonctions cérébrales. Il propose une étude à partir de peintures additivées en nanoparticules de TiO₂ produit d'usage courant emblématique, représentatif de la problématique. Pour atteindre ses objectifs d'évaluation d'une neurotoxicité potentielle, il n'existe pas d'alternative aux expérimentations in vivo et le projet s'appuie sur des expositions réalistes à l'aide d'une enceinte d'exposition par voie aérosol conçue spécialement pour répondre aux exigences de l'expérimentation animale dans le respect du bien-être animal ; si la règle du remplacement ne peut être appliquée, la règle du raffinement est mise en place durant toute la durée de l'étude. Les souris seront hébergées dans des cages avec enrichissement.

Le plan d'expérience prévoit d'étudier plusieurs fenêtres temporelles jusqu'à 8 semaines d'expositions chroniques. L'ensemble des procédures du projet (expositions par voie aérosol dans une enceinte où les animaux sont libres de se mouvoir, tests d'adresse locomotrice, l'imagerie cérébrale) seront effectuées dans le souci du respect du bien-être animal, sans générer de douleur ni de souffrance pour les animaux et en minimisant le risque de stress.

Un total de 240 souris sur 5 ans sera utilisé dans ce projet, permettant d'avoir une représentation statistique minimale. Différents groupes de deux lignées de souris seront exposées, une lignée sauvage comparativement à modèle de maladie de Parkinson (lignée transgénique présentant une prédisposition au développement de processus neuropathologiques liée à l'expression d'une forme mutée de la protéine humaine alpha-synucléine).

La neurotoxicité des particules sera appréhendée par des tests comportementaux, notamment par l'évaluation des réponses à des tests d'aptitude locomotrice, de l'imagerie cérébrale haute résolution (imagerie par résonance magnétique : IRM), ainsi que des analyses post-mortem du cerveau. Le caractère multiparamétrique de l'IRM permettra de visualiser des altérations morphologiques et altérations fonctionnelles. De plus, son innocuité (absence d'irradiation) autorise la réalisation de suivis longitudinaux rapprochés sans risquer de générer des dommages cérébraux (raffinement). En fin d'expérimentation, après euthanasie des animaux, cette évaluation neurofonctionnelle sera plus précisément caractérisée par l'examen histopathologique du cerveau complétée par l'étude de la bioaccumulation de nanoparticules de TiO₂ dans différents organes.

2424- Dans le cadre de la mise en place de nouveaux traitements thérapeutiques pour lutter contre les cancers l'immunothérapie est une voie prometteuse. L'immunothérapie adoptive vise à administrer à un patient des effecteurs immunitaires reconnaissant spécifiquement les cellules tumorales à éliminer. L'objectif de ce projet est d'obtenir des preuves

de concept (faisabilité, efficacité) pouvant justifier l'exploitation d'une immunothérapie adoptive dans le traitement des cancers de l'ovaire et de tenter de prioriser ces approches au niveau du choix des effecteurs immunitaires.

Des souris immunodéficientes NOD-SCID-IL-2Rgamma [NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/Sz], NSG] seront utilisées comme modèle animal de développement de tumeurs ovarienne humaines par greffe de cellules tumorales. Ces souris recevront par la suite une administration locale et/ou intra veineuse d'effecteurs cytotoxiques lymphocytaires T d'origine humaine. Ces populations polyclonales de lymphocytes T, triées et amplifiées à partir d'échantillons sanguins de patients ou de donneurs sains, seront des effecteurs pouvant réagir spécifiquement contre les cellules tumorales. Des lymphocytes T Vgamma9Vdelta2 non-conventionnels, à forte activité anti-tumorale, seront notamment testés dans cette étude. Seuls les effecteurs avec un fort potentiel thérapeutique seront utilisés (sélectionnés grâce à des test de réactivités anti-tumorales in vitro).

Globalement, ce projet devrait nécessiter l'utilisation de 1729 animaux (ce nombre pourra varier en fonction du nombre de modèles développés et d'effecteurs à valider dans différents modèles). Pour limiter le nombre d'animaux, différentes étapes seront réalisées successivement, afin de définir à chaque fois les meilleures conditions expérimentales.

- Développement de 5 à 10 modèles de tumeurs ovarienne humaines (variable en fonction du mode d'injection, des caractéristiques de croissance, de l'apparition de carcinose intrapéritonéale). Chaque modèle nécessitera l'utilisation de 42 animaux soit un maximum de 420 animaux.
- Mise au point des modalités d'injections des effecteurs T (nombre, site d'injection) (grâce au modèle de tumeur le plus pertinent). Ces essais seront réalisés en utilisant une population lymphocytaire T effectrice « référence », préalablement sélectionnée pour sa forte réactivité anti-tumorale in vitro. Cette étape nécessitera l'utilisation de 7 lots de 7 souris soit 49 animaux.
- Évaluation du bénéfice thérapeutique de l'administration de différents effecteurs lymphocytaires T humains. Cet étape concernera 14 souris pour chaque effecteur T alpha beta testé (maximum 10 populations différentes) et 28 pour les effecteurs T gamma delta (maximum 10 populations différentes) soit un maximum de 420 animaux.
- Confirmation de l'intérêt thérapeutique des effecteurs sur 2 à 3 modèles de tumeur ovarienne humaine. Si les résultats obtenus précédemment sur le modèle de référence présentent un bénéfice en terme de survie, les effecteurs seront alors testés sur d'autres modèles de xénogreffes de cellules tumorales. Pour chaque modèle nous utiliserons 14 souris (lots contrôle et test en conditions optimales) avec un maximum de 20 populations lymphocytaires (10 effecteur T alpha beta et 10 effecteurs T gamma delta) soit un maximum de 840 animaux.

Nous utiliserons des lots de 7 souris et nous analyserons les résultats par tests statistiques de comparaison: test de Wilcoxon ou Mann-Whitney. D'un point de vue statistique, l'utilisation de plus d'animaux par lot semble préférable mais nous sommes éthiquement amenés à réduire le nombre d'animaux utilisés. Plusieurs études publiées dans notre domaine de recherche, utilisant des modèles animaux similaires, décrivent l'utilisation de 7 animaux par lot.

Les animaux seront suivis quotidiennement. Si la variation de poids est supérieur à 10% ou en cas de présence d'ascite trop important (abdomen dilaté) ou au moindre autre signe anormal de leur état général (voir tableau en annexe) les souris seront euthanasiées par dislocation cervicale.

2425- Les infections nosocomiales couplées à l'émergence de la résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique. *Staphylococcus aureus*, bactérie à Gram positif, plus connu sous le nom de Staphylocoque doré est un des principaux responsables de ces infections nosocomiales et un des plus difficiles à traiter. Notre laboratoire travaille depuis plus de 15 ans sur ce modèle d'études et a découvert de nouvelles molécules synthétisées par le staphylocoque doré et impliquées dans la virulence des souches bactériennes c'est à dire leur capacité à provoquer des infections plus ou moins graves. Ces molécules sont de petits acides ribonucléiques ou ARN capables de réguler la synthèse de nombreux facteurs de virulence. Fort de son expertise en biologie moléculaire, notre laboratoire a pu construire de nouvelles souches de staphylocoques dorés dans lesquelles ces ARN régulateurs ont été supprimés ou au contraire sont fortement exprimés.

Le but de cette étude est de donc démontrer, in vivo, sur un modèle murin, la virulence de ces nouvelles souches bactériennes et de mesurer ainsi l'implication de ces ARN régulateurs dans la virulence des souches.

L'expérimentation consistera à injecter par la veine caudale de la souris une solution calibrée de *Staphylococcus aureus* dilués dans du sérum physiologique, de provoquer ainsi une septicémie et d'établir sur une durée de 14 jours une courbe de survie pour chaque souche étudiée. La comparaison entre une souche contrôle et une souche modifiée permettra de dire si cette modification rend la souche plus virulente ou moins virulente.

Le modèle animal choisi est la souris, le modèle murin de septicémie étant largement répandu dans la littérature scientifique. Le laboratoire possède déjà l'expertise technique nécessaire à cette étude et un nombre minimal de 735 souris sera suffisant pour une étude comparative et statistique fiable

Outre la survie des souris à une septicémie provoquée, nous étudierons également l'impact sur différents organes tels que le foie, la rate, les reins. Une observation macroscopique nous permettra d'évaluer la formation d'abcès et une analyse microbiologique permettra de déterminer le nombre de bactéries présents dans chaque organe. 245 souris permettront de réaliser une étude statistique viable.

Au total, 980 souris seront nécessaires à cette étude.

Afin de respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en gardant un effectif correct pour une étude statistique convenable. Les animaux seront élevés dans des conditions favorables à leur bien-être, dans des cages de taille appropriée pour des lots de 5 animaux. L'alimentation est contrôlée et les soins quotidiens sont apportés par du personnel qualifié.

Pour chaque procédure, les animaux seront surveillés quotidiennement avec évaluation de leur aspect physique, de leur comportement, de leur température corporelle et de leur poids. Tout animal présentant des signes de souffrance physique avérés sera exclu de l'expérimentation et immédiatement euthanasié au dioxyde de carbone (CO₂).

Ces données obtenues sur modèle murin sont essentielles pour la compréhension du mécanisme de virulence de *Staphylococcus aureus*, responsable d'un nombre important d'infections chez l'Homme et qui s'avèrent très souvent mortelles.

2426- Le stress est un processus physiologique indispensable. Il nous permet notamment de nous adapter aux diverses modifications de notre environnement. Cependant, lorsque celui-ci est induit dans des conditions dites chroniques, le stress peut cette fois-ci conduire à des pathologies comportementales comme la dépendance aux drogues, communément appelée addiction.

La vulnérabilité aux drogues d'abus par le stress dépend d'une modification de l'activité de certains neurones, les neurones dopaminergiques, présents dans une région du cerveau dénommée, l'aire tegmentale ventrale.

Il est important de noter que l'activité des neurones peut-être modulée par un autre type cellulaire, l'astrocyte. Il a longtemps été considéré que la transmission de l'information dans le cerveau (transmission synaptique) était uniquement une histoire de neurone dans laquelle un premier neurone transmettait une information (signal synaptique) à un deuxième neurone. Cependant, depuis plus de 15 ans, un troisième protagoniste, l'astrocyte, a fait son entrée. En effet, l'astrocyte joue le rôle de régulateur fin.

De ce fait, le but de ce projet est d'établir si la vulnérabilité à la cocaïne induite par le stress est un processus dépendant des astrocytes. L'addiction étant un problème de santé publique majeur, ce projet permettra de mieux comprendre le développement de cette pathologie psychiatrique et d'identifier l'astrocyte comme une cible thérapeutique.

L'ensemble de ce projet nécessite l'utilisation de 368 rats. Il n'existe actuellement pas de modèle *in vitro* et donc de méthode alternative à l'utilisation des animaux. Afin de respecter la règle des 3R et de réduire au maximum l'inconfort des animaux, ceux-ci seront hébergés dans des cages respectant les normes de la Directive Européenne 2010/63/UE. Les cages seront systématiquement enrichies à l'aide de nestlets. Un soin particulier sera accordé pour éviter tout stress additionnel qui pourrait modifier les résultats de l'expérience.

2427- La tachycardie ventriculaire (VT) est un rythme cardiaque dangereusement rapide qui réduit la capacité de pompage des principales cavités cardiaques, les ventricules, et est la principale cause de mort subite cardiaque. La VT est traitable en utilisant la technologie «d'ablation», où la région cicatricielle anormale du muscle cardiaque est détruite par une procédure minimalement invasive utilisant un cathéter délivrant une énergie de radiofréquence. Les taux de réussite de la procédure sont actuellement d'environ 50%, et les patients vont encore nécessiter l'implantation d'un défibrillateur (ICD), un dispositif coûteux qui choque le patient pour lui permettre de retrouver un rythme cardiaque normal. Cette étude vise à utiliser la technologie d'imagerie par résonance magnétique (MR) pour améliorer la précision de l'ablation de VT en permettant la visualisation directe de la cicatrice.

Objectifs: 1. Démontrer la fonctionnalité du système MR-EP, afin de permettre des essais humains ultérieurs

2. Évaluer l'exactitude et la fiabilité de la mesure des signaux électriques cardiaques, en utilisant des cathéters dans le coeur, sous guidage-MR

3. Évaluer la précision et l'efficacité des brûlures d'ablation effectuées dans un MR-scanner en utilisant le cathéter en développement

4. Évaluer l'exactitude de l'évaluation par MR de ces brûlures d'ablation. La MR sera comparée à des mesures histologiques

5. Quantification de l'efficacité de l'ablation de VT guidée par MR dans un modèle animal. Un sous-ensemble d'animaux sera testé pour VT avant l'ablation, puis réévaluée à 4-6 semaines après l'intervention

Présentation du protocole :Un total de 24 porcs seront impliqués dans ces expériences. 12 porcs seront en bonne santé avant la procédure MR-EP (Phase zéro), et 12 porcs auront subi une procédure 4 à 6 semaines préalablement afin de créer un modèle animal de VT (Phase 1)

Bien-être animal: Toutes les procédures seront effectuées sous anesthésie générale. Pendant les périodes de rétablissement, on peut prévoir un certain degré de péricardite, une irritation de la muqueuse externe du cœur qui peut causer de l'inconfort. Cet inconfort répond bien aux médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens et sera administré à titre prophylactique lors des phases de récupération. Toutes les mesures appropriées seront prises pour minimiser les souffrances liées aux procédures, et l'euthanasie sera effectuée par anesthésie terminale (voir ci-dessous).

Cette étude a été conçue pour nécessiter un minimum absolu d'essai *in vivo*, une vaste validation *ex vivo* ayant déjà été effectuée.

L'étude de phase zéro (12 porcs, aucune procédure préparatoire) sera utilisée pour vérifier la fonctionnalité complète du système et affiner à la fois l'imagerie et le suivi des performances avant les procédures sur les porcs avec modèle de VT. Le nombre de porcs est basé sur notre expérience préalable dans le développement du système d'ablation guidée par MR pour une utilisation dans les procédures d'ablation auriculaire.

La Phase 1 (12 porcs, modèle de cicatrice VT) visera à évaluer de multiples objectifs en une seule série d'expériences. Le design expérimental est intensif en termes de collecte de données et de défis techniques, mais permettra de minimiser le nombre de sujets

2428- Les études de pharmacocinétique (PK) chez l'animal sont nécessaires et demandées par les autorités de santé afin de pouvoir réaliser des études cliniques avec un maximum de sécurité. Elles permettent de déterminer les doses, la fréquence des administrations et de calculer la marge de sécurité. Elles permettent également d'identifier et de caractériser les potentiels produits dérivés associés (métabolites) et leur impact sur le sujet traité.

Les agences réglementaires internationales imposent d'étudier la pharmacocinétique chez l'animal vivant entier (une espèce rongeur et une espèce non-rongeur), afin de relier une activité pharmacologique ou une toxicité à des paramètres tels qu'une exposition plasmatique (ou sanguine) du produit d'intérêt (futur médicament).

Ces études PK sont conduites chez le rat (ou la souris) et chez le chien (ou le primate non humain : PNH), à des doses pharmacologiques non toxiques. Les espèces animales choisies pour ces études sont celles utilisées dans les études de Pharmacologie de Sécurité ou de Toxicologie Générale.

Des méthodes alternatives in vitro ou ex-vivo qui étudient un aspect de l'absorption, du métabolisme ou de l'élimination sont également réalisées pour prédire les données in vivo. Cependant, ces méthodes n'étudient pas les mécanismes dans leur globalité et le recours à l'animal entier reste incontournable.

La grande sensibilité des méthodes de dosages actuelles permet de diminuer très significativement les volumes sanguins prélevés à l'animal, et permet donc une diminution du nombre d'animaux utilisés dans les études.

Espèces animales Nombre maximum d'animaux utilisés sur 5 ans (hors formes fœtales)

Souris 44 700

Rat 27 580

Lapin 1 440

Chien* 600 (80)*

Primate Non Humain (PNH)* 600 (50)*

*= Dans la plupart des cas, ces animaux sont déjà présents dans un groupe d'animaux disponibles, et sont réutilisés plusieurs fois dans les études, après bilan hématobiochimique et approbation vétérinaire.

2429- Près de trois quart des maladies infectieuses émergentes chez l'homme ont une origine zoonotique, c'est à dire causées par des agents infectieux pouvant se transmettre naturellement entre l'homme et d'autres espèces d'animaux vertébrés. Dans ce contexte, l'étude des mécanismes épidémiologiques et écologiques favorisant la transmission des agents infectieux dans la faune sauvage, ainsi que leur introduction dans la faune domestique et les populations humaines, nécessite une attention particulière. De nombreux agents infectieux d'origine aviaire sont notamment impliqués dans ces phénomènes d'émergences, tels que les virus influenza de type A (responsables des gripes aviaires).

L'objectif général de ce projet est de tester l'effet de la dynamique spatio-temporelle des populations d'oiseaux marins et de limicoles sur la transmission et la dispersion des agents infectieux dans l'océan Indien. Les recherches porteront sur la transmission des agents infectieux au sein des populations d'oiseaux (e.g. à l'échelle d'une colonie ou d'une île), mais aussi entre populations. Elles reposeront sur la réalisation de prélèvements biologiques (prises de sang, écouvillons) visant à déterminer le statut infectieux des oiseaux échantillonnés. Les espèces sauvages ciblées seront principalement des sternes (e.g. Sterne fuligineuse, Noddi à bec Grêle) et des petits échassiers (e.g. Tourne-pierre à collier, Courlis). Le projet vise également à étudier les mécanismes de dispersion des agents infectieux en relation avec les déplacements migratoires des oiseaux. Pour d'atteindre cet objectif, des oiseaux seront équipés de systèmes de géolocalisation permettant d'obtenir des informations sur la position géographique de l'animal et sur son comportement, pendant la migration ou pendant la reproduction. A partir des données obtenues sur les déplacements migratoires des oiseaux, nous obtiendrons des informations sur les paramètres comportementaux qui pourraient avoir un rôle important dans la dispersion des agents infectieux. Enfin, des prélèvements biologiques sur des oiseaux domestiques (e.g. poules) et périodiques (e.g. moineaux) seront également réalisés afin de mettre en évidence la transmission d'agents infectieux avec les oiseaux sauvages. L'émergence de nombreuses maladies est à relier à la transmission d'agents infectieux entre la faune sauvage et domestique, ce projet permettra d'apporter des connaissances sur ces aspects, en particulier pour des maladies qui présentent un enjeu en termes de santé publique et vétérinaire.

La réalisation de ce projet implique la capture et la manipulation d'espèces animales dans leur milieu naturel. Le nombre total d'espèces ciblées et d'animaux utilisés dépendra des possibilités de capture des animaux sauvages, cependant nous estimons que le nombre maximum d'animaux ne dépassera pas 10000 au cours de ce projet. Notre démarche consiste néanmoins à raisonner en terme de population et à manipuler un nombre d'animaux permettant d'obtenir à la fois des résultats valides d'un point de vue statistique sans pour autant affecter la douleur, la souffrance et l'anxiété infligées aux animaux. Les captures des oiseaux auront principalement lieu dans les colonies de reproduction. La précaution principale sera de limiter le dérangement lié à la capture des oiseaux pour ne pas affecter leur succès reproducteur. Afin de limiter le stress, les oiseaux capturés seront mis dans des sacs de contention, à l'obscurité. Les prélèvements biologiques et la pose du matériel de géolocalisation seront réalisées à l'abri du soleil de manière rapide, calme et sûre, par des manipulateurs entraînés et habilités à réaliser ce type de procédures.

2430- La procédure décrite dans ce projet correspond à la création de tumeurs chez la souris.

L'objectif de ce projet est de créer différents types de tumeurs chez la souris, après administration de cellules tumorales, de mesurer différents critères (taille de la tumeur, survie...), et de tester l'efficacité d'anticancéreux. Cette procédure va être réalisée exclusivement chez la souris.

La création de ce type de modèle dans ce projet ne peut pas être remplacée par des méthodes alternatives car l'induction de tumeur s'accompagne de modifications physiopathologiques ne pouvant pas être reproduites in vitro, ces modifications étant nécessaires pour l'étude d'efficacité d'anticancéreux.

L'utilisation de la souris comme espèce rongeur se justifie par le fait que cette espèce développe rapidement des tumeurs après injection de cellules tumorales et qu'il s'agit de l'espèce la mieux décrite dans la littérature pour ce type de modèle.

Le nombre d'animaux utilisés pour chaque test a été optimisé de façon à permettre une interprétation correcte des résultats, évitant ainsi une répétition du test.

Sur ces modèles induits, un effectif de 12 animaux par groupe semble un minimum. Un test comportera 4 groupes (un contrôle, un anticancéreux de référence, et deux doses de substance test), soit 48 animaux par test. Par ailleurs, nous estimons à 15 le nombre de molécules qui seront testées par an, sur les 5 prochaines années (i.e. 3600 souris).

Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

2431- Dans le cadre de la production de vaccins poliomyélitique inactivés, la réglementation exige des contrôles de l'immunogénicité (capacité de l'antigène à induire une réaction immunitaire) des vaccins

Le contrôle est réalisé par inoculation de vaccins à des poulets qui sont ensuite hébergés le temps nécessaire au développement des anticorps.

Une prise de sang permet ensuite de mesurer le taux d'anticorps et si ce taux est conforme aux exigences, les lots de vaccins sont libérés.

Les bénéfices attendus étant de contribuer à la libération des lots de produits fiables et conformes aux spécifications réglementaires et aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).

Aucune douleur n'est attendue pour les animaux lors de la réalisation de ce test.

Pour la durée du projet (5 ans) il est prévu d'utiliser 7830 poulets.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement / Réduction :

Ce test est en cours de suppression auprès des autorités de santé. La société s'est d'ailleurs engagée dans un processus d'arrêt de ce contrôle comme c'est déjà le cas pour un certain nombre de vaccins antipoliomyélitiques commercialisés. L'arrêt de ce contrôle a permis de diminuer le nombre de poulets de 8000 à moins de 1600 poulet par an.

Raffinement :

Cette procédure n'est pas douloureuse. Les prélèvements de sang sont réalisés sous anesthésie générale.

Les poulets sont hébergés en groupe, au sol, sur litière de copeaux de bois.

Ils sont observés quotidiennement. En cas de problème de santé, un vétérinaire est consulté et décide des soins à porter à l'animal.

2432- Notre processus de production assure l'approvisionnement des matières premières critiques pour le compte de notre société sœur, leader mondial du diagnostic in vitro.

Suite à l'activation du système de la coagulation sanguine, le fibrinogène, molécule soluble substrat de la thrombine, est polymérisé en un caillot de fibrine. Le processus de fibrinolyse est activé concomitamment afin de réaliser la dégradation du réseau de fibrine par la plasmine. Ce processus clôture la coagulation sanguine afin de re-perméabiliser les vaisseaux sanguins réparés et sert à empêcher la formation de thromboses. L'hémostase est donc un équilibre physiologique finement régulé entre un état de construction du caillot (coagulation) et de dissolution du caillot (fibrinolyse). Pour asseoir un diagnostic précis, lors d'évènements ischémiques ou hémorragiques, les cliniciens pratiquent des examens de biologie médicale en dosant différents paramètres de la coagulation comme le taux de prothrombine (TP, INR), le temps de céphaline activée (TCA), les produits de dégradation de la fibrine (PDF), la numération plaquettaire.

Un hybridome a été développé, il y a une vingtaine d'années, sécrétant un anticorps monoclonal (Mab) ultra spécifique d'un produit terminal de la dégradation de la fibrine. Ce Mab entre dans la composition d'outils de diagnostic biomédical utilisé par la majorité des hôpitaux et des laboratoires français, européens et américains pour le diagnostic de la CIVD (Coagulation Intra Vasculaire Disséminée), des thromboses veineuses des membres inférieurs (phlébites) et de l'exclusion de diagnostic de l'embolie pulmonaire. Ces dispositifs IVD exploitant ce Mab sont pleinement validés, au sens du marquage CE des dispositifs IVD, de la U.S. FDA et des divers organismes réglementaires internationaux.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (démontrer que tous les efforts ont été tentés pour remplacer la méthode de production in vivo par une autre technique), Réduire (optimisation du nombre de souris à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile)

Ce Mab n'a pu être caractérisé, techniquement et cliniquement validé que sur des lots issus de production en condition in vivo. Des efforts considérables et des essais très poussés ont été menés depuis 2009 pour tenter le transfert de cette production en condition in vitro (bio-réacteur, flasque, fibre creuse, roller-spinner...). L'ensemble des rapports techniques concernant la capacité dudit clone à produire le même Mab selon le même cahier des charges (notamment son affinité et sa spécificité) requis pour les dispositifs IVD concernés, démontre la nécessité incontournable de poursuivre la production de ce Mab en condition in vivo.

Les besoins de santé publique et la nécessité absolue de ces dispositifs IVD exploitant ce Mab et en l'absence de solution alternative, impose le maintien de la production de ce réactif.

Le nombre moyen de souris utilisées a été optimisé et varie entre 700 et 1500 par cycle de production. Le nombre total de souris participant à ce protocole est de 21000.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux.

Une seule paracentèse est réalisée sur l'animal. Le contrôle de la réponse immunitaire des animaux n'est plus nécessaire, ce clone étant exploité depuis 1995, ce qui permet de réduire le nombre d'actions invasives sur l'animal.

L'euthanasie de l'animal en fin de protocole sera réalisée par une technique éthiquement acceptable, soit par asphyxie par saturation progressive en CO₂, soit par dislocation cervicale avec une sédation préalable si les souris font plus de 150 grammes.

2433- La thérapie génique a démontré ces dernières années son efficacité pour le traitement de certaines maladies rares d'origine génétique telles que l'hémophilie, certaines maladies rétinienne, neuro-dégénératives, anémies ou des déficits immunitaires. Ce concept innovant consiste à introduire un gène normal dans une cellule malade afin de lui permettre de fabriquer la protéine manquante ou déficiente. Le « gène médicament » ou transgène est amené dans les cellules au moyen de transporteurs appelés « vecteurs » qui sont des virus rendus inoffensifs. Toutefois ces vecteurs peuvent déclencher des réponses immunes indésirables. Une meilleure compréhension de ces réponses immunes est donc essentielle pour améliorer les approches de thérapie génique pour des maladies qui restent incurables à ce jour.

Dans ce contexte, notre laboratoire s'intéresse à comprendre ces réponses immunes indésirables en thérapie génique, à travers un modèle *in vivo* chez la souris. En effet il n'est pas possible d'étudier cette question au laboratoire sur des cellules. Le système immunitaire réagit de façon très complexe dans un organisme *in vivo* en fonction des voies d'administration du vecteur, de sa biodistribution, de la rencontre entre différents types de cellules dans des organes lymphoïdes spécialisés, qu'il n'est pas possible de reproduire *in vitro* sur des cellules en culture. De plus nous avons montré récemment que l'environnement d'un muscle malade diffère de celui d'un muscle sain, modifiant ainsi les réponses immunes contre le transfert de gène de façon significative. Par conséquent, notre approche expérimentale se réalisera chez des souris saines ou chez des souris modèles de maladie génétique. Les informations scientifiques obtenues contribueront ainsi à comprendre les effets des vecteurs viraux de thérapie génique sur le plan immunitaire.

Le protocole expérimental repose sur l'application aux souris de procédures expérimentales non invasives et non douloureuses, classifiées dans la catégorie légère. A la base, le protocole consiste à injecter un petit volume de vecteur aux souris éventuellement associé à l'administration d'un traitement immunomodulateur, puis d'observer les réponses immunes obtenues. Pour cela, les souris seront étudiées de manière longitudinale par des prélèvements sanguins, ou bien pourront recevoir l'injection de cellules « indicatrices » ou de vaccins, ou d'un produit luminescent permettant de suivre l'inflammation, l'ensemble de façon non-douloureuse. A la fin de l'expérience, les souris seront euthanasiées et leurs organes prélevés pour des études au laboratoire.

Tout au long de ce projet nous respecterons la règle des « 3 R ». Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires à nos études, les protocoles combineront un ensemble de procédures permettant de faire un suivi et d'obtenir plusieurs informations chez la même souris. Dans le respect du principe de raffinement, nous appliquerons des actes expérimentaux les moins invasifs possibles aux souris testées comme le choix d'une anesthésie gazeuse (par rapport à une injection) ou le choix de prélèvements de sang effectués dans la veine mandibulaire (par rapport à la veine rétro orbitaire). Les tests effectués seront exhaustifs permettant une interprétation de l'ensemble des réponses immunes.

Afin de répondre aux questions posées dans ce projet, 3024 souris seront nécessaires pour une durée de 5 ans. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études et surtout en fonction d'une analyse statistique dans le but d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible.

2434- Les pathologies de l'ovaire résultent de dysfonctionnement des gènes nécessaires à la formation de l'ovaire et au maintien de l'organe sain. Récemment, le gène *Rspo1* a été identifié comme un facteur de susceptibilité de maladies telles que les insuffisances ovariennes prématurées et les cancers.

Rspo1 est exprimé dans l'épithélium de surface ovarien (ESO) qui fournit des cellules progénitrices des follicules ovariens. Le stock définitif de follicules est établi avant la puberté. A chaque cycle, les ovules sont libérés par rupture de l'ESO, qui doit être réparé pour assurer l'intégrité de l'ovaire. Avec l'âge, la réparation se fait moins bien augmentant le risque de cancers. *Rspo1* favorise l'établissement du stock folliculaire puis la réparation et le maintien de l'ovaire sain.

Dans un souci de se conformer à la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner), des techniques de culture ont été effectuées mais ont donné des résultats non conclusifs dus à des problèmes de dégénérescence liés au manque de vascularisation. Ainsi, une analyse détaillée de souris génétiquement modifiées récapitulant ces pathologies est essentielle pour mieux comprendre l'étiologie des maladies et leur apparition. Le modèle murin d'ablation de *Rspo1* n'a pas de phénotype dommageable. Il présente une inversion de sexe des femelles car les gonades deviennent des testicules. Cela empêche l'analyse du rôle de *Rspo1* dans l'ovaire formé. Pour déterminer quel est le rôle de *Rspo1* dans l'apparition des pathologies de l'ovaire, un modèle murin permettant l'inactivation de *Rspo1* dans l'ovaire a été généré.

Ce modèle permettra de répondre à deux questions.

1-Comment *Rspo1* intervient dans l'établissement du stock de follicules en analysant des ovaires d'animaux prépubères et en comparant les ovaires témoins et mutés.

2-Comment Rspo1 agit lors de la réparation de l'ovaire et induit l'apparition de cancers? Pour cela des expériences de superovulation seront réalisées et la réparation ovarienne sera modélisée afin de tester de nouveaux facteurs sans avoir recours aux souris.

Pour étudier comment se forme les cancers, nous laisserons vieillir 30 individus. Le cancer de l'ovaire est indolore dans les premières phases et les animaux seront examinés tous les jours et les points limites seront appliqués selon notre grille de surveillance (voir chapitre 3.4.13). De cette façon, aucun animal qui pourrait avoir un cancer avancé ne sera laissé en vie. Dans une perspective de réduire le nombre de souris utilisées, nous regrouperons nos expérimentations sur les échantillons prélevés et arrêterons nos travaux dès que nous aurons un nombre suffisant d'échantillons pour conclure nos résultats significativement.

Pour réaliser ce projet nous utiliserons 160 souris qui correspondent à 20 souris gestantes, 80 animaux de moins de 6 mois et 60 souris plus âgées comprenant les souris transgéniques et contrôles.

Etant donné que Rspo1 est une protéine sécrétée, elle constitue un espoir dans le traitement de certaines pathologies liées à ses dysfonctionnements. Par exemple, elle est en phase d'essai car elle stimule la régénération de l'intestin et représente un atout dans les traitements de chimiothérapie. Cependant avant d'envisager son utilisation plus généralisée à d'autres pathologies, il reste à déterminer tout d'abord son mécanisme d'action. C'est ce que nous proposons de faire pour l'ovaire.

2435- La maladie de Parkinson est une affection neurodégénérative chronique, évolutive, d'origine souvent inconnue. Elle touche une structure située à la base du cerveau entraînant une disparition progressive des neurones dopaminergiques la composant. Le rôle principal de cette structure consiste à contrôler les mouvements du corps, en particulier les mouvements automatiques.

Aujourd'hui les traitements disponibles sont uniquement symptomatiques et améliorent les symptômes moteurs de la maladie mais ne permettent ni de ralentir sa progression, ni de la guérir. Beaucoup d'efforts sont investis pour trouver des nouvelles thérapeutiques dites neuro-protectrices ou neuro-régénératives qui vont respectivement protéger les neurones dopaminergiques de la mort cellulaire ou leur permettre de se redévelopper.

Parmi ces nouvelles approches, il en est une qui a montré des effets très prometteurs jusqu'en clinique où elle a été testée récemment. Il s'agit d'une protéine dont le nom est GDNF. Cette protéine possède la capacité de protéger certaines populations de neurones et de leur redonner vie. Malheureusement, bien qu'efficace, ce traitement a ses limites car il doit être injecté chirurgicalement dans le cerveau des patients.

Des approches alternatives visant à faire produire du GDNF dans le cerveau à l'aide de médicament pouvant être pris sous forme de pilule ont alors vu le jour. C'est cette stratégie que nous souhaitons suivre en développant des petites molécules, administrables oralement, dont le rôle sera d'augmenter les taux de GDNF dans le cerveau. Ces molécules candidates ont fait suite à des évaluations in vitro des molécules, permettant ainsi de limiter le nombre d'animaux utilisés pour satisfaire aux exigences de REMPLACEMENT.

Notre projet va se dérouler en plusieurs étapes :

1-Validations : un composé existant mais nécessitant des injections sera utilisé comme contrôle. Son efficacité en tant que contrôle sera ici vérifiée avant utilisation dans les groupes expérimentaux. Les 3 molécules candidates seront aussi testées afin de vérifier la quantité de GDNF produite dans le cerveau et d'observer l'absence d'accoutumance, les traitements étant faits sur du long terme chez l'Homme.

2-Lorsque les composés auront démontré un effet chez des animaux contrôles, des animaux mutés pour le gène mGluR3 seront utilisés pour tester le contrôle ainsi que les composés candidats, afin de mettre en évidence l'importance de ce gène dans leur action.

Réduction :

L'ensemble de ces études est susceptible de nécessiter l'utilisation de 160 souris dites « sauvages » (sans mutation génétique) pour les premières validations sur animaux contrôles.

Lors des protocoles incluant les animaux mutés et les 3 composés, nous avons estimé nécessaire au maximum l'utilisation de 60 animaux contrôles et 60 animaux mutés par composé, afin d'obtenir les effectifs ciblés pour l'analyse protéique du GDNF. En se basant sur ce nombre, et en considérant 3 composés à 3 doses testées à deux âges, nous obtenons un total de 2320 animaux (2 âges * 3 composés avec 3 doses * 120 souris + 160 souris utilisées pour la validation).

Il faut néanmoins indiquer que tous les efforts sont faits pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés afin de respecter la réglementation éthique en vigueur, caractérisée par les 3R.

Raffinement :

De plus, les animaux feront l'objet d'un suivi rapproché afin d'éviter tout stress ou toute douleur au cours de ce projet bien qu'aucune douleur particulière ne soit attendue.

2436- Le domaine de la thérapie génique a récemment été bouleversé par l'arrivée de nouvelles méthodologies permettant la modification précise et ciblée du génome dans le but de réparer ou d'introduire du matériel génétique dans des cellules vivantes. Cependant, ces méthodes sont actuellement limitées par la difficulté à délivrer les composants nécessaires à la réparation dans des organismes vivants. Pour pallier à cette difficulté, nous avons mis au point un vecteur de livraison qui permet d'introduire l'ensemble de la machinerie de réparation de façon extrêmement efficace dans la plupart des cellules traitées. Avec une efficacité de livraison proche de 100 % ex vivo, notre outil est plus performant que les méthodes alternatives actuellement disponibles. Nous avons d'ores et déjà évalué notre méthodologie in vitro en culture cellulaire, avec des lignées ou des cellules de souris ou humaines primaires, nous souhaiterions maintenant tester la capacité de notre outil à

livrer la machinerie de réparation in vivo dans différents tissus et organes chez la souris. Nous espérons ainsi pouvoir proposer une nouvelle génération de vecteurs thérapeutiques pour le traitement de maladies génétiques.

Nous allons évaluer l'efficacité des vecteurs de livraison dans le muscle, le foie, après injection systémique, et enfin en ciblant les cellules souches hématopoïétiques. Chacun de ces tissus est en effet une cible thérapeutique importante au vu des nombreuses maladies génétiques associées.

Le nombre de souris utilisé dans ce projet sera réduit à son minimum sans pour autant compromettre les objectifs du projet ni les interprétations statistiques des résultats. Enfin, les conditions d'hébergement et d'enrichissement des cages, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées pour respecter le bien-être animal et limiter au maximum la souffrance subie par l'animal.

Ce projet inclura au total 322 souris maximum.

2437- De nombreuses maladies sont dues à un déficit (absence, mutation) d'un ou plusieurs gène(s). La thérapie génique est une stratégie qui consiste à apporter une version corrigée du gène en utilisant un vecteur dérivé de virus. Cependant, cette approche, particulièrement adaptée étant donnée la capacité naturelle des virus à infecter nos cellules, doit faire face à un obstacle majeur. En effet, notre système immunitaire s'est spécialisé pour se protéger contre le « non-soi »; ainsi, les vecteurs viraux, bien que ne pouvant pas causer de maladie, ainsi que la protéine médicament, sont détectés par le système immunitaire comme étranger et dangereux. Ces réponses immunitaires vont fortement compromettre l'efficacité du traitement et il apparaît donc nécessaire aujourd'hui de mieux les comprendre.

Certaines maladies de l'œil ont comme origine un défaut génétique, comme par exemple l'amaurose de Leber, qui constitue l'une des principales causes de cécité chez l'enfant puisqu'elle est retrouvée chez environ 10 à 20% des enfants aveugles. Des essais prometteurs de thérapie génique ont été menés depuis 2007, suite auxquels les patients traités ont retrouvé la vision de l'œil traité. Cependant, après 6 à 12 mois, leur vue a rebaissé jusqu'au niveau initial. Aucune étude approfondie n'a été menée afin de comprendre les éléments expliquant cette rechute, mais il semble très probable que cela soit dû à des réponses immunitaires à la fois dans l'œil, mais aussi dans le reste de l'organisme. Par ailleurs, la voie intra-vitréenne attire de plus en plus les cliniciens (car moins invasive) mais elle semble plus immunogène -et donc moins sûre- que la voie sous-rétinienne.

Le projet, complémentaire des études actuellement menées au laboratoire, vise donc à caractériser les réponses immunitaires induites envers la protéine médicament, à la fois dans l'œil et dans le reste de l'organisme, après l'injection de vecteur thérapeutique novateur dans l'œil. Plus précisément, dans le cadre des réponses immunitaires, il s'agit (1) de caractériser les différences entre les 3 voies d'injections intraoculaires utilisées; (2) d'évaluer l'impact de la capsid dans l'induction de réponse immunitaire et (3) d'évaluer l'effet d'injections répétées. A terme, cela a pour but de mieux identifier l'impact de ces traitements innovants sur l'organisme afin d'en assurer la sécurité et le bon déroulement.

Il s'agit donc d'une étude systémique, à l'échelle de l'organisme entier (œil, rate, ganglions, sang) qui ne peut pas être remplacée par des expériences in vitro. Dans ce contexte, un maximum de 1100 souris pourront être utilisées. Afin de respecter le bien-être animal, la règle des "3R" va être appliquée selon plusieurs axes :

-Remplacement : Toutes les productions de vecteurs seront testées sur lignées cellulaires afin de vérifier leur infectiosité avant de les injecter aux animaux.

-Réduction : le nombre d'animaux utilisé a été calculé à partir d'outils statistiques (test de puissance) permettant de réduire le nombre d'animaux tout en gardant des résultats robustes, ainsi qu'à partir de nos connaissances sur ce type d'étude. Enfin, pour optimiser l'expérimentation, toutes les procédures seront planifiées de manière à obtenir un maximum d'informations de chacune des expériences. Par exemple, certaines seront regroupées, ce qui permettra de n'utiliser qu'un groupe de souris contrôle au lieu de deux.

-Raffinement : Dans la mesure du possible et du réalisable, les procédures seront réalisées en double aveugle. Cela permet de s'affranchir du biais humain et de la suggestivité lors de l'analyse. Par ailleurs, les souris étant des animaux grégaires, elles seront hébergées par groupe de 5. De plus, deux techniques d'imagerie in vivo non invasive seront utilisées pour imager les souris dans le temps: un microscope in vivo, le CellVizio, et un appareil de bioluminescence. Cela permet, pour un suivi à plusieurs points temps, de n'utiliser qu'une souris au lieu de plusieurs. Ces techniques permettent donc de réduire considérablement le nombre d'animaux, mais aussi de réduire la douleur et le stress des animaux.

2438- Les cancers de l'estomac en stade précoce, présentant un faible risque de métastase au niveau des sites ganglionnaires, et, par conséquent, peuvent être traités de manière minimalement invasive par une technique de résection limitée. Une technique prometteuse est définie en anglais « full-thickness resection (FTR) », pouvant se traduire en français par « résection à tout épaisseur » de la paroi gastrique. La limitation actuelle avec les techniques de FTR est dans l'incapacité de visualiser toutes les possibles voies de dissémination de cellules tumorales dans la paroi de l'estomac. Une aide potentielle à cette visualisation pourrait venir d'une technique de guidage à l'acte chirurgicale, fondée sur l'usage de systèmes optiques équipés de sources de lumière infrarouge et sur l'injection de produits fluorescents (chirurgie guidée par la fluorescence), permettant de visualiser sur une zone assez large de la paroi d'estomac le réseau lymphatique et permettre une résection en toute sécurité et efficacité.

Nous avons conçu une nouvelle technique de résection s'appuyant sur la chirurgie guidée par la fluorescence et visant à réséquer uniquement la paroi de l'estomac intéressée par la tumeur, que nous avons défini : FLYING SWANS (Fluorescence LYmphangiography ImagiNg Guided Single WALL resectioN of the Stomach) ou en français « Résection uni pariétale de l'estomac guidée par une lymphangiographie par fluorescence ».

Cette technique pourrait être théoriquement compliquée par une difficulté de vascularisation et de cicatrisation, du moment que cette résection à l'emporte-pièce est non anatomique et comporte une modification de la morphologie et, probablement, de la motilité et fonctionnalité de l'estomac.

Le but de cette étude expérimentale est de vérifier la faisabilité de FLYING SWANS et d'étudier l'impact d'une telle résection sur la vascularisation, sur l'anatomie et sur la motilité gastrique.

Le projet FLYING-SWANS remplit les conditions des 3R :

- Remplacement : Pour tester la faisabilité de FLYING SWANS sur la vascularisation et sur la motilité gastrique, le recours à l'animal vivant est nécessaire. Le Porc est un modèle de choix, par sa taille, permettant d'utiliser des dispositifs chirurgicaux et d'imagerie de taille adaptée à l'Homme, et par conséquent, un transfert de technologie plus rapide vers l'application en clinique.

- Réduction : dans l'absence de toute référence dans la littérature, il est difficile de calculer « à priori » la taille de l'échantillon nécessaire et suffisant afin de réduire au maximum le nombre de sujets d'expérimentation tout en permettant d'obtenir des résultats significatifs. Dans le respect du principe de réduction, et sur la base de notre expérience dans le développement de nouvelles techniques chirurgicales, nous estimons que 8 animaux par group représentent un nombre nécessaire et suffisant. Dans le projet FLYING SWANS, nous avons planifié de tester 4 variantes techniques, pour un total, donc, de 32 animaux.

- Raffinement : le projet prévoit des procédures mini-invasives engendrant des douleurs post-opératoires modérées. Toutefois, les animaux recevront un protocole de soins post-opératoires comprenant une évaluation clinique quotidienne, des antidouleurs et des anti-inflammatoires et un régime standardisé. Des critères d'arrêt anticipé de l'expérimentation en cas de survenue d'une complication ont été identifiés.

2439- L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) évolue vers la chronicité quand elle survient chez le jeune enfant alors qu'elle guérit souvent spontanément quand elle se produit chez l'adulte. Les raisons de cette différence d'évolution restent encore mal comprises et il est souvent évoqué une immaturité du système immunitaire pour expliquer cette persistance de la réplication virale. Récemment, l'étude du modèle murin d'infection par infection massive de génomes du VHB par voie veineuse a montré que la présence et la qualité de la flore digestive influencent le devenir de l'infection; l'absence de flore ou une flore immature favorise la chronicité de l'infection, mimant l'effet de l'âge sur la chronicité de l'infection chez l'homme.

La flore digestive participe pleinement à plusieurs fonctions de l'hôte ; elle influe par exemple sur la réponse immunitaire et elle est une composante essentielle de plusieurs voies du métabolisme, dont notamment au métabolisme des sels biliaires. Parmi les facteurs cellulaires qui contrôlent la réplication du VHB nous avons identifié un récepteur hépatique nucléaire des sels biliaires comme régulateur de l'expression des gènes viraux.

Nous voulons étudier les effets de la modulation de l'activité de ce récepteur par des molécules agonistes (qui miment le ligand naturel) sur la réplication du VHB en fonction de la maturité de la flore digestive chez des souris jeunes (flore immature) ou adultes (flore mature) et aussi en fonction de l'absence de la flore chez les souris adultes après traitement antibiotique. Le rôle de ce récepteur dans l'infection par le VHB sera aussi étudié en utilisant des souris déficientes pour ce récepteur. Les modèles cellulaires ne permettent pas d'étudier les interactions entre les différents tissus impliqués, le foie, le microbiote et le système immunitaire, le modèle animal nous permettra d'étudier l'infection par le VHB dans cet environnement complexe.

Cette étude permettra de comprendre comment la maturation du système immunitaire ou les conditions métaboliques, différentes entre les enfants et les adultes propres à l'enfance, jouent un rôle dans l'évolution de la pathogénèse induite par le VHB.

Le nombre d'animaux utilisés par groupe expérimental dans chaque procédure suivra l'esprit de la règle des 3R (réduction, raffinement, remplacement). Ainsi, le nombre de souris utilisé dans les protocoles a été optimisé afin d'obtenir des résultats statistiquement valables tout en minimisant leur nombre. Tout au long des expériences, nous veillerons au bien être des animaux et à réduire au maximum la souffrance ou l'angoisse des souris (définition précise des points limites, administration de médicaments pour supprimer la douleur si nécessaire, choix des méthodes d'injections les moins invasives etc...). Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est de 368 souris.

2440- L'obésité et le diabète s'accompagnent d'une inflammation chronique pouvant avoir une répercussion sur de nombreux processus physiologiques, notamment sur l'homéostasie cérébrale. En effet, les personnes diabétiques ont une plus grande susceptibilité aux accidents vasculaires cérébraux et les dysfonctionnements centraux en résultant sont généralement plus importants que chez les personnes non-diabétiques. De plus, il semble que les personnes diabétiques, tout comme les modèles animaux de diabète, présentent des déficits cognitifs et une susceptibilité aux maladies neurodégénératives plus importants.

Cette étude sera réalisée sur 84 poissons zèbre maximum qui présente l'avantage d'être un modèle simplifié pour la modélisation de maladies humaines, ainsi que pour la découverte et le développement de composés pharmaceutiques. Aujourd'hui, le poisson zèbre est reconnu pour sa pertinence dans l'étude d'un certain nombre de mécanismes physiologiques transposables à l'Homme. Cette étude répond entièrement à la règle des 3R :

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

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

Raffinement : les poissons seront placés dans des conditions optimales (cycle jour/nuit : 14h/10h ; température : 28.5°C ; oxygénation). Les animaux seront nourris 3 fois par jour avec des aliments adaptés (paillettes), et toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale.

2441- Le virus de l'hépatite B (VHB) demeure un problème de santé publique majeur avec plus de 300 millions de porteurs chroniques dans le monde. Les traitements actuels ciblent efficacement l'enzyme polymérase du virus, permettant de contrôler sa réplication tant que le traitement est présent. Cependant ils ne permettent pas à ce jour d'inhiber la production des protéines virales qui exercent toujours leurs effets délétères, ni d'éradiquer le virus chez les patients infectés. Il y a donc nécessité de tester de nouveaux traitements ciblant une autre étape de l'infection.

L'hépatite delta est la forme la moins fréquente des hépatites virales chroniques mais une des plus sévères. Le pathogène responsable est le virus de l'hépatite D (VHD), un virus défectif qui nécessite la présence simultanée d'une infection par le virus de l'hépatite B (HBV) pour sa propagation. On observe depuis plusieurs années une recrudescence des hépatites liées au VHD.

Une infection par le VHD est donc observée uniquement chez les individus qui sont simultanément infectés par le HBV. On estime que globalement 5 à 10% des porteurs du HBV sont co-infectés par le HDV ; c'est-à-dire 15-20 millions de personnes dans le monde.

Les options thérapeutiques pour l'hépatite D chronique restent malheureusement limitées et des aspects importants de la virologie moléculaire, de la pathogenèse et de l'histoire naturelle de ce virus sont encore inconnus.

Les études dans les modèles in vitro d'infection par VHB et VHD de lignées d'hépatocarcinome ou d'hépatocytes en culture primaires sont limitées et ne permettent pas de valider les molécules antivirales candidates en termes de métabolisme et pharmacologie dans un contexte plus élaboré faisant intervenir des paramètres indispensables tels que la structure de l'organe foie, le métabolisme, le système immunitaire entre autres.

Un modèle de souris, dites chimériques, a été développé récemment, dont le foie est constitué d'hépatocytes murins et humains. Ces souris peuvent être infectées par les virus humains hépatotropes, VHB et VHD notamment. Ce modèle peut fournir un support intéressant tester de nouvelles molécules antivirales contre les virus HB et HDV.

En terme de retombées scientifiques, ce projet, mené au sein d'une plateforme de souris humanisées, permettra de répondre à un besoin urgent des académiques et partenaires industriels dans la recherche fondamentale et translationnelle sur les maladies infectieuses ciblant le foie. Les souris sont immunodéficientes (dépourvues de système immunitaire), ce qui permet la xénogreffe de cellules humaines et sont déficientes en une enzyme hépatique. Cette déficience hépatique permet de créer une pression de sélection nécessaire pour la prise de greffe par les cellules humaines (le foie est un organe régénératif, mais sans pression de sélection, les cellules restent quiescentes). La mise à disposition au sein d'une plateforme de souris humanisées d'un tel modèle permet de mutualiser les recherches en offrant aux différents laboratoires un modèle in vivo de pointe. Le nombre d'animaux utilisés par groupe expérimental dans chaque projet suivra l'esprit de la règle des 3R (réduction, raffinement, remplacement). Ainsi, le nombre de souris utilisé dans les protocoles a été optimisé afin d'obtenir des résultats statistiquement valables tout en minimisant leur nombre. Tout au long des expériences, nous veillerons au bien être des animaux et à réduire au maximum la souffrance ou l'angoisse des souris (définition précise des points limites, administration de médicaments pour supprimer la douleur si nécessaire, choix des méthodes d'injections les moins invasives etc..).

Ce projet couvrira les besoins expérimentaux d'au moins 5 équipes travaillant actuellement sur la validation de molécules thérapeutiques. Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est de 3514 souris.

2442- Le cancer est un problème de santé public majeur, touchant un individu sur trois au cours de son existence. Le vieillissement de la population et des modes de vie plus sédentarisés entraînent une augmentation de l'incidence de plusieurs pathologies cancéreuses, ainsi que des coûts supportés par la collectivité. Si des améliorations significatives ont été obtenues au cours des dernières décennies pour le traitement et la prise en charge des patients, le diagnostic du cancer reste une pathologie lourde avec un pronostic souvent très sombre. Les approches immunothérapeutiques ont apporté des avancées récentes remarquables démontrant le potentiel du système immunitaire dans la lutte anti-tumorale. Le développement de vaccins thérapeutiques anti-tumoraux a soulevé un enthousiasme important au vu des excellents résultats obtenus en préclinique, mais a obtenu jusqu'à présent des résultats décevants dans les phases cliniques avancées. Ces études ont permis néanmoins de renforcer nos connaissances des mécanismes immunitaires impliqués dans la réponse et la tolérance lors du développement tumoral.

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

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

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

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

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

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

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

Lorsque nous aurons déterminé quelques formulations avec ou sans adjuvants qui seront capables d'enclencher une réponse satisfaisante, nous compléterons notre approche en comparant leur effet avec ou sans immuno-modulateurs. Ces derniers sont de deux types : anticorps ou cyclophosphamide et seront injectés soit avant soit après la première injection de la formulation selon le mécanisme ciblé.

Nous utiliserons 38 animaux par protocole, répartis en 4 groupes de 8 animaux et d'un groupe contrôle de 6 animaux. Le nombre total d'animaux pour ce projet peut atteindre 2280 animaux, tout en considérant qu'il s'agit d'un maximal et que tous les efforts seront faits afin de déterminer le plus rapidement possible et en utilisant le moins de protocoles possibles, la formulation la plus utile pour le développement en cours.

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

2443- Le cancer est un problème de santé public majeur, touchant un individu sur trois au cours de son existence. Le vieillissement de la population et des modes de vie plus sédentarisés entraînent une augmentation de l'incidence de plusieurs pathologies cancéreuses, ainsi que des coûts supportés par la collectivité. Si des améliorations significatives ont été obtenues au cours des dernières décennies pour le traitement et la prise en charge des patients, le cancer reste une pathologie lourde avec un pronostic souvent très sombre. Les approches immunothérapeutiques récentes ont permis de démontrer le potentiel du système immunitaire dans la lutte anti-tumorale. Le développement de vaccins thérapeutiques anti-tumoraux a soulevé un enthousiasme important au vu des excellents résultats obtenus en préclinique, qui n'ont été cependant confirmés que partiellement dans les phases cliniques avancées. Ces études ont permis néanmoins de renforcer nos connaissances des mécanismes immunitaires impliqués dans la réponse et la tolérance lors du développement tumoral.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nous utiliserons un maximum de 75 animaux par protocole, répartis en 5 groupes de 15 animaux (un groupe contrôle et quatre combinaisons de formulations/adjuvants seront testées en simultané). Le nombre d'animaux pour chaque groupe pourra être réduit après connaissance de la variabilité observée à la suite des premières expériences. Le nombre total d'animaux pour ce projet peut donc atteindre 3795 animaux, tout en considérant qu'il s'agit d'un maxima et que tous les efforts seront faits afin de déterminer le plus rapidement possible et en utilisant le moins de protocoles possibles, la formulation la plus efficace. Il convient donc de signaler que toutes les démarches possibles visant à réduire le nombre de protocoles seront effectuées afin de correspondre aux règles éthiques de réduction du nombre d'animaux utilisés à fin expérimentale. De plus, afin de satisfaire au raffinement, Les animaux seront observés tous les jours. En cas de doute sur l'état des animaux, un suivi de poids quotidien sera mis en place en accord avec les responsables du bien-être animal et la vétérinaire de notre établissement. Ils seront euthanasiés en présence de critères de souffrance.

2444- D'après les estimations, 350 à 400 millions de personnes souffrent d'hépatite B chronique à travers le monde et 600000 décès sont causés par la maladie chaque année. Aujourd'hui, l'hépatite B reste incurable dans la plupart des cas et est responsable d'un nombre important de cirrhoses et de cancers du foie. Les traitements standards actuels, des traitements antiviraux, ne permettent pas aux patients de stabiliser leur maladie. Le taux de guérison, de 3 à 25% selon la population de patients, reste insatisfaisant. De plus, certaines populations présentent des réponses moins bonnes aux traitements (efficacité moindre)

Le projet a pour but de mettre au point des produits d'immunothérapie innovants pour le traitement de l'hépatite B, notamment chez des patients répondant moins bien aux traitements, ainsi que des dispositifs d'injection permettant une réponse immunitaire optimale.

Les produits développés ont pour but d'induire une réponse immunitaire semblable à celle que l'on observe chez les patients qui guérissent spontanément.

Aucun modèle de substitution aux animaux n'est disponible pour répondre aux objectifs du projet, nécessitant un système immunitaire fonctionnel et l'étude du devenir des produits après injection (diffusion de la peau au sang, par exemple)

Le projet nécessitera l'utilisation de 465 cobayes au maximum sur 5 ans, pour l'évaluation de 5 produits. Ce nombre, déterminé comme étant le minimum pour obtenir des résultats scientifiquement exploitable, pourra être réduit en fonction des résultats obtenus, et du nombre de produits réellement évalués.

Le projet porte sur des produits d'immunothérapie et leurs interactions avec de l'immunité déjà acquise: aucune méthode de remplacement des animaux n'est possible.

Durant le projet, les animaux seront hébergés selon les besoins de leur espèce, en groupe avec des éléments d'enrichissement du milieu (cachette, foin, blocs à ronger...).

2445- La thérapie génique offre des perspectives intéressantes pour le traitement de maladies génétiques du muscle. Des virus inactivés et modifiés appelés rAAV sont développés pour la thérapie génique des maladies génétiques car ils sont efficaces et peu inflammatoires. Toutefois, un rAAV optimal pour la correction génique du muscle n'est pas défini. Lorsqu'elles sont administrées in vivo dans un organisme, les rAAV qui sont des particules virales, se heurtent à des mécanismes complexes et à de nombreuses interactions moléculaires qui sont variables en fonction des pathologies et qui déterminent la biodisponibilité et les effets de ces particules. Il n'est pas possible de reproduire cet environnement complexe in vitro sur des cellules en culture. Le modèle souris est donc utilisé pour tester et faire du développement préclinique des rAAV.

Le projet consiste à obtenir des vecteurs AAV ayant une forte capacité à aller dans le muscle squelettique mais pas dans d'autres organes comme le foie.

Ceci sera réalisé en faisant varier les séquences codantes pour la partie externe du virus (sa capsid) qui détermine l'entrée de ce virus dans les cellules. Les différentes particules qui auront été générées seront ensuite sélectionnées in vivo par injection dans des souris dystrophiques puis récupération et ré-amplification des particules ayant acquis un avantage sélectif pour atteindre le muscle malade. Les particules sélectionnées seront ensuite caractérisées afin de confirmer qu'elles représentent de nouveaux outils potentiels pour le transfert de gène dans le muscle dystrophique.

Comme modèle animal, nous utilisons les souris mdx qui sont des modèles de la dystrophie musculaire de Duchenne car, comme les patients atteints de cette maladie, elles présentent une mutation non-fonctionnelle au niveau du gène codant pour la dystrophine. Elles ont un phénotype dystrophique relativement faible.

Trois procédures expérimentales seront nécessaires pour mener à bien ce projet. La première décrira le maintien de la lignée dystrophique Mdx qui a un phénotype dystrophique. Pour les trois ans nécessaires à la réalisation de notre projet, deux tris de souris reproductrices à renouveler tous les 6 mois seront suffisants pour répondre à nos besoins correspondant à 36 souris Mdx progénitrices. La deuxième procédure détaillera la sélection in vivo des variants de la capsid de virus AAV au tropisme redirigé et nécessitera 30 souris saines C57BL/10 et Mdx (soit 60 souris totales). Enfin la troisième procédure analysera in vivo les vecteurs porteurs de capsides modifiées pour évaluer l'efficacité de transduction et de durée d'expression du transgène. 90 souris C57BL/10 et 90 souris Mdx seront nécessaires pour cette 3ème procédure.

Le seul acte expérimental réalisé dans ce projet est l'injection intraveineuse dans la veine de la queue. Ce geste, non douloureux, ne nécessite pas l'utilisation d'anesthésiques ou d'analgésiques.

Par ailleurs, nous augmenterons le bien-être des souris autant que possible par une amélioration de leur condition d'élevage et d'hébergement.

Dans son ensemble, 156 souris Mdx et 120 souris C57BL/10, soient 276 souris, seront utilisées pour cette étude, toutes procédures confondues, sur une période de 3 ans.

2446- Le diabète de type 2 est une maladie très fréquente touchant surtout les individus en surpoids ayant un régime alimentaire déséquilibré. Le régime alimentaire est l'un des principaux facteurs qui contribue à l'obésité et au développement de syndromes métaboliques tels que le diabète de type 2, l'insulino-résistance et l'accumulation de graisse hépatique. L'enjeu est d'identifier les mécanismes cellulaires et les changements protéiques de différents organes dans le développement du diabète de type 2 afin d'en déduire les stratégies thérapeutiques les plus efficaces pour freiner voire stopper la progression de cette pathologie.

Ne pouvant étudier les conséquences d'un régime high fat dans un système de culture cellulaire, les modèles animaux rongeurs sont un outil de référence pour l'étude des mécanismes impliqués dans l'obésité et le diabète de type 2 par leur facile prise de poids lorsqu'ils sont soumis à un régime riche en calories.

Dans cette étude, 16 souris seront soumises à un régime riche en graisses et sucres pour devenir obèses et développer un diabète de type 2 afin d'être utilisées dans le projet. La règle des 3R est appliquée ici pour les principes de réduction et de raffinement. Les animaux seront hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement (bâtons de bois). De plus, une surveillance et une observation des animaux seront réalisées quotidiennement pour détecter et traiter éventuellement tout signe de douleur. Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la structure bien-être animal.

2447- Le diabète est une maladie qui touche environ 350 millions de personnes dans le monde dont près de 3 millions en France. Il existe principalement deux types de diabète : le diabète de type I et celui de type II. Le diabète de type I représente environ 10 % des cas de diabètes en France et dans le monde. D'après nos études récentes chez l'homme, des anomalies apparaissent sur certaines populations de cellules du système immunitaire chez les patients diabétiques. L'objectif de ce projet est donc d'étudier ces populations de cellules et leurs rôles dans le diabète de type I, notamment grâce à différents modèles animaux. Effectivement, il est nécessaire d'utiliser le modèle animal afin de comprendre les interactions entre les différents organes et les mécanismes développés par l'organisme au cours de la maladie.

Le diabète de type I est analysé sur plusieurs lignées de souris transgéniques qui développent spontanément cette maladie. Nous maintenons nos lignées en élevage interne en prenant soin de produire le nombre minimum d'animaux nécessaires au maintien de ces lignées et aux expérimentations. Les animaux sont euthanasiés et nous analyserons les tissus cibles des cellules immunitaires dans différentes lignées. De plus, nous induirons un diabète à certaines souris selon plusieurs méthodes et nous étudierons les organes cibles des cellules du système immunitaire.

Ce projet prévu pour 5 ans nécessitera au total 1337 souris.

Toutes les procédures expérimentales ont été élaborées de manière à utiliser le moins d'animaux possibles qui permettent d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Pour chacune de ces procédures, le bien-être des animaux est surveillé et de l'enrichissement est ajouté dans leurs cages.

Ce projet permettra de mieux comprendre les interactions et les rôles des cellules du système immunitaire dans le diabète de type I afin de pouvoir par la suite, élaborer une thérapie efficace et moins contraignante pour les patients.

2448- *Mycobacterium abscessus* est une bactérie qui cause des infections très graves chez les personnes qui ont la mucoviscidose et qui est de plus en plus prévalente. Cette bactérie est résistante à la majorité des antibiotiques et aucun vaccin la visant n'existe. Il est urgent de trouver de nouvelles molécules actives ou bien de tester des antigènes spécifiques ciblant cette bactérie.

Dans le modèle murin, les infections classiques par voie aérosol (nébulisation) ou intraveineuse (IV) du pathogène opportuniste de la mucoviscidose qu'est *Mycobacterium abscessus* ne permettent pas d'établir une infection chronique. Dans les modèles souris classiques ainsi que dans un modèle de souris mucoviscidose (portant la mutation la plus fréquente de la maladie DF508 sur la protéine CFTR), la bactérie est progressivement éliminée de l'organisme murin au bout de 4 semaines en ce qui concerne l'infection aérosol ou au bout de 45 jours pour les infections IV, et ce malgré les fortes doses d'inoculum utilisées.

Pour essayer d'établir une infection chronique, deux approches (lesquelles peuvent être couplées entre elles) sont envisagées:

- soit d'utiliser un nouveau modèle de souris (C3HeB/FeJ). Cette lignée de souris porte une délétion sur le gène *Ipr1* (Intracellular pathogen resistance 1) situé dans le locus appelé *sst1* (pour super-susceptibility to tuberculosis 1) qui la rend très sensibles aux infections par les mycobactéries et d'autres bactéries (comme *Listeria monocytogenes*).

- soit d'appliquer à ces bactéries un protocole d'infection qui a été développé et a fait ses preuves comme pouvant générer une infection chronique avec un autre pathogène fréquent de la mucoviscidose, *Pseudomonas aeruginosa*. Cette technique repose sur la préparation de billes d'agar contenant les bactéries et qui sont administrées dans les voies respiratoires des souris.

Le projet utilisera 360 animaux au maximum se répartissant en 180 souris Balb/c et 180 souris C3HeB/FeJ. Les animaux seront surveillés quotidiennement par du personnel formé et compétent et les procédures susceptibles de générer de la douleur présentées plus loin décriront les modalités précises de prise en charge du stress et de la douleur chez les animaux utilisés.

2449- L'endocytose est un processus qui permet à la cellule d'internaliser des portions de sa membrane limitante de façon à renouveler cette membrane s'assurant ainsi de son bon fonctionnement. Ces phénomènes d'internalisation permettent également à la cellule de se nourrir en internalisant des nutriments du milieu extérieur. Les cellules cancéreuses ont des besoins énergétiques totalement différents des cellules normales et il est vraisemblable qu'elles doivent également adapter leur nutrition et donc potentiellement leur capacité d'endocytose. A ce jour, la dynamique et l'organisation des voies d'endocytose ont été principalement étudiées *in vitro*. Ainsi, il n'est pas connu si les changements associés au microenvironnement cellulaire, et particulièrement dans les cancers, modifient les capacités d'endocytose.

La seule étude publiée jusqu'à présent et rapportant la cinétique d'endocytose *in vivo* (dans la glande salivaire de rat), a montré que l'endocytose est beaucoup plus lente que celle observée dans des lignées cellulaires en culture. Ceci démontre que dans le contexte *in vivo* d'un organisme entier, le phénomène est différent, et que par conséquent, le contexte cellulaire est artificiel et ne correspond pas à la réalité. Ainsi, l'utilisation puis la purification de cellules mêmes primaires ne permettent pas de reproduire les conditions environnementales qui existent *in vivo*. Le recours à l'animal est donc obligatoire pour élucider ce phénomène dans le seul contexte pertinent qui est celui d'un organisme entier.

Notre objectif est ainsi de comparer la dynamique de l'endocytose in vivo et in vitro. De plus, nous analyserons également comment des changements de l'environnement matriciel (fibrose) ou la survenue de cancer (hépatocarcinome) affectent l'endocytose. Dans ce projet, nous allons utiliser la microscopie intravitale pour étudier la dynamique des puits recouverts de clathrine (PRCs) qui sont les structures membranaires supportant l'endocytose.

Ce projet vise à comprendre la dynamique de formation et de régulation de l'assemblage des puits recouverts de clathrine (PRCs) in vivo dans les hépatocytes du foie de souris et à déterminer comment le microenvironnement ou l'état tumoral modifie cette dynamique. Nous allons utiliser la technique de l'injection hydrodynamique de vecteurs plasmidiques nus codant pour des marqueurs fluorescents des puits recouverts de clathrine permettant de suivre AP2 in vivo par des expériences de microscopie biphotonique directement sur le foie. Cette procédure sera appliquée à des souris contrôles ou i) à des souris présentant un foie fibrotique ou ii) à des souris développant un hépatocarcinome. Quand une chirurgie est nécessaire, pendant les trois jours après la chirurgie, de la buprénorphine (0.3 mg/kg) et de la tolfédine (0.06 mg/kg) seront administrés par voie sous-cutanée toutes les 12 heures.

L'analyse in vivo de la dynamique des PRCs sera suivie de l'isolement des hépatocytes en vue de leur mise en culture pour analyse de la dynamique des puits recouverts de clathrine in vitro sur ces mêmes hépatocytes. Cette stratégie d'optimisation (raffinement) permet aussi de réduire le nombre d'animaux utilisés pour comparer l'endocytose in vivo et in vitro. De plus, des procédures spécifiques sont prévues pour atténuer la douleur et le stress potentiellement induit par les différentes procédures.

Des études précédentes sur nos différents projets ont permis de déterminer le nombre minimum de souris à utiliser afin d'évaluer de façon correcte les paramètres observés. Les analyses statistiques sur les paramètres mesurés sur ces groupes de petite taille seront réalisées par un test non paramétrique de type Mann-Whitney. L'ensemble de ce projet nécessitera au maximum l'utilisation de 120 souris.

2450- Une société spécialisée dans le développement d'équipements médicaux a mis au point un stimulateur cardiaque implantable sans sonde. Il s'agit d'une capsule miniaturisée directement implantée sur la paroi ventriculaire. Il s'agit d'une avancée technologique et médicale majeure qui va permettre de s'affranchir des complications induites par les sondes. En effet, la stimulation cardiaque traditionnelle fait appel à l'implantation de sondes (fils électriques) intravasculaires définitives qui permettent la délivrance d'impulsions électriques cardiaques par le stimulateur auquel elles sont connectées. Ces sondes vont progressivement être incluses par l'organisme dans les parois veineuse et myocardique ce qui rend leur extraction très difficile et risquée. Avec le temps, la probabilité de dysfonction et/ou d'infection de ce matériel étranger augmente, alors que leur difficulté d'extraction augmente également. Cette problématique des sondes de stimulation représente une réelle limite, notamment pour les patients les plus jeunes, candidats à une stimulation à vie. Par ailleurs, le boîtier de stimulation conventionnel, placé en position sous-cutanée présente lui aussi une probabilité d'infection qui augmente avec le temps.

La capsule de stimulation développée permet d'éliminer cette morbidité induite par les sondes. Sa mise en place est totalement différente de la mise en place d'un stimulateur conventionnel. En particulier, elle est réalisée par voie fémorale, à l'aide d'un cathéter dédié. Le bon positionnement et l'accroche du système doivent être impérativement contrôlés durant l'implantation puisque la capsule est ensuite abandonnée, sans possibilité de repositionnement. Les premiers essais humains ont pu montrer que cette nouvelle technique d'implantation était accompagnée d'un sur-risque d'effraction péricardique par rapport à la technique conventionnelle. Une formation dédiée et encadrée paraît donc indispensable, pour les cardiologues désireux d'implanter ces nouveaux stimulateurs. Afin de réduire la douleur et l'angoisse, le projet sera réalisé sous anesthésie générale avec une prise en charge optimale des animaux.

De par ses caractéristiques anatomiques et son métabolisme proches de ceux de l'homme, l'espèce porc a été identifiée comme le meilleur modèle pour ce projet d'enseignement. Les enseignements, répartis sur une période de 5 ans, à raison de 12 sessions par an, représentent une utilisation de 120 animaux.

2451- Les évolutions actuelles du coût, de l'origine et de la disponibilité des matières premières font qu'il devient de plus en plus important d'améliorer l'efficacité digestive des animaux, afin que ces nouvelles matières premières puissent être sans difficulté incorporées à leur régime alimentaire. Pour répondre à cette question et étudier le déterminisme génétique de ce caractère, nous avons sélectionné avec succès pendant 8 générations deux lignées divergentes de poulets sur leur efficacité digestive. Ces lignées sont depuis reproduites sans sélection supplémentaire sur l'efficacité digestive. Cependant, après 19 générations, la consanguinité a augmenté dans ces lignées, ce qui conduit à une détérioration du bien-être animal et à une dégradation des performances de reproduction. L'objectif de ce projet est donc d'introduire des animaux nouveaux dans les lignées afin de faire baisser la consanguinité. Néanmoins, ces nouveaux animaux n'auront pas été sélectionnés sur l'efficacité digestive et leur introduction va donc diminuer l'écart d'efficacité digestive entre les 2 lignées. Dans un second temps, il sera donc nécessaire de renouveler le processus de sélection pendant 4 générations afin de rétablir l'écart entre les 2 lignées.

La première phase (réintroduction d'animaux nouveaux) portera sur 72 femelles (1 femelle extérieure par coq) afin de permettre de sélectionner les 40 aux performances d'efficacité digestive les plus extrêmes pour la reproduction (1 femelle par coq). Pour la seconde phase, 432 animaux seront mesurés à chaque génération, afin de fournir une base de sélection suffisamment large pour permettre un processus de sélection efficace et limité dans le temps (4 générations). Au total, 1828 animaux seront utilisés.

Respect de la règle des 3R :

- Remplacer : Pour sélectionner sur l'efficacité digestive, il faut disposer des mesures sur les animaux et le modèle le plus adapté pour l'évaluer sur le poulet est le poulet lui-même

- Réduire: des calculs statistiques ont été effectués pour estimer le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de cette expérience
- Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions comparables à celles des poulets d'élevage et le placement en cage individuelle est limité à la durée de la mesure de l'efficacité digestive

2452- Les réactions dites « bioorthogonales » sont des réactions chimiques qui peuvent avoir lieu dans un milieu biologique complexe sans interférer avec les processus biochimiques natifs. Nous proposons de profiter de caractère non-invasif et inerte de ces réactions pour cibler, inactiver et éliminer un médicament circulant chez l'animal vivant. Le contrôle de la biodisponibilité des composés pharmacologiques peut être critique pour la survie des patients. Chez les personnes traitées avec des composés anticoagulants, tel que le Coumadine® (Warfarin), il peut s'avérer nécessaire d'éliminer rapidement ce composé pour permettre une intervention chirurgicale urgente. Dans ce but Coumadine®, un médicament déjà utilisé chez l'humain a été convenablement fonctionnalisé afin de permettre une modification *in vivo* par la réaction chimique du type « click ». Ce médicament modifié sera administré chez l'animal (per os, injections intra-péritonéales) afin d'évaluer son activité pharmacologique d'anticoagulant. Nous souhaitons ensuite étudier la modification chimique de ce médicament *in vivo* par chimie click afin de l'inactiver ou de l'éliminer rapidement de l'organisme.

Pour étudier l'activité anticoagulante et élimination de cette activité, il est indispensable d'utiliser comme modèle un animal dans son ensemble et sa complexité (activité de Coumadine® nécessite sa métabolisation dans le foie). Le remplacement par des modèles alternatifs n'est pas possible.

Pour réduire le nombre d'animaux dans les analyses pilotes, nous allons réutiliser des animaux de type sauvage précédemment mis en jeu dans des projets impliquant des procédures légères et destinés au sacrifice (à l'exception d'animaux utilisés dans des projets pharmacologiques). La taille des groupes expérimentaux sera fixé à n=6 animaux/traitement (taille validée pour les autres analyses biochimiques ainsi que pour les études pharmacocinétiques) et pourra être réduit en fonction de la variabilité biologique observée. Au total 180 souris seront utilisées dans ce projet.

Dans le cadre de raffinement, la toxicité *in vitro* des nouvelles molécules sera préalablement testée avant de les administrer chez l'animal vivant. En absence de toxicité, nous pourrions procéder au traitement de l'animal (per os, injections intra-péritonéales et/ou en sous cutané) et aux analyses. Afin d'éviter les souffrances, l'état de l'animal sera suivi après administration des composés. L'identification de symptômes de détresse entraînera l'élimination du composé correspondant des tests. Les techniques standards de prélèvements permettront d'obtenir des échantillons sanguins, alors que les tissus seront prélevés post-mortem.

2453- L'objectif général du projet est de déterminer les mécanismes responsables de la coexistence d'espèces amphibiennes dans des réseaux de mares : une espèce invasive, l'écrevisse de Louisiane (*Procambarus clarkii*), et un cortège d'espèces patrimoniales (protégées), les amphibiens. Ces travaux s'inscrivent dans le domaine de l'écologie appliquée et la combinaison des résultats attendus sera en mesure d'apporter une contribution à la conservation des amphibiens. Le projet comprend trois axes complémentaires dont deux, dispersion et interactions trophiques, nécessitent des procédures expérimentales conduites sur des amphibiens.

Les travaux seront réalisés en milieu naturel et nécessitent donc par essence d'utiliser les espèces concernées par le projet (règle du "remplacement"). Des interventions légères seront pratiquées sur certains amphibiens permettant alors de les relâcher immédiatement sur site. La première procédure expérimentale a pour finalité de préciser le degré de connectivité qui relie les mares entre elles (identifier et quantifier les échanges d'amphibiens entre populations). Des suivis de déplacements individuels de triton marbré par capture/marquage/recapture seront réalisés dans un réseau de mares. Pour cela, un transpondeur passif est injecté sous la peau au niveau du flanc, une technique de marquage peu invasive, efficace et pérenne. La seconde procédure expérimentale vise à fournir des échantillons pour l'étude des interactions trophiques entre espèces dans des contextes environnementaux variés, par l'analyse d'isotopes stables. L'enjeu est de développer une méthode non invasive de prélèvement de tissu chez les amphibiens. Si les tests en cours s'avèrent concluants, la procédure consistera à l'avenir à effectuer la biopsie d'une partie de nageoire caudale des amphibiens, organe transitoire chez ces espèces. Pour ces deux procédures, les animaux seront anesthésiés localement (anesthésie topique) et les conditions d'asepsie (désinfection du matériel et de la zone d'injection/incisée) seront respectées à la fois pour éviter la transmission de chytridiomycoses et pour garantir la bonne cicatrisation des tissus superficiels à la suite des interventions. Aucun amphibien ne sera euthanasié ou handicapé par les procédures (règle du "raffinement").

Le nombre d'animaux considéré correspond à l'effectif minimum requis pour réaliser des analyses statistiques fiables permettant ainsi de répondre aux différentes questions du projet à une échelle d'étude pertinente (réseau de mares). Le nombre de tritons marbrés adultes marqués ne dépassera pas 1500, l'objectif étant de transponder entre 20 et 50 tritons/mare (selon la taille des populations) sur une petite entité représentative de la zone d'étude comportant une trentaine de mares colonisées par cette espèce. L'enjeu est d'apprécier la dispersion des reproducteurs entre les mares, aussi il importe de recapter un nombre suffisant d'individus. L'étude des réseaux trophiques doit englober les principales configurations de complexité des communautés animales présentes (notamment avec/sans écrevisses), un minimum d'un réplicat par modalité de mares étant nécessaire. Pour chaque mare étudiée, une biopsie sera réalisée sur 5 à 10 individus par espèce parmi les têtards d'anoues (grenouille agile, grenouille verte, crapaud épineux et rainette verte), les larves et adultes de tritons palmé et marbré, soit un total inférieur à 500 biopsies. L'effectif maximum d'animaux utilisés n'excédera donc pas 2000 et le principe de mutualisation entre les deux procédures sera appliqué de façon à réduire autant que faire se peut le nombre d'animaux manipulés (règle de la "réduction").

Une très bonne connaissance de la zone d'étude ainsi qu'une expérience dans la manipulation des amphibiens et la pratique des interventions susmentionnées sont autant d'éléments que les opérateurs de terrain sauront mettre à profit lors des sessions de terrain, et ce dans l'optique d'atteindre les objectifs fixés dans le respect des animaux.

2454- La mort subite d'origine rythmique est à l'origine de 350 000 décès par an en Europe. La fibrillation atriale est le trouble du rythme de l'adulte le plus fréquent dans le monde, avec une prévalence vie-entière de 15% dans notre pays. Ces deux pathologies ont comme dénominateur commun des anomalies de fonctionnement électrique des cellules du cœur.

La cartographie optique est la meilleure technique existante pour étudier l'électrophysiologie cardiaque, et notamment les phénomènes de repolarisation. Ces phénomènes sont encore mal compris, et fortement soupçonnés d'être impliqués dans les deux pathologies citées ci-dessus.

L'étude de ces phénomènes est particulièrement difficile puisque l'outil expérimental utilisé à cet effet (la cartographie optique) nécessite un arrêt mécanique du cœur. Pour cette raison, les enregistrements des précédents travaux ont eu lieu sur des cœurs explantés, donc dans des situations bien loin de la physiologie.

Notre projet consiste en l'étude de faisabilité d'un modèle plus proche de la physiologie qui nous permettra ensuite dans un second temps d'étudier l'impact du système nerveux autonome sur les troubles de repolarisation et le déclenchement d'arythmies atriales et ventriculaires.

Pour cela, nous mettons en place un système de circulation extra-corporelle sur le gros animal, permettant un arrêt cardiaque mécanique sans modification de la physiologie circulatoire ou de l'innervation cardiaque.

L'objectif de notre équipe à plus long terme est d'amener les techniques de cartographie optique vers la clinique, ce qui nécessite de développer des outils de visualisation spécifiques (fibroscopes à ballon, etc.). Ce modèle expérimental nous permettra de tester ces outils en développement.

L'anatomie, le métabolisme et l'électrophysiologie cardiaque du porc étant proche de celle de l'homme, nous avons choisi ce modèle. Ce type d'expérience n'est pas possible sur petit animal, pour plusieurs raisons :

- 1) La physiologie des troubles de la repolarisation et des arythmies est très différente de l'homme car très taille-dépendante
- 2) La mise en place d'une double circulation extra-corporelle chez le petit animal est quasiment impossible techniquement
- 3) Les outils de visualisation spécifiques que nous développons ont comme ambition d'être utilisés en clinique, et leurs dimensions sont adaptées à l'homme, nécessitant donc forcément un gros animal pour leur développement

Dans cette première phase de mise au point du modèle et d'évaluation des outils déjà disponibles, nous estimons que 16 animaux seront nécessaires. Ce nombre a été estimé de la manière suivante :

1) 4 animaux seront utilisés pour mettre au point le montage chirurgical. Cette partie sera supervisée par un chirurgien cardiaque clinique du CHU, ou l'on sait que le taux de complication est très faible (environ 1%). Cependant, la double circulation extracorporelle mise en place est spécifique à notre montage expérimental et nécessitera donc une optimisation et des vérifications spécifiques.

2) 4 animaux seront utilisés pour la mise au point des enregistrements de cartographie optique épicaudiques (placement des caméras, angle de vue, dosage des colorants potentiométriques et des agents de découplage)

3) 8 animaux seront utilisés pour la mise au point des enregistrements de cartographie optique endocardique avec les outils disponibles (fibroscope à ballon) dans différentes configurations : différents colorants, présence ou non d'agents de découplage

L'ensemble du protocole nécessite une chirurgie lourde qui sera réalisée sous anesthésie générale avec un niveau de sédation comparable à celui utilisé en clinique chirurgicale chez l'homme. L'arrêt mécanique du cœur nécessaire aux enregistrements fait de cette procédure une procédure terminale.

2455- Notre projet vise à développer et comparer deux modèles expérimentaux de xénogreffes de carcinomes hépatocellulaires humains chez la souris immunodéficente. Celui-ci s'inscrit dans le cadre d'un consortium national de recherche, multi-équipes, et permettra de sélectionner plus facilement de nouveaux traitements efficaces contre au moins 8 pathologies cancéreuses. Notre équipe de recherche qui travaille sur les cancers primitifs du foie, est en charge d'établir les modèles de cancer hépatique à partir de fragments tumoraux frais provenant de patients atteints de cancer hépatocellulaire.

Nous comparerons 2 modèles expérimentaux (greffe sous-cutanée ou orthotopique) afin de sélectionner le modèle reproduisant le plus fidèlement possible la pathologie humaine. Les procédures expérimentales de xénogreffe sous-cutanée dans le flanc ou de xénogreffe orthotopique dans le foie des souris immunodéficientes, se feront dans le respect de la règle des 3R.

Concernant le remplacement, les besoins de la recherche en matière d'accès à des échantillons humains, dans le cadre du développement de thérapies ciblées, ont considérablement augmenté au cours de la dernière décennie. La création et l'entretien d'une banque de tissus humains comportant un certain nombre d'échantillons passés chez l'animal, règle le problème de la disponibilité du matériel biologique et donc de la pérennité des outils ainsi générés. Le maintien in vivo et la transplantabilité de tumeurs humaines sur animal immunodéficient constitue un matériel indispensable pour tester l'efficacité de nouvelles modalités thérapeutiques. En effet, à ce jour, seuls les modèles primaires, c'est-à-dire directement développés à partir d'échantillons tumoraux humains, peuvent permettre d'orienter de manière prédictive, et ce très tôt dans le processus de développement, une nouvelle thérapie anticancéreuse.

Concernant le raffinement, toutes les procédures expérimentales seront réalisées sur des souris anesthésiées. Nous utiliserons deux types d'analgésiques (opiacé et anti-inflammatoire non stéroïdien) avant le réveil des souris et 72h post-chirurgie. De plus, les animaux seront hébergés dans des conditions optimales (enrichissement des cages avec des morceaux de coton) pour

augmenter autant que possible leur bien-être et éviter leur éventuel inconfort et/ou angoisse. Les animaux seront observés quotidiennement et ce, pendant toute la durée de l'expérience.

Enfin concernant la réduction, nous utiliserons le nombre minimal de souris permettant le succès des greffes et donc l'établissement de modèles représentatifs des carcinomes hépatocellulaires humains. Sur 3 ans, nous évaluons le nombre de souris immunodéficientes nécessaires à l'établissement des modèles de carcinomes hépatocellulaires humains représentant la diversité clinique des tumeurs, à 576 souris maximum. Nous pensons, en effet, greffer en sous-cutanée et en orthotopique, 8 tumeurs humaines par an. Pour chaque tumeur greffée, 8 souris sont nécessaires par passage. Deux passages de tumeurs seront réalisés. C'est pourquoi, 24 souris au maximum seront nécessaires par tumeur humaine xénogreffée. On a donc besoin de 24 tumeurs * 24 souris soit 576 souris au maximum et au total pour mener à bien ce projet.

2456- Les infections bactériennes pulmonaires posent des problèmes thérapeutiques car certaines souches sont résistantes aux antibiotiques et ceux-ci diffusent mal dans les sites infectés.

Malgré le développement d'antibiotiques à nouveaux modes d'action et d'administration, aucune solution performante n'a été découverte. Le développement de nouveaux types de traitements antibactériens apparaît alors comme une solution séduisante. Ils seraient une alternative permettant d'économiser l'arsenal antibiotique et constitueraient un dernier recours face aux bactéries multi-résistantes. Leur administration par voie pulmonaire permettrait leur concentration dans certaines zones atteintes souvent difficiles d'accès aux traitements.

Un nouveau traitement antibactérien efficace contre plus de 500 souches d'une bactérie connue pour être multi-résistante a été développé par des collaborateurs privés. Le projet vise à comparer, chez la souris, l'efficacité de ce traitement avec celle d'antibiotiques de référence ; à établir la preuve de concept de l'intérêt de ce médicament inhalé pour traiter certaines infections bactériennes respiratoires aiguës ; et à apporter une partie des prérequis techniques et des arguments scientifiques pour établir un dossier réglementaire pour débiter des essais cliniques chez l'Homme. Le but à long terme est de développer un médicament permettant de lutter contre les infections pulmonaires à germes résistants aux antibiotiques, préoccupations majeures en santé humaine.

Le projet est organisé en 5 étapes : 0) mise au point d'un modèle animal d'infection bactérienne pulmonaire aiguë en se basant sur les données de la littérature; 1) examiner l'efficacité du médicament dans le modèle établi ; 2) étudier la relation entre le devenir du médicament et l'efficacité thérapeutique ; 3) optimiser le schéma d'administration à partir des résultats des étapes 1 et 2 ; 4) étudier l'innocuité et le devenir du médicament chez la souris saine comme le recommandent les instances réglementaires.

Le nombre de souris nécessaires pour mener à bien ce projet est estimé à 398.

Les expérimentations ont été planifiées selon la règle des « 3R ». Remplacer : les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité d'un organisme entier (réponse thérapeutique à une infection) et sont insuffisants pour envisager des essais cliniques chez l'Homme. Les modèles murins d'infection pulmonaire sont relativement bien établis et permettent de mimer le phénomène observé chez l'Homme. Réduire : les expériences ont été planifiées dans un ordre précis pour pouvoir réduire le nombre d'animaux. La souche bactérienne utilisée est bioluminescente, ce qui permet de suivre l'infection par imagerie pour éviter le sacrifice d'animaux à chaque temps. Le nombre minimal d'animaux pour obtenir des résultats robustes a été calculé en fonction des tests statistiques utilisés et de la survie attendue des animaux. Raffiner : les administrations seront réalisées sous anesthésie. Les animaux seront élevés en communauté dans des cages enrichies avec du sopalin et des fragments de boîtes à œufs et surveillés quotidiennement.

2457- Améliorer les capacités d'adaptation des poulets à la variabilité du climat et de l'alimentation est une exigence pour nourrir une population humaine en croissance constante, tout en garantissant le bien-être des animaux d'élevage.

Ce projet vise à améliorer la compréhension globale du contrôle génétique de l'adaptation à la chaleur et à une alimentation sub-optimale de la poule pondeuse.

Le projet s'appuie sur différentes lignées expérimentales de poulets qui diffèrent par leur niveau de production, leur métabolisme et leur aptitude adaptative à la chaleur, maximisant l'éventail des réponses au stress. Plus précisément, deux lignées (R+ et R-), qui diffèrent pour l'efficacité de l'utilisation de l'énergie ingérée, une race égyptienne, la Fayoumi, qui est connue pour être tolérante à la chaleur et résistante aux maladies, et une lignée de pondeuses à l'emplumement réduit, la DWNANA, qui présente une dissipation corporelle de la chaleur plus performante. Une lignée commerciale pure de poules pondeuses plus productive mais plus sensible à des variations environnementales sera aussi étudiée.

Nous nous sommes focalisés sur 2 principaux facteurs de stress en élevage : 1/ la chaleur, car l'élevage avicole est particulièrement vulnérable aux coups de chaleur saisonniers; 2/ l'alimentation sub-optimale incluant des matières premières alternatives.

Pour étudier l'adaptation à la chaleur ou aux changements alimentaires, nous proposons une approche globale incluant un large nombre de phénotypes de production et qualité des produits, de réponses métaboliques et une analyse des changements à l'échelle génomique. Pour cela des prises de sang seront réalisées au début du stress et à la fin de la période de stress. Dix animaux par lignée expérimentale et 30 pour la lignée commerciale, pour chaque condition expérimentale (total de 160 animaux) seront ensuite euthanasiés en vue de prélèvements et analyse d'expression de gènes. Le reste des animaux (780) sera gardé jusqu'à l'âge de 43 semaines; des caractères de production et de qualité des produits seront étudiés pour mesurer la capacité des animaux à récupérer après une période de stress.

Respect de la règle des 3R :

- Remplacer : Pour évaluer les capacités d'adaptation des poulets à la variabilité du climat, il faut disposer des mesures sur les animaux et le modèle le plus adapté pour l'évaluer sur le poulet est le poulet lui-même
 - Réduire: des calculs statistiques ont été effectués pour estimer le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de cette expérience
 - Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions comparables à celles des poulets d'élevage et les prises de sang limitées sont réalisées par du personnel compétent
- Total de 940 animaux adultes utilisés dans le projet, sur 5 ans.

2458- Les coccidioses représentent le premier fléau parasitaire de l'aviculture conduisant à d'importantes pertes économiques de plus de 1,5 milliards d'euros dans le monde et par an. Ces maladies infectieuses sont provoquées par la multiplication de parasites protozoaires du genre *Eimeria*. Une fois ingérés, ces parasites envahissent les cellules intestinales et se multiplient massivement avant d'être excrétés sous forme d'oocystes.

Les pertes de production observées dans les élevages avicoles sont principalement dues à une morbidité qui se traduit par une malabsorption, une faible croissance et une mauvaise efficacité alimentaire chez le poulet de chair.

La prophylaxie repose principalement sur l'administration d'anticoccidiens dans l'aliment des animaux pendant toute la durée de l'élevage. Cependant, l'apparition de résistances aux anticoccidiens souligne la nécessité de trouver des moyens de lutte alternatifs : nouvelles formulations vaccinales ou nouvelles cibles thérapeutiques.

Des études sont menées au sein de l'équipe afin de mieux comprendre le cycle biologique des parasites et les mécanismes moléculaires et immunitaires impliqués dans leur interaction avec leur hôte. Ces études s'intéressent spécifiquement aux ADN, ARN et protéines exprimées par les parasites ou leur cellule hôte. Les parasites doivent être obtenus en quantité suffisante par multiplication *in vivo* sur poulet selon des protocoles établis dans le respect de la règle des 3R :

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés varie entre 2 et 50 par protocole. Il dépend de la prolificité de la souche et du nombre de parasites requis. Pour les souches utilisées au laboratoire, il est possible de déterminer le nombre de parasites produits par animal en fonction de la dose inoculée. Les expériences sont organisées pour optimiser l'utilisation des parasites et utiliser le moins d'animaux possible.

Raffiner : Le degré de pathogénicité est dépendant de l'espèce inoculée. Chaque inoculum fait l'objet d'une attention particulière pour administrer des doses définies et adaptées en fonction de l'espèce présente et ainsi éviter toute pathogénicité. Même si la dose est calculée de manière à ne pas induire de pathogénicité, nous restons cependant vigilants à l'état de santé des animaux : après inoculation de l'agent infectieux, une visite quotidienne est réalisée dans la salle expérimentale afin de surveiller l'éventuelle apparition des premiers symptômes liés à la maladie.

Remplacer : Les parasites du genre *Eimeria* sont spécifiques d'espèces hôtes. Dans le cadre de nos études, le poulet est l'espèce animale de choix. Jusqu'à présent, aucune stratégie efficace ne permet de les multiplier dans des systèmes cellulaires *in vitro*.

Ce projet sur 5 ans permettra de maintenir les différentes souches parasitaires disponibles au sein de l'équipe, le nombre d'animaux est estimé à 700 par an, soit 3500 sur la durée du projet.

2459- Cette étude s'inscrit dans le cadre du projet précédent.

Initialement les tumeurs exprimant la cible étudiée, devaient être implantées chez des souris NMRI nudes. Il n'y a eu aucune prise tumorale dans les 24 souris NMRI nude implantées. C'est pourquoi, nous proposons de tester la prise tumorale de deux lignées cellulaires exprimant la cible, dans des modèles croissants d'immunodéficience :

1-Implantation de la 1^{ère} lignée dans n=8 souris NOD SCID.

2-Si le résultat s'avère négatif (c'est à dire si nous constatons moins de 70% de prise tumorale), nous proposons d'implanter cette première lignée dans n=8 NOD SCID, préalablement irradiées.

3-Si cette première lignée ne présente toujours aucune prise tumorale, nous testerons une deuxième lignée cellulaire. Implantation de la 2^{ème} lignée dans n=8 souris Balb nude irradiée.

4-Si le résultat s'avère négatif (c'est à dire si nous constatons moins de 70% de prise tumorale), nous proposons d'implanter cette deuxième lignée dans n=8 NOD SCID, préalablement irradiées.

Afin d'effectuer ces tests, nous utiliserons, au maximum, 24 souris NOD SCID et 8 souris Balb/c nude.

A ce stade du projet, il est indispensable d'intégrer le fait que les cellules se développent dans un organisme vivant. Le modèle murin nous semble le plus approprié, il permet de se rapprocher d'un grand nombre des caractéristiques de la pathologie humaine. Les tests *in vitro* nous ont permis de réduire un maximum le nombre de lignées que nous souhaitons tester *in vivo*. De plus, l'approche statistique et l'expérience de l'équipe dans ce domaine, nous permet de réduire le nombre d'animaux au minimum afin d'obtenir des résultats exploitables. Afin d'employer au mieux les animaux, le protocole présenté a été optimisé afin d'obtenir le maximum d'informations sans augmenter la douleur infligée aux animaux.

2460- Le virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse (vNPI) est responsable de morbidités et de mortalités récurrentes en élevages de salmonidés et est extrêmement difficile à éradiquer. Aucun traitement ou vaccin n'est actuellement disponible en France pour lutter contre ce pathogène. La présence potentielle de ce virus, notamment dans les œufs, est un frein au développement commercial des entreprises du fait des exigences sanitaires de plus en plus fortes de leurs clients. Des outils de diagnostic existent mais seraient à optimiser pour permettre un contrôle plus systématique des œufs. A ce jour, la diversité et la virulence des souches virales de NPI circulantes en France sont très peu connues. Plusieurs études ont mis en évidence qu'il existait des possibilités d'amélioration génétique de la résistance au vNPI chez le saumon et les travaux menés ces dernières années dans ce sens ont largement contribué à la réduction observée de 75% du nombre d'épidémies de vNPI en

Norvège entre 2009 et 2013 chez cette espèce. Chez la truite arc-en-ciel (TAC), des travaux préliminaires ont démontré que le même type de processus de sélection pouvait être envisagé.

Dans ce contexte, le travail proposé a pour objectifs i) d'avoir une meilleure connaissance de la diversité des souches de vNPI présentes sur le territoire en réalisant une comparaison des séquences génétiques et en évaluant les niveaux de virulence de différents isolats issus de TAC ; ii) de poser les bases d'une sélection sur la résistance à ce virus de familles commerciales de TAC dans le cadre de challenges infectieux réalisés en conditions contrôlées. L'amélioration de la résistance par sélection visera à accroître progressivement la survie moyenne de la population en challengeant à chaque nouvelle génération les descendants issus des meilleures familles. Les retombées attendues à terme sont une meilleure connaissance de la variabilité génétique virale, une amélioration du bien-être des animaux et de la résistance des lignées commerciales, une diminution des coûts de production ainsi qu'une avance technologique des entreprises françaises face aux investissements publics étrangers concurrents.

Le critère de mortalité utilisé pour répondre aux objectifs fixés ne permet pas de remplacer les animaux mais les procédures expérimentales ont été élaborées afin de réduire au maximum leur nombre. Le nombre d'alevins (<10g) nécessaires pour l'évaluation de la virulence des souches sera au maximum de 4500. La réalisation des infections expérimentales à raison de 3 répétitions pour une souche testée (triplicat) répond aux exigences statistiques et intègre la variabilité inter-bacs fréquemment observée. Sur la base de travaux publiés de simulation visant à minimiser le nombre de poissons à utiliser tout en disposant de données utilisables, un total de 9000 alevins sera nécessaire pour la phase de sélection génétique (3 expérimentations étalées dans le temps sur 3000 poissons). Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions d'hébergement limitant l'angoisse potentielle des animaux (volume d'eau adapté avec renouvellement en continu, rythme jour/nuit naturel, ...) L'infection par balnéation sera également privilégiée par rapport à l'injection.

2461- Au cours de ces dernières années, de nombreux travaux ont été conduits chez l'homme et des modèles murins (rats, souris) et lémuriens sur le rôle des acides gras polyinsaturés n-3 à longue chaîne (AGPI n-3 LC) dans le développement et le fonctionnement du cerveau. Chez l'homme, de faibles teneurs du cerveau ou du sang en AGPI n-3 LC ou un ratio AG n-6/AG n-3 supérieur à 5 sont associées à des problèmes d'apprentissage et de mémorisation, des défauts d'attention, une plus grande réactivité au stress, une hyperactivité, une augmentation de l'activité locomotrice et des comportements agressifs. Après éclosion, les canetons sont confrontés à différents types de stress : manipulations pour le sexage, vaccination, époutage et mise en boîte, transport, exposition à des variations de température et d'éclairage. Ces stress selon leur amplitude et selon la capacité d'adaptation des animaux peuvent avoir des répercussions négatives sur les performances de croissance des canetons pendant leur phase de démarrage voire toute leur période d'élevage. En cours d'élevage, les canards peuvent exprimer aussi des comportements tels que le picage qui peut s'apparenter à un comportement agressif et qui a des effets délétères plus ou moins importants sur les performances de croissance, le bien-être et la santé des animaux, voire sur la qualité des carcasses après abattage. Au vu de leur effet positif sur le développement et le fonctionnement du cerveau des mammifères, un apport en AGPI n-3 LC au cours des premières semaines d'élevage sera testé sur les capacités de réactivité au stress et le comportement des canards en élevage. Cela pourrait s'avérer un moyen supplémentaire d'accroître la robustesse des canetons et de prévenir les problèmes de picage. Réduction : pour limiter le nombre d'animaux mis en élevage, l'expérimentation ne portera que sur des canards de Barbarie mâles (192 au total) chez qui l'occurrence du picage est plus élevée. Remplacement : compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico. Raffinement : les canards 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.

2462- Le bloc auriculo-ventriculaire (BAV) complet correspond à l'interruption de la conduction électrique entre les oreillettes et les ventricules du cœur. La forme la plus classique est le BAV dégénératif de l'adulte, mais il existe des formes congénitales. Le BAV congénital est une pathologie cardiaque rare. Il entraîne une fréquence cardiaque trop basse pouvant conduire à l'insuffisance cardiaque et au décès. Le seul traitement est l'implantation d'un pacemaker assurant une stimulation cardiaque permanente, classiquement ventriculaire droite. Celui-ci permet ainsi de maintenir une fréquence cardiaque compatible avec une vie normale. La stimulation ventriculaire droite apicale entraîne une modification de l'activation électrique des ventricules. Cette activation ne passe plus par les voies électriques habituelles qui assurent une activation simultanée des deux ventricules. Lorsque la stimulation est délivrée sur le ventricule droit par le pacemaker, elle l'active, mais ce n'est que dans un deuxième temps que l'activation se propage au ventricule gauche dont la contraction est donc décalée par rapport au ventricule droit (on parle d'asynchronisme d'activation ventriculaire). Sur une population d'enfants appareillés d'un pacemaker pour BAV congénital, notre équipe a mis en évidence une altération de la fonction cardiaque au long cours suggérant un effet délétère de la stimulation ventriculaire droite. Cette hypothèse n'a pas été validée à ce jour. Ce projet a pour but de caractériser les modifications de structure et de fonction des ventricules induites par la stimulation chronique ventriculaire droite sur un modèle porcin de BAV congénital en croissance. Seize porcelets de 4 semaines seront appareillés d'un pacemaker par chirurgie mini-invasive. Le groupe contrôle sera comparé au groupe « traitement » au terme de 4 mois. Le porc a été choisi en raison de la proximité de son anatomie avec l'homme et de sa croissance accélérée. Les résultats de cette étude seront précieux quant à la décision de poursuivre ou non la stimulation classique ventriculaire droite chez l'enfant. Nous mettons tout en oeuvre pour réduire le nombre d'animaux : le calcul du nombre d'animaux dans le projet permet une étude statistique robuste et des résultats fiables, avec le minimum d'animaux. Le raffinement de la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") qui sont clairement définis dans le projet. Le

concept de raffiner, autrement dit optimiser l'expérimentation, concerne la méthodologie appliquée aux animaux dans l'optique : de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'anxiété subie par les animaux, l'ensemble de ces aspects sont définis dans le cas de notre projet dans la prise en charge de l'animal au cours de l'expérimentation étant donné que celle-ci est terminale (sans réveil). Pour le remplacement du modèle animal, une réflexion a été menée, mais l'objectif premier de l'étude qui est l'étude d'une pathologie humaine dans sa globalité, nécessite le recours à l'utilisation d'animaux.

2463- L'objectif de ce projet est de caractériser des formulations et des composés en recherche et développement afin d'optimiser l'efficacité sur la cible et la délivrance sélective de ces composés dans des organes, tissus et cellules cibles.

Certains effets indésirables de médicaments sont liés à une action non spécifique sur des molécules, cellules, tissus ou organes qui ne sont pas les cibles de la pathologie à traiter. De nombreuses formulations sont développées pour améliorer l'efficacité, la stabilité et la délivrance sélective des composés dans les organes, tissus et cellules cibles et réduire ainsi les effets indésirables.

Ces formulations et composés sont préalablement criblés sur des tests biochimiques et cellulaires pour déterminer leur activité in vitro, stabilité, absence de cytotoxicité ou de réponse immuno-inflammatoire.

Aujourd'hui, il n'y a pas de méthode substitutive à l'expérimentation animale pour évaluer l'efficacité et la délivrance sélective de ces formulations et composés dans les organes, tissus et cellules cibles. En effet, la modélisation in vitro ne permet pas de rendre compte de la complexité d'un individu, des interactions entre les organes, tissus et cellules.

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

Concernant la règle des 3R Le raffinement est apporté par un enrichissement dans les cages à l'aide de tunnel en carton, maisons et morceau de bois. La «réduction » du nombre d'animaux est assurée par une évaluation entre le minimum du nombre d'animaux utilisé par étude versus un nombre maximum. Ceci grâce au support en bio statistiques apporté par des experts de la spécialité, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées et de réduire le nombre d'animaux utilisés. La procédure d'imagerie permet une réduction du nombre d'animaux utilisés. Les progrès de la miniaturisation des appareils d'imagerie permettent de détecter des pathologies chez les rongeurs en réduisant le nombre d'animaux utilisés par un suivi longitudinal du phénotype de l'animal sans euthanasie en le gardant comme son propre témoin. Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal et à l'observation quotidienne des signes cliniques. La souris et le rat sont les espèces les plus utilisées en recherche car ce sont les espèces les mieux caractérisées et décrites.

Ce projet couvre l'utilisation de 24630 rongeurs (16905 souris et 7725 rats) au maximum pour 5 ans.

2464- Il a été démontré et publié que, en cancérologie, plus de 45% des candidats médicaments testés favorablement pour leur efficacité chez les rongeurs, par les méthodes classiques, donnent des résultats décevants chez l'Homme, dès la phase I des essais cliniques.

Les entreprises du médicament se tournent vers notre expertise afin d'avoir accès à des modèles innovants de cancers permettant d'obtenir des données consolidées au delà des données générées en interne ou obtenues sur d'autres modèles précliniques.

L'objectif de ce projet est de déterminer in vivo les propriétés antitumorales de candidats médicaments (petite molécule ou biothérapie) afin d'identifier les traitements potentiellement efficaces en clinique. L'étude de ces candidats médicaments permettra de définir leur efficacité antitumorale ainsi que les informations nécessaires pour choisir leur posologie en vue de leur utilisation future en clinique.

Ce projet se base sur l'utilisation de modèles de tumeurs humaines xénotreffées sur souris ou PDX pour Patient Derived tumor Xenografts. Ces modèles développés au cours des dernières années sont les seuls actuellement permettant de reconstituer sur animal la complexité des tumeurs humaines. Les résultats obtenus sur ces modèles permettent ainsi une réelle extrapolation en médecine humaine. Nous disposons actuellement d'une collection de plus de 150 PDX différentes représentatives des tumeurs solides.

Les étapes de validation d'un candidat médicament s'effectuent, autant que faire se peut, in vitro. Cependant, il est essentiel, avant toute administration à l'Homme, de valider le potentiel thérapeutique des candidats médicaments dans des modèles reproduisant les interactions entre les différents types cellulaires telles que les cellules endothéliales et les cellules stromales mais aussi reproduisant la diffusion sur l'ensemble de l'organisme (invasion, métastase) ainsi que les propriétés de métabolisation de l'organisme qui ont un impact significatif sur la distribution et la disponibilité des médicaments potentiels. Ces études in vivo constituent une des nombreuses étapes du développement préclinique d'un médicament mais ce travail sur organisme entier ne peut être remplacé. Seuls les candidats médicaments ayant franchi les étapes de validation in vitro seront évalués in vivo réduisant le nombre de molécules à évaluer.

Le projet dont la durée sera de 2 années sera constitué de 50 études visant à différents candidats médicaments sur différents modèles de PDX. Les études comprendront chacune 144 animaux au maximum, soit un total de 7200 animaux au maximum.

L'ensemble des études se déroulent dans des conditions d'hygiène rigoureuses afin de garantir un statut sanitaire optimal et prévenir des problèmes de santé. Les animaux sont hébergés en petits effectifs par cage. Les cages sont changées fréquemment. Dans chaque cage, les animaux reçoivent un enrichissement de milieu (Neslets). Les animaux sont anesthésiés lors de la greffe. Leur état physique et leur comportement sont contrôlés quotidiennement. En cas d'apparition de signes cliniques, les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'anxiété seront appliquées: ajout

d'enrichissement supplémentaire (bâtons de bois, Dome house) en cas de bagarre, supplémentation de l'alimentation en gel nutritif en cas de perte de poids.

2465- Il a été démontré et publié que, en cancérologie, plus de 45% des candidats médicaments testés favorablement pour leur efficacité chez les rongeurs, par les méthodes classiques, donnent des résultats décevants chez l'Homme, dès la phase I des essais cliniques.

Les entreprises du médicament se tournent vers notre expertise afin d'avoir accès à des modèles innovants de cancers permettant d'obtenir des données consolidées au delà des données générées en interne ou obtenues sur d'autres modèles précliniques.

L'objectif de ce projet est de déterminer in vivo les propriétés antitumorales de candidats médicaments (petite molécule ou biothérapie) afin d'identifier les traitements potentiellement efficaces en clinique. L'étude de ces candidats médicaments permettra de définir leur efficacité antitumorale ainsi que les informations nécessaires pour choisir leur posologie en vue de leur utilisation future en clinique.

Ce projet se base sur l'utilisation de modèles de tumeurs humaines xénogreffées sur souris ou PDX pour Patient Derived tumor Xenografts. Ces modèles développés au cours des dernières années sont les seuls actuellement permettant de reconstituer sur animal la complexité des tumeurs humaines. Les résultats obtenus sur ces modèles permettent ainsi une réelle extrapolation en médecine humaine. Nous disposons actuellement d'une collection de plus de 150 PDX différentes représentatives des tumeurs solides.

Les étapes de validation d'un candidat médicament s'effectuent, autant que faire se peut, in vitro. Cependant, il est essentiel, avant toute administration à l'Homme, de valider le potentiel thérapeutique des candidats médicaments dans des modèles reproduisant les interactions entre les différents types cellulaires telles que les cellules endothéliales et les cellules stromales mais aussi reproduisant la diffusion sur l'ensemble de l'organisme (invasion, métastase) ainsi que les propriétés de métabolisation de l'organisme qui ont un impact significatif sur la distribution et la disponibilité des médicaments potentiels. Ces études in vivo constituent une des nombreuses étapes du développement préclinique d'un médicament mais ce travail sur organisme entier ne peut être remplacé. Seuls les candidats médicaments ayant franchi les étapes de validation in vitro seront évalués in vivo réduisant le nombre de molécules à évaluer.

Le projet dont la durée sera de 2 années sera constitué de 50 études visant à différents candidats médicaments sur différents modèles de PDX. Les études comprendront chacune 144 animaux au maximum, soit un total de 7200 animaux au maximum.

L'ensemble des études se déroulent dans des conditions d'hygiène rigoureuses afin de garantir un statut sanitaire optimal et prévenir des problèmes de santé. Les animaux sont hébergés en petits effectifs par cage. Les cages sont changées fréquemment. Dans chaque cage, les animaux reçoivent un enrichissement de milieu (Neslets). Les animaux sont anesthésiés lors de la greffe. Leur état physique et leur comportement sont contrôlés quotidiennement. En cas d'apparition de signes cliniques, les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse seront appliquées: ajout d'enrichissement supplémentaire (bâtons de bois, Dome house) en cas de bagarre, supplémentation de l'alimentation en gel nutritif en cas de perte de poids.

2466- Les traitements par radiothérapie font face à un dilemme, délivrer une irradiation localisée avec une dose suffisante pour l'éradication de la tumeur tout en préservant les tissus sains environnants. Actuellement, les techniques d'irradiation médicale permettent de limiter l'atteinte des tissus sains sans toutefois l'éviter et les combinaisons de la radiothérapie avec les nouvelles drogues de chimiothérapie tendent à exacerber les effets secondaires. Ces traitements engendrent des effets collatéraux aux niveaux des tissus sains qui se caractérisent le plus souvent par le développement d'une fibrose et la perte de fonction de l'organe touché par l'irradiation. Ainsi, certains patients traités pour un cancer pulmonaire développent plusieurs années plus tard une fibrose pulmonaire. La fibrose est une réponse physiopathologique des tissus à différents dommages physiques, chimiques ou biologiques. Elle est assimilable à un phénomène de cicatrisation chronique qui aboutit à une accumulation de la matrice extra-cellulaire (MEC) conduisant à la perte de fonctionnalité de l'organe touché, contrairement au phénomène de cicatrisation tissulaire normal. Néanmoins cicatrisation « normale » et fibrose ont une empreinte moléculaire et cellulaire semblable et une avancée essentielle dans ce domaine serait de pouvoir comprendre ce qui permet d'orientation vers une voie cicatricielle normale versus la voie fibrogénique.

Nous avons identifié une cible potentielle, qui est un système générateur d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) induit par l'irradiation. Cette protéine, exprimée dans les cellules épithéliales pulmonaires, est décrite comme étant impliqué dans l'immunité innée. Depuis plusieurs années les ROS sont suspectées de jouer un rôle dans le processus de fibrogenèse. Notre objectif est d'évaluer l'implication de cette protéine dans ce processus induit après irradiation. Un modèle de fibrose radio-induite chez la souris a été mis au point. La souris est le modèle de référence utilisé en radio-biologie pour étudier la fibrose radio-induite, ce modèle va nous permettre d'évaluer le rôle de la protéine dans la fibrose pulmonaire radio-induite et de développer des outils (peptides et ARN interférents) inhibiteurs de son activité et/ou expression qui validerons l'étude et ouvrirons la voie à une approche thérapeutique. Pour cette étude, nous utiliserons des tests statistiques adaptés aux échantillons de petite taille afin de réduire le nombre des animaux, qui sera de 11 souris par groupe.

Chez l'homme, la fibrose est un processus lent, qui prend plusieurs années. Ce processus a été modélisé chez la souris qui développe une fibrose 20 semaines après irradiation. La souris constitue donc un des seuls modèles pour étudier et démontrer l'implication d'une protéine dans le processus. De plus, la fibrose est un processus complexe qui a une composante inflammatoire associée à une transition épithélio-mésenchymateuse qui conduit à la modification irréversible du parenchyme respiratoire. Le recrutement des cellules inflammatoires aux poumons ainsi que les changements pathophysiologiques

associés ne peuvent être mis en évidence qu'in-vivo. Un des buts du projet est de développer un peptide inhibiteur dont l'efficacité ne peut être validée in fine que chez l'animal. Par conséquent, cette étude ne peut pas se passer du modèle animal. L'utilisation de cultures cellulaires primaires permettront de réduire le nombre d'animaux nécessaire à l'exploration des mécanismes moléculaires tels que la régulation de l'expression de certaines protéines après un irradiation ainsi que la détermination de la dose efficace des molécules testées.

Une analyse statistique a été effectuée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaires pour détecter des différences significatives, grâce des outils de statistique adaptés, nous avons estimé le nombre d'animaux à 1774.

Pour limiter l'effet négatif de la délétion de la protéine sur le système immunitaire menant au développement de maladies opportunistes et ainsi limiter la mortalité dû aux traitements, nous utiliserons un traitement antibiotique et placerons les souris en isolateur.

Par ailleurs, l'induction de fibrose par des rayonnements ionisants sera pratiquée sous anesthésie.

2467- L'Homme est exposé à des milliers de micro-constituants provenant de son alimentation. Certains peuvent avoir des effets bénéfiques, d'autres être délétères pour la santé. Certains sont présents naturellement dans les aliments, d'autres résultent d'une intervention humaine lors de la production de l'aliment. L'étude de la complexité des expositions alimentaires et sa mise en relation avec les paramètres santé dans des études épidémiologiques ou des interventions nutritionnelles contrôlées chez l'homme nécessite une meilleure capacité d'analyse des micro-constituants végétaux et de leurs métabolites dans les fluides biologiques. De nouvelles perspectives se sont développées grâce à l'approche métabolomique basée sur la spectrométrie de masse haute résolution, qui permet de détecter des milliers de métabolites au cours d'une même analyse. La difficulté est aujourd'hui d'identifier l'ensemble des signaux détectés dans les profils métabolomiques. Une des limites est notre méconnaissance du métabolisme intestinal, hépatique et microbien des micro-constituants alimentaires pour pouvoir les retrouver dans les profils analysés. Les micro-constituants sont si nombreux qu'il paraît irréaliste de vouloir étudier de manière systématique leur métabolisme chez l'homme. Les études sur modèles animaux nécessiteraient un très grand nombre d'animaux. Une approche alternative se développe avec la prédiction *in silico*, capable de prédire le métabolisme de n'importe quelle molécule à partir de sa structure chimique et de la connaissance des réactions de biotransformations possibles. Cette approche *in silico* a été développée et validée pour les médicaments, mais n'a pas été adaptée aux molécules d'origine alimentaire. Nous souhaitons participer à l'amélioration des capacités de prédiction des outils *in silico*, en fournissant des données observées *in vivo* sur le modèle rat pour des micro-constituants alimentaires. Il est prévu que les résultats des prédictions *in silico* soient compilés et rendus accessibles à tous dans des bases de données sur internet.

La stratégie envisagée est de compléter des rats avec une sélection de molécules pures, représentant une large gamme de structures chimiques, de collecter les urines et les plasmas des animaux et de les analyser par spectrométrie de masse haute résolution pour identifier les métabolites produits, pour ensuite les comparer aux métabolites prédits par les outils *in silico*. Par des processus dits de « machine learning », les outils de prédiction s'amélioreront progressivement avec l'intégration de données expérimentales pour une variété de structures chimiques.

Le protocole présenté consiste à compléter le régime des rats successivement avec une molécule isolée à chaque fois, de récolter les urines avant et après supplémentation, puis de compléter le régime des rats avec un mélange de 5 molécules pour collecter un échantillon de sang avant la mise à mort des animaux. Au total 160 animaux seront nécessaires pour tester 100 molécules.

Chaque lot de rats sera constitué de 8 mâles et 8 femelles qui après adaptation pendant 9 jours à un régime semi-synthétique témoin, seront nourris pendant 5 jours avec un régime supplémenté avec une molécule pure à une dose représentant un niveau d'exposition de type nutritionnel et non pharmaceutique (0.2% du régime). Occasionnellement une molécule pourra être testée dans sa matrice alimentaire. Dans ce cas le régime sera supplémenté avec un aliment lyophilisé, à la dose de 15% du régime. Après collecte des urines, les mêmes rats seront remis pendant une période minimum de 9 jours sur un régime semi-synthétique témoin avant de pouvoir recevoir à nouveau pendant 5 jours un régime supplémenté avec une autre molécule choisie. Ainsi 10 molécules pures seront successivement testées sur chaque lot de 16 animaux.

Chaque animal sera observé quotidiennement pour détecter tout signe de stress (État physiologique général, comportement de prostration, perte d'appétence). Des mesures appropriées seront prises le cas échéant : exclusion temporaire ou définitive de l'animal du protocole, exclusion de la molécule testée ou diminution de la dose testée. Après 8 jours de régime standard, puis après 4 jours et après 5 jours de supplémentation avec chaque molécule, les urines seront récoltées de la manière suivante : les rats seront placés individuellement dans une cage grillagée propre, au-dessus d'un plateau propre permettant de recueillir les urines, pendant environ 30 minutes (le temps nécessaire pour que l'animal urine). Dès que le rat aura produit de l'urine il sera remis dans sa cage habituelle. L'objectif est de déterminer la nature des métabolites urinaires, et non leur cinétique d'apparition et d'élimination. Le recueil d'un spot urinaire est donc suffisant. Afin d'obtenir une plus grande quantité d'urine le protocole de collecte est réalisé au jour 4 et au jour 5 de la supplémentation.

En fin de protocole, chaque lot de 16 animaux sera divisé en 3 (deux lots de 6 et un lot de 4) pour la procédure finale. Chaque lot de 6 animaux (3 mâles, 3 femelles) recevra pendant 5 jours un mélange de 5 molécules (2 mélanges testés en parallèle). Les quatre animaux restant (2 mâles, 2 femelles) recevront le régime standard non supplémenté.

Le nombre d'animaux est suffisant pour les analyses qualitatives envisagées des profils métaboliques. Les prélèvements d'urine réalisés précédemment pour chacune des molécules testées individuellement permettront de faciliter l'interprétation des profils analytiques des plasmas, sachant que les métabolites circulants sont généralement aussi retrouvés dans les urines. Ce projet d'expérimentation animale sera réalisé dans le strict respect de la règle 3Rs, dans sa conception comme dans sa réalisation.

2468- L'objectif de ce projet de recherche est de mettre à profit les résultats d'études de génétique clinique afin de développer de nouveaux modèles de souris pour comprendre les mécanismes responsables de la symptomatologie et améliorer les traitements des patients. L'ADN provenant de patients atteints de maladies rares est centralisé dans une collection biologique et les données médicales efférentes dans une base de données (D4/phenodent). Cette approche (financée au titre d'un programme de l'Union européenne) nous permet de recueillir des connaissances significatives sur les maladies rares. Nous avons caractérisé le profil d'expression de plusieurs gènes responsables de maladies rares en clonant leurs homologues de souris. Pour certains de ces gènes, nous créons l'équivalent des mutations rencontrées chez les patients dans un modèle animal (souris). Ce processus est long, mais essentiel pour comprendre l'étiologie de la maladie, et ensuite élaborer des stratégies de traitements. Nous analysons un modèle murin d'inactivation du gène *Smoc2*. Ce gène code pour une protéine ayant des rôles probables dans le développement dentaire, l'ostéogenèse, le contrôle de la prolifération cellulaire, et la vascularisation. Chez l'homme, la mutation de *SMOC2* résulte en une oligodontie (dents manquantes et/ou réduites) et un déficit de croissance de l'os alvéolaire. Nous utiliserons le modèle murin pour analyser la croissance osseuse et le rôle potentiel de cette protéine dans (i) le traitement de l'ostéoporose, (ii) l'amélioration de l'ostéointégration des implants dentaires, et (iii) la promotion des métastases cancéreuses.

Nous analyserons le développement osseux dans le modèle murin en utilisant des techniques non invasives – donc les souris seront anesthésiées. Des prélèvements sanguins, et des traitements chirurgicaux (implants chirurgicaux dans la cavité buccale) seront effectués. L'ovariectomie (mimant la ménopause chez la femme) accentuera l'ostéoporose. Nous allons tester les effets de l'administration de la protéine *Smoc2* sur un modèle murin d'implants dentaires. Ceci exigera une anesthésie et une surveillance post-opératoire attentive. Nous étudierons également l'effet d'une alimentation déficiente en vitamine D et calcium.

Nous proposerons aussi l'étude d'autres modèles murins (Rogdi).

L'objectif de notre projet est de comprendre le rôle des gènes et des anomalies génétiques de patients atteints de maladies rares touchant la cavité buccale et les dents en étudiant les souris reproduisant ces maladies. Ainsi, ces souris seraient un modèle permettant d'étudier des maladies à ce jour très mal connues chez l'Homme, puis éventuellement de tester des traitements pour ensuite mieux traiter les patients humains atteints par ces syndromes.

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

La mutation génétique étudiée a des conséquences sur l'animal. Afin de réduire toute souffrance à son minimum, les animaux seront euthanasiés dès les premiers signes de perte de poids. Le stress induit par les traitements sera également réduit en administrant au maximum les substances dans l'eau de boisson. Le stress ou la faible douleur induite par les prises de sang seront également réduits par l'utilisation d'anesthésiques locaux ou généraux selon les volumes prélevés et les sites de prélèvement.

Ainsi, dans ce projet un total de moins de 1550 animaux sera utilisé lors des procédures expérimentales.

Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. De même, les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter tout duplicata d'étude.

2469- L'obésité est un problème de santé publique qui s'accompagne de troubles métaboliques majeurs et représente un facteur de risque pour des pathologies cardiovasculaires, respiratoires, musculo-squelettiques, ayant un impact dramatique sur la durée et sur la qualité de la vie. La chirurgie est aujourd'hui le seul traitement pour obtenir un contrôle durable du poids et des complications de l'obésité. Un rôle important dans la genèse de l'obésité est joué par des hormones produites par des cellules présentes au niveau du système digestif ayant pour fonction le contrôle de la sensation de « faim ». La possibilité d'effectuer un traitement « préparateur » à la chirurgie de l'obésité faisant perdre une partie de l'excès de poids au patient avant l'intervention chirurgicale pourrait avoir des répercussions majeures sur la prise en charge. Une cible possible a été identifiée dans la modulation des hormones régulant l'appétit. Des études chez l'animal ont montré que l'embolisation sélective de l'artère gastrique gauche (AGG) permet de réduire, la production d'une telle hormone, la ghréline. Toutefois, une telle approche n'est pas compatible avec un traitement chirurgical ultérieur car le patient serait à risque accru de développer une fistule au niveau de la jonction gastro-œsophagienne. Si l'embolisation de l'artère gastroépiploïque droite (AGED) devait produire le même effet de réduction de la ghréline, dans ce cas les avantages seraient multiples : 1) modulation hormonale et 2) conditionnement ischémique de la zone (jonction gastro-œsophagienne) la plus à risque de fistule. De surcroît, l'embolisation de l'artère gastro duodénale pourrait aussi influencer le métabolisme glucidique et avoir un effet positif dans le syndrome métabolique.

Le but du projet est 1) de vérifier si l'embolisation de la AGED réduit la production de ghréline, 2) vérifier la présence d'un effet de conditionnement ischémique de la jonction gastro-œsophagienne et 3) vérifier que l'embolisation de l'artère gastro duodénale puisse moduler le métabolisme glucidique.

Il s'agit d'un projet en plusieurs phases, le passage ou non à une phase successive dépendra des résultats en amont.

Ce projet remplit les conditions des 3R :

- Remplacement : Pour tester l'hypothèse que l'embolisation de l'AGED (nourricière de la grande courbure de l'estomac) soit aussi efficace que l'embolisation de l'AGG dans la réduction de la production de ghréline, le recours à l'animal est nécessaire. Le Porc est un modèle de choix, car il est omnivore ; la vascularisation de l'estomac est similaire à celle de l'Homme.

- Réduction : ce projet sera décliné en 3 phases. Pour les phases 1 et 2, 18 cochons seront inclus et divisés en 3 groupes. Pour la troisième phase, 24 cochons supplémentaires seront inclus pour un total de 42 cochons. Il n'y a pas de données dans la littérature permettant un calcul de l'échantillon a priori. L'utilisation de 6 cochons par groupe (avec un groupe contrôle) devrait être suffisante pour obtenir des résultats satisfaisants.
- Raffinement : le projet prévoit des procédures mini-invasives engendrant des douleurs post-opératoires modérées. Toutefois, les animaux recevront un protocole de soins post-opératoires comprenant une évaluation clinique quotidienne, des anti-douleurs et des anti-inflammatoires et un régime standardisé. Des critères d'arrêt anticipé de l'expérimentation en cas de survenue d'une complication ont été identifiés.

2470- Seules les cellules beta des ilots du pancréas sont capables de produire l'insuline, une hormone essentielle pour le contrôle du niveau de glucose dans le sang. Le diabète, une maladie dont le nombre de patients augmente rapidement dans nos sociétés industrialisées, induit la destruction progressive des cellules beta (destruction auto-immune dans le cas du diabète de type I, production insuffisante d'insuline et mort cellulaire dans le cas du diabète de type II). Alors que le pancréas a été largement étudiés in vitro, les études in vivo restent peu nombreuses, particulièrement dans le cas des modèles diabétiques. Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes de contrôle du flux vasculaire et le rôle fonctionnel des propriétés vasculaires dans le développement du diabète, par imagerie in vivo chez la souris.

Premièrement, l'observation des perturbations vasculaires in vivo permettra de mieux comprendre la pathologie et d'identifier le rôle des vaisseaux dans le développement du diabète. La vitesse du flux sanguin dans les ilots peut être directement corrélés à l'activité métabolique des cellules beta (mesure de consommation en oxygène) et donc à l'état de « santé » de ces cellules, et nous permettre de comprendre le rôle du flux sanguin dans l'activité des cellules beta.

Deuxièmement, il a été récemment mis en évidence que des cellules structurales des vaisseaux, les péricytes, présentaient une altération de morphologie dans plusieurs modèles de souris obèses. Il est également connu que lors du diabète, des perturbations vasculaires interviennent au niveau du pancréas. Nous souhaitons comprendre le rôle des péricytes dans le contrôle du flux vasculaire dans les ilots in vivo, et analyser les conséquences du régime gras sur l'activité de ces cellules. L'expression spécifique de canaux ioniques sensibles à la lumière dans les péricytes nous permettra de contrôler l'activité de ces cellules in vivo, en conditions normales et pathologiques (régime gras induisant l'obésité), et de comprendre si les modifications vasculaires observées durant le développement du diabète peuvent être dues à une perte de sensibilité des péricytes.

Enfin, nous analyserons les perturbations vasculaires et les modifications de morphologie des péricytes chez la souris spontanément diabétique, présentant un diabète auto-immun de type I. Ces expériences nous permettront de mieux comprendre les mécanismes communs au développement de ces 2 types de diabètes aboutissant à la destruction des cellules beta.

Il n'existe malheureusement aucune méthode alternative à l'expérimentation animale pour répondre à ces objectifs ; la complexité d'une réponse dans un tissu suite à un stress métabolique ne pouvant être reproduite in vitro. Nous avons néanmoins effectué des calculs statistiques nous permettant de prédire le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir nos résultats, et tout est mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux utilisé à son minimum (84 souris). Les souris sont hébergées dans des milieux enrichis (copeaux pour créer des nids, abris, tunnels), et nos animaux sont suivis quotidiennement pour détecter tout symptôme inattendu, en minimiser les conséquences (administration de soins), et prévenir toute douleur ou souffrance. Le cas échéant, l'expérimentation serait immédiatement interrompue.

2471- Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune principalement diagnostiquée chez l'enfant, induisant la destruction irréversible des cellules productrices d'insuline du pancréas. Cette maladie touche à ce jour près de 200 000 personnes en France, et représente un coût très important de prise en charge clinique. Le développement de stratégies innovantes de diagnostic précoce et de nouvelles thérapies visant à ralentir ou retarder la progression de la maladie est donc essentiel.

Ce projet de physiopathologie consiste en une étude pionnière des mécanismes impliqués dans le développement du diabète de type 1. Les étapes précoces du développement du diabète de type 1 impliquent une infiltration du pancréas par des cellules immunitaires. La coopération entre différents types de cellules inflammatoires constitue une étape clé dans le développement de la maladie, et la richesse des données connues concernant la dynamique des cellules immunitaires permet une translation quasi directe d'un comportement cellulaire en fonction biologique. Notre premier objectif est donc d'étudier les dynamiques de destruction des cellules productrices d'insuline par les cellules immunitaires, par imagerie des différentes interactions cellulaires dans un modèle de souris diabétiques, directement in vivo dans les ilots pancréatiques.

Notre deuxième objectif consiste en l'étude des mécanismes de suppression du développement du diabète de type 1. En effet, dans notre modèle de souris diabétiques, l'induction du diabète peut être fortement ralentie par injection de cellules immunitaires dites « régulatrices ». Notre but est donc de visualiser in vivo les interactions entre cellules immunitaires et cellules « régulatrices » lors du développement du diabète dans un modèle de souris diabétiques. La compréhension des dynamiques impliquées lors de la suppression du diabète directement dans le pancréas constitue une étape fondamentale pour le développement de nouvelles thérapies visant à ralentir la maladie.

Il n'existe malheureusement aucune méthode alternative à l'expérimentation animale pour répondre à ces objectifs ; la complexité d'une réponse immunitaire dans un tissu ne pouvant être reproduite in vitro. Nous avons néanmoins effectué des calculs statistiques nous permettant de prédire le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir nos résultats, et tout est mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux utilisé à son minimum (96 souris). Les souris sont hébergées dans des milieux

enrichis (copeaux pour créer des nids, abris, tunnels), et nos animaux sont suivis quotidiennement pour détecter tout symptôme inattendu, en minimiser les conséquences (administration de soins), et prévenir toute douleur ou souffrance. Le cas échéant, l'expérimentation serait immédiatement interrompue.

2472- L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux pré-existants ; il participe au développement de l'organisme et à la réparation tissulaire. Toutefois, le dérèglement de ce processus est la cause ou accompagne de nombreuses pathologies, comme la cancérogenèse et aussi certaines formes de cécité (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age ou les rétinopathies diabétiques). A ce jour, les traitements ciblent spécifiquement le facteur VEGF (Vascular endothelial growth factor) décrit comme le principal facteur stimulant l'angiogenèse. Cependant, une pléthore d'études démontre le rôle important d'autres molécules contrôlant l'angiogenèse, notamment les molécules de guidages axonales. En effet, des récepteurs aux molécules de guidages axonales comme les Neuropillines, les EphR, les récepteurs ROBOs et certains récepteurs à la Nétrine-1 contrôlent l'angiogenèse. Notre projet vise à décrypter le rôle *in vivo* de la Nétrine-1 et de ses récepteurs pendant l'angiogenèse développementale. Le rôle de la Nétrine-1 durant l'angiogenèse a principalement été décrit grâce à des expériences *in vitro*. Ces résultats sont controversés puisque certaines études suggèrent un rôle pro-angiogénique tandis que d'autres un rôle anti-angiogénique de la Nétrine-1.

Afin de clarifier le rôle de la Nétrine-1 *in vivo*, nous utiliserons le modèle de la rétine murine pour 2 raisons principales. La souris présente l'avantage d'être très similaire à l'homme que ce soit anatomiquement, physiologiquement et génétiquement. En effet plus de 98% de son génome est identique à celui de l'homme. D'autre part, l'organisation et le développement du système vasculaire de la rétine murine sont très bien décrits faisant de cette dernière un modèle de choix pour notre étude. Ainsi, nous pourrions comparer le développement du système vasculaire de ces souris mutantes avec celui de souris sauvages.

Afin de déterminer le rôle de la Nétrine-1, nous analyserons 7 lignées de souris transgéniques pour le gène étudié. Nous utiliserons 4 lignées de souris à invalidation conditionnelle pour étudier les conséquences de l'absence du gène de la Nétrine-1 dans des régions spécifiques de la rétine. De manière complémentaire, nous analyserons aussi les conséquences sur l'angiogenèse de la surexpression de la forme humaine de la Nétrine-1 dans des régions spécifiques de la rétine grâce à 3 autres lignées de souris. Nous croiserons aussi ces différentes lignées entres-elles afin de réaliser des expériences de sauvetage. Le nombre total de souris utilisées dans ce projet sera de 300 pour 2 ans. Ce nombre d'animaux s'explique par le fait que le développement du système vasculaire rétinien s'étale entre la naissance jusqu'à 2 semaines après la naissance. Il est donc nécessaire de couvrir toutes ces étapes.

Dans le cadre de ce projet, nous appliquerons la règle des 3R. En effet, Nous utiliserons séparément les yeux d'un même animal pour différentes analyses. Cela nous permettra de diviser par 2 le nombre d'animaux utilisés. En outre, le comportement des animaux sera contrôlé au minimum 3 fois par semaine afin de détecter un éventuel signe de souffrance. En parallèle, le poids sera contrôlé de manière hebdomadaire. Une perte de poids supérieur à 15% ou un comportement signe de souffrance entrainera l'arrêt de la procédure pour l'animal.

Ce projet devrait nous permettre de définir clairement le rôle de la Nétrine-1 pendant l'angiogenèse et d'ouvrir des perspectives d'études vers des pathologies comme le cancer.

2473- L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité thérapeutique d'une molécule dans un modèle de lymphome murin greffé chez la souris. Des études antérieures sur la détermination de la dose maximale tolérée sur cette molécule ont permis de déterminer qu'une dose de 6mg/kg administrée chez la souris n'affectait pas leur survie des souris et n'altérait pas leur état général.

Pour réaliser cette étude d'efficacité, 27 souris C57BL6 seront utilisées et scindées en 3 groupes de 9 animaux. Ce projet se fait selon le respect de la règle des 3 R. La toxicité de ce composé a préalablement été testé *in vitro* et *in vivo* dans des études précédentes (principe de remplacement). Le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction). Les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux en assurant des soins et une médication appropriée (principe de raffinement).

2474- L'ataxie de Friedreich (AF) est une maladie génétique rare (incidence 1/50000) qui touche aussi bien les garçons que les filles et où prédominent essentiellement des signes neurologiques (trouble de l'équilibre, difficulté à coordonner ses mouvements, difficulté à s'exprimer, perte des réflexes), des troubles viscéraux (cardiomyopathie obstructive et diabète sucré). La cause du décès est souvent cardiaque mais elle peut également survenir suite à un étouffement. Il survient à un âge très variable. Cette maladie est caractérisée par des lésions de la moelle épinière et du cervelet (dégénérescence spinocérébelleuse). A l'heure actuelle il n'y a pas de traitement curatif, cependant l'Idébénone (analogue du coenzyme Q10) est donné à titre expérimental

pour diminuer les complications cardiaques sans améliorer les signes neurologiques.

L'ataxie de Friedreich est la plus fréquente des ataxies héréditaires d'origine génétique, qui se déclare généralement à l'adolescence. Le gène muté est le gène de la Frataxine qui est une protéine de la matrice mitochondriale. Son rôle reste controversé mais son absence conduit à l'ataxie de Friedreich. l'atteinte neurologique domine le pronostic de cette maladie et ne bénéficie pas encore d'une prise en charge efficace et reste sans traitement. Dès lors, un traitement par thérapie génique pour apporter une copie normale du gène codant pour la frataxine est donc une approche pertinente si on arrivait à cibler le transfert de gène dans certaines parties du système nerveux (le cervelet, le tronc cérébral et la moelle épinière). L'approche par Thérapie Génique a récemment montré cette pertinence dans l'atteinte cardiaque de cette maladie.

La compétition internationale est sévère car au moins 3 groupes ont des approches semblables et les différences de stratégie reposent sur le choix des vecteurs de transfert de gène mais également la voie d'administration que le macaque permet au mieux d'appréhender.

Le projet soumis ici est une étude « pilote » ayant pour but de cribler la meilleure voie d'administration du vecteur de thérapie génique afin de traiter les zones pertinentes du système nerveux central. Il y a de multiples voies d'administration possibles (4 voies seront testées) et plutôt que de tester chacune d'entre elle en utilisant un nombre élevé d'animaux par voie d'administration, nous souhaitons faire cette étude pilote pour choisir celle qui montrerait le plus fort potentiel de transfert de gène dans le système nerveux et en particulier au niveau du cervelet. C'est pourquoi chaque groupe n'est composé que de 2 animaux, 1 male et une femelle, (n=12 animaux au total) et que nous pensons que, compte tenu de l'expertise de l'équipe vétérinaire en place, de celle de l'investigateur principal, neuropathologiste (plusieurs années d'expertise et de manipulation de ces animaux en particulier pour le transfert de gène dans le système nerveux central) et celle du neurochirurgien intervenant, la robustesse des résultats avec le nombre d'animaux réduit par groupe sera suffisante pour en tirer les informations recherchées (i.e. la meilleure voie d'administration).

Les vecteurs de thérapie génique reposent sur l'emploi de virus recombinants et dès lors leur tropisme (lieu où ils transmettront le gène thérapeutique) va varier selon l'espèce animale utilisée. Nous savons à partir des données de la littérature que le primate non humain est le modèle animal le plus prédictif pour les vecteurs viraux que nous utilisons. D'autre part, les repères anatomiques sont certes différents de ceux de l'homme mais sont néanmoins les plus proches pour une projection clinique ultérieure. Ce sont les raisons pour lesquelles nous souhaitons faire cette étude pilote dans ce modèle que nous connaissons bien pour refléter au mieux la clinique humaine.

Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en place. Ils ont été optimisés grâce à notre expertise de l'espèce macaque depuis l'année 2000.

Les protocoles d'anesthésie mis en place selon les procédures :

- IRM, réalisée sous anesthésie fixe avec relai gazeux, ne nécessitant pas la mise en place d'un protocole analgésique.
- La voie d'administration par intra veineuse sera réalisée sous anesthésie fixe
- Les 3 autres voies d'administration du vecteur AAV seront réalisées sous anesthésie fixe avec relai gazeux.
- Prélèvements sanguins : anesthésie à l'aide d'une injection IM de Kétamine (Imalgène® 1000).

Les protocoles d'analgésie seront mis en place en fonction de la voie d'administration :

- IV : acte très peu douloureux, sans analgésie.
- Administration intrathécale et intracisternale : un anti-inflammatoire (meloxicam®) administré par voie SC avant le réveil de l'animal. Au niveau du site ponction lombaire, une crème anesthésique (Lidocaïne prilocaïne 5% crème) appliquée quelques minutes avant le réveil de l'animal.
- Administration intracérébroventriculaire : association de morphine en SC avant incision cutanée et d'un anti inflammatoire non stéroïdien (meloxicam®) en SC en avant le réveil de l'animal. Au niveau du site opératoire (craniotomie) une crème anesthésique (Lidocaïne prilocaïne 5% crème) appliquée avant le réveil de l'animal.

A l'euthanasie, de la morphine sera injectée en SC en début d'anesthésie.

En outre, afin de favoriser les échanges sociaux entre animaux et favoriser leur bien être, les macaques seront hébergés par groupes de 2 ou 3 dans la mesure du possible (hors période de suivi post opératoire par exemple), comme nous le faisons dès que compatible avec l'étude.

2475- Des transfusions de plaquettes sanguines sont indispensables pour les personnes qui ont des comptes plaquettaires réduits ou qui ont des plaquettes non fonctionnelles. Cela touche de nombreux patients sous chimiothérapie, les receveurs de transplantation de moelle osseuse ou les polytraumatisés ainsi que des patients ayant des maladies congénitales affectant leurs plaquettes. Les plaquettes transfusées viennent exclusivement de dons volontaires mais nous sommes très fréquemment en situation de pénurie. L'équipe a récemment développé un système permettant de produire des plaquettes sanguines in vitro à partir de culture de cellules souches hématopoïétiques humaines et d'un système de microfluidique recouvert d'une protéine plasmatique. Nous souhaitons désormais que les plaquettes produites in vitro ont une fonctionnalité au moins équivalente à celle des plaquettes sanguines, issues de donneurs.

Le but de ce travail est d'étudier l'efficacité in vivo des plaquettes humaines produites in vitro. Pour cela, des plaquettes seront injectées dans la circulation sanguine de 64 souris constituant le plus petit nombre de souris pour avoir un effet statistiquement significatif. Un groupe de ces souris recevra également des plaquettes isolées du sang humain pour comparer la tolérance et la vitesse d'élimination des plaquettes produites in vitro dans un organisme vivant. Ces deux paramètres ne peuvent pas être reproduits in vitro car les plaquettes réagiront avec l'organisme entier qui mettra en place plusieurs modes d'élimination.

Le respect de la règle des 3R a été une préoccupation constante dans la préparation du protocole de notre étude. Ainsi l'expérience sera réalisée sur la période la plus courte possible (24 heures) et ne comportera qu'une seule injection intraveineuse et des prélèvements sanguins sous anesthésie du plus petit volume de sang possible. Tout sera mis en œuvre pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux utilisés. Nous adapterons la procédure en tenant compte des points limites à ne pas dépasser, en particulier une éventuelle perte de poids de l'animal ou un comportement indicateur d'une souffrance quelconque.

2476- L'échographie est une méthode d'imagerie non invasive, non ionisante, qui permet l'étude des tissus mous. Beaucoup des applications de l'échographie concernent l'exploration de la cavité abdominale, pour l'examen de l'aspect morphologique des organes, l'étude des flux sanguin et la détection de masses suspectes. Il existe des appareils spécifiques offrant une résolution qui permet d'avoir un niveau de détail anatomique suffisant pour transférer des méthodes d'examen, validées chez l'homme ou le gros animal, vers le petit animal.

Cette modalité d'imagerie est de plus en plus utilisée en recherche chez le petit animal pour réduire de nombre d'animaux suivis dans une étude (suivi de taille de tumeur par imagerie au lieu de sacrifice séquentiel des animaux) mais également pour obtenir plus d'information sur le développement de la pathologie (mesures de paramètres de flux sanguin in vivo par exemple), le tout sans souffrance de l'animal, sous anesthésie générale.

Toutefois, il n'existe à notre connaissance aucune formation pratique à l'échographie abdominale du rongeur à destination des chercheurs, et il existe une forte demande pour une formation initiale. Le public utilisant ces appareils pour le petit animal est assez varié et va du chercheur en méthodologie d'imagerie au technicien animalier, en passant par les médecins en thèse de science ou les chercheurs en biologie.

Nous proposons donc d'organiser une formation à l'échographie abdominale du petit animal permettant d'aborder beaucoup de problématiques rencontrées en laboratoire : suivi de gestation, mesures anatomiques abdominales, mesures de dimensions de vaisseaux et flux associés. Nous aborderons enfin l'injection guidée dans l'embryon qui est une méthode très puissante pour intervenir dans le développement de l'embryon pour tenter par exemple de réintroduire des cellules souches pour rattraper une mutation létale.

Nous avons prévu de réutiliser au maximum les souris au cours de cette session de formation pour limiter le nombre d'animaux utilisés. Tous les animaux sont anesthésiés pour les expériences, et leur durée d'anesthésie est limitée à 60 minutes au maximum.

Nous prévoyons de faire 3 formations par an, sur 5 ans en utilisant au total 360 souris et 90 rats, et impliquant 240 embryons de souris.

2477- La candidose vulvovaginale récidivante est une infection mycosique qui affecte une large proportion de femmes en âge de procréer (5-10%). L'agent pathogène en cause est le plus souvent *Candida albicans*, une levure commensale de la flore vaginale dont la pathogénicité s'exprime lors de la rupture de l'équilibre vaginal et d'une modification de la réponse immune locale. Un vaccin contre cette affection muqueuse pourrait être d'un grand bénéfice pour cette population. Les muqueuses représentent la voie principale d'entrée de *Candida albicans* et de la majorité des agents pathogènes.

Dans un premier temps, nous proposerons de développer un modèle expérimental de vaginite à *Candida* chez la souris (chez différentes souris de sensibilité variable) afin de pouvoir, dans une seconde étape, évaluer l'immunisation et la protection de plusieurs candidat vaccins grâce à une nouvelle approche de vaccination développée et maîtrisée au sein de notre équipe de recherche (= la transcryptose inverse).

Le nombre total de souris a été fixé à 200 souris au total.

Cet effectif a été réduit au maximum sans mettre en péril l'interprétation statistique des résultats. La vaccination sera réalisée (pour faciliter sa standardisation) sous anesthésie à l'isofurane. L'infection locale qui suivra se fera par inoculum vaginal calibré aussi sous anesthésie après administration d'œstrogène sous-cutané (facilitateur d'infection) de manière hebdomadaire. Les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie (maximum 5 par souris).

2478- Les écosystèmes marins côtiers sont caractérisés par de fortes fluctuations des conditions de milieu. A ces fluctuations naturelles se rajoutent aujourd'hui les bouleversements résultants des changements climatiques. Les déterminants de la capacité des poissons à répondre aux contingences naturelles sont mal connus, empêchant toutes prévisions fiables quant aux conséquences des changements climatiques et freinant ainsi la mise en place de mesures d'ajustement adaptées. Dans ce contexte, le projet proposé vise à mieux comprendre les déterminants de la plasticité phénotypique en prenant en compte les éléments suivants:

- La plasticité phénotypique à une dimension génétique et est soumise à la sélection,
- Les événements précoces interagissent avec le fond génétique des individus pour façonner leurs trajectoires d'histoire de vie et leur capacité de réponse aux contraintes du milieu,
- La capacité de réponse aux contraintes environnementales varie avec le stade de vie.

Les objectifs généraux de cette étude sont de mieux comprendre les réponses adaptatives proximales (physiologiques, comportementales) de deux espèces de bars issus d'un ancêtre commun : le bar européen (*Dicentrarchus labrax*) et le bar rayé (*Morone saxatilis*), face au changement climatique. Le présent projet porte uniquement sur l'espèce européenne: *D. labrax*. Les individus utilisés pour ce projet sont issus d'individus capturés dans le milieu naturel, afin de limiter l'effet de domestication. Le but étant de comprendre comment l'espèce, dans son milieu naturel est capable de répondre au changement climatique.

Au cours de ces travaux, 2 régimes de températures seront testées sur l'espèce européenne (*D. labrax*) sur la base des prévisions du groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC). Le premier régime de température représentera les conditions climatiques actuelles (soit 16°C) , tandis que le second régime représentera les conditions climatiques prévues par le GIEC pour 2100 (soit 21°C).

D'après les prévisions climatiques, les écosystèmes côtiers vont subir des perturbations. Il a été reporté que les apports terrigènes devraient augmenter, la chaîne trophique de tout l'écosystème serait alors perturbée. Le bar européen étant capable de vivre en mer et en estuaire, deux régimes alimentaires différents seront testés afin de mieux comprendre l'effet de

l'alimentation sur la physiologie adaptative du bar. Chaque lot soumis aux deux régimes de température recevra 2 formulations d'aliment différents: le premier aliment "mer", riche en d'acides gras poly-insaturés issus du milieu marin, tandis que le second aliment "terre", plus pauvre, constitué majoritairement d'acide gras d'origine terrestre.

Des épreuves d'effort seront mises en œuvre, à l'image de ce qui est pratiqué en médecine. Ces épreuves sont non invasives et non létales et elles cibleront des ensembles de fonctions physiologiques impliquées dans la relation entre les poissons et leurs habitats. Elles fourniront une appréciation intégrée de l'état de santé des populations testées.

La règle des 3R appliquée au projet

Remplacement: les procédures expérimentales décrites sont dépendantes de l'utilisation du modèle in vivo. L'utilisation de modèles in vitro ou in silico ne peuvent fournir le type données attendues.

Réduction: le projet se limite seulement aux procédures jugées comme indispensables pour la bonne acquisition des données, ainsi que pour la compréhension de la capacité de réponse au changement climatique pour cette espèce. De plus, les procédures proposées dans cette étude ont été pour la plupart étudiées de manière distincte, le fait d'utiliser ces techniques de manière complémentaire est innovant et permettra une compréhension plus fine des réponses au changement climatique à différentes échelles (de la molécule au métabolisme, jusqu'à la physiologie).

Raffinement: tout au long de la vie des animaux deqs animaux et pendant les différentes étapes protocolaires, une attention particulière sera apportée au bien être de chaque individu grâce au suivi quotidien de l'élevage. Les procédures expérimentales utilisées sont non invasives et pour chacune d'entre elle, les points limites ont été clairement identifiés, et des dispositions adaptées sont prises.

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

Ce projet mobilisera 1200 poissons durant l'année 2016. Ce nombre est notamment imposé par la nécessité de prendre en compte la forte variabilité interindividuelle des performances qui seront mesurées durant les épreuves d'effort.

2479- La rétine est un tissu photo sensible nécessaire à la vision. Elle tapisse l'intérieur de l'œil, reçoit les informations lumineuses, les transforme en signaux nerveux et les transmet au cerveau. Certains troubles de la vision peuvent être dus à un décollement de rétine. Les causes du décollement rétinien peuvent être variées (myopie, opérations de la cataracte, diabète, tumeurs de l'œil, forte inflammation, vieillissement des structures de l'œil, un coup porté à l'œil, ou encore hérédité...). Le mécanisme impliqué est le plus souvent une accumulation de liquide sous la rétine, qui pénètre par des trous ou des déchirures de la rétine. Lors de ce décollement la rétine est séparée physiquement de son support, si cette séparation persiste les cellules de la rétine meurent, la zone décollée ne fonctionne plus. Sans traitement par l'ophtalmologiste le décollement s'étend, pouvant ainsi entraîner des lésions irréversibles de la rétine et même la cécité.

L'objectif de ce projet est de mettre en place dans l'établissement utilisateur, un modèle de décollement rétinien chez les rongeurs et le lapin, afin de tester des traitements qui vont permettre la survie de la rétine.

Compte tenu des particularités physiologiques et anatomiques de l'œil et l'absence pour l'instant de modèle alternatif, nous devons avoir recours à des animaux adultes, des lapins et des rongeurs. Pour induire le décollement un micro volume de liquide sera injecté sous la rétine avec un appareillage adapté.

Les informations bibliographiques recueillies, les analyses statistiques ainsi que notre expérience nous permettrons de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés. Pour ce projet, d'une durée de 5 ans, un nombre maximum de 1920 lapins de 8 à 12 semaines, 1920 rats et 1920 souris de 5 à 7 semaine à l'arrivée dans notre animalerie, est envisagé afin de valider les efficacités des traitements.

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

2480- Les traitements actuels utilisés en chimiothérapie font appel à des molécules qui, si elles restent dans la circulation sanguine et/ou se distribuent de façon générale avec une absence de spécificité d'organes ou tissus, peuvent générer une toxicité dite périphérique. L'objectif de ce projet est de coupler le traitement à un nano-objet afin d'améliorer le ratio bénéfice-risque de traitements systémiques en oncologie (amélioration d'efficacité, réduction de toxicité) Il s'agit donc de comparer la biodistribution ainsi que l'efficacité anti-tumorale de la composition thérapeutique (molécule thérapeutique + nano-objet) et de la molécule thérapeutique (traitement de référence utilisé chez les patients).

Le nano-objet est une nanoparticule organique synthétisée avec des matières premières approuvées par l'agence sanitaire américaine. La première molécule thérapeutique utilisée dans le cadre de ce projet est la Doxorubicine. Ce nouveau projet a pour but de poursuivre la précédente étude (biodistribution et efficacité) menée sur la doxorubicine en l'insérant dans des compositions thérapeutiques comprenant de nouveaux nano-objets, puis d'étendre ces expériences à de nouvelles compositions thérapeutiques associant différentes molécules thérapeutiques aux nano-objets. Les différentes compositions thérapeutiques relevantes seront évaluées sur différents modèles tumoraux.

Ce projet est basé sur le même schéma que le précédent: pour chaque composition thérapeutique une étude de biodistribution ainsi qu'une étude d'efficacité, seront réalisées sur des souris porteuses de tumeur. L'étude de biodistribution permettra d'évaluer l'accumulation de la composition thérapeutique versus le traitement de référence dans la tumeur ainsi que dans les organes et tissus sains. L'étude d'efficacité déterminera quant à elle, le retard de croissance tumorale induit par la composition thérapeutique, toujours en comparaison avec le traitement de référence. Pour chaque composition thérapeutique testée (4

compositions) sur chaque modèle tumoral (3 modèles), nous inclurons 192 souris au total qui seront ensuite réparties à raison de 96 animaux pour la biodistribution et 96 animaux pour l'efficacité soit un total de 2304 animaux sur la durée du projet. La sélection de cette espèce de rongeur est basée sur le fait que le modèle de tumeur humaine greffée chez la souris nude est le modèle de référence pour l'étude des traitements anti-cancéreux. Le nombre d'animaux requis a été défini en fonction du pourcentage de prise de greffe des modèles tumoraux utilisés (modèles tumoraux de cancer mammaire, rectale et prostatique) et la nécessité d'obtenir un nombre suffisant d'animaux présentant une bonne prise tumorale pour réaliser les tests statistiques sur les résultats obtenus pour chaque étude. Ceci permettra de ne pas compromettre l'objectif scientifique du projet en évitant notamment de devoir dupliquer les expériences si le pourcentage de prise de greffe devait être trop faible. Le nombre de 8 animaux / groupe a été choisi de manière à prendre en compte l'hétérogénéité de croissance tumorale et permettre la mise en place des tests statistiques permettant d'analyser les données de l'étude. La détermination de points limites précis (volume tumoral < 1500 mm³, perte de poids < 20%, ...) ainsi que des mesures permettant de soulager la douleur ou l'inconfort (analgésie, réchauffement...) ont été établis afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur et l'angoisse subie par les animaux au maximum. La complexité des mécanismes biologiques fait que le modèle animal choisi ne peut être remplacé par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants.

2481- Nous sommes une société de biotechnologie qui développe des vaccins contre les maladies infectieuses chez l'homme. La principale difficulté dans le développement de ces vaccins est liée au fait que certains antigènes (principaux composants des vaccins) sont peu immunogènes. C'est-à-dire que ces antigènes induisent une réponse immunitaire insuffisante pour entraîner une mémoire immunitaire et, par conséquent, ne permettent pas d'aboutir à une protection vaccinale.

Les protéines porteuses sont des protéines qui, associées à un antigène, améliorent l'efficacité de certains vaccins. Ainsi, la recherche et le développement sur ces protéines est un pilier de la société. En particulier, nous avons identifié et développé une protéine porteuse très prometteuse.

Cette protéine porteuse se positionne comme une réponse à fort potentiel, susceptible de résoudre les problèmes de développement de vaccins et d'immunothérapies dans des indications thérapeutiques clés, telles que la tuberculose, les infections à staphylocoque doré, la grippe et le paludisme. La société vient notamment de finaliser un essai clinique de phase I dans la tuberculose.

Le but de notre projet est donc d'étudier les mécanismes de notre protéine porteuse, afin d'améliorer l'efficacité vaccinale d'antigènes peu immunogènes. Précisément, les expérimentations prévues sont des immunisations par injection intramusculaire chez la souris, afin d'évaluer l'efficacité de la réponse immunitaire induite par différents antigènes, fusionnés à la protéine. Au total, 750 animaux seront utilisés dans le cadre de ce projet avec différents candidats vaccins que nous avons identifié pour lesquels il n'existe pas encore de vaccins efficaces.

Les expérimentations sont planifiées de manière à utiliser le plus petit nombre d'animaux permettant l'obtention de résultats exploitables. La règle des 3R : "Réduire, Remplacer et Raffiner", est prise en compte et respectée dans ce projet nous avons des données préliminaires, in vitro, qui ont servi à réduire le nombre d'animaux. Ces données suggèrent que notre protéine porteuse possède un mécanisme d'action innovant puisqu'elle agit comme un agent immunostimulant qui cible les cellules dendritiques (CD) du système immunitaire en induisant leur activation/maturation. Cette activation des CD induit i) une réponse cellulaire CD8 qui participe à l'élimination rapide des cellules infectées, et ii) une réponse CD4 spécifique, avec iii) une augmentation considérable de la réponse d'anticorps.

Cette étude chez la souris ne peut pas être remplacée par d'autres méthodes alternatives. Toutefois, une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux contribueront au bien être des souris afin d'éviter tout risque de douleur ou de souffrance. Ainsi, nous utiliserons une anesthésie locale avec de la tétracaïne à 1% (centravet) avant les prélèvements de sang.

2482- La beauvericine et l'énniatine B sont des mycotoxines produites par champignons pathogènes dont certaines espèces de fusariums qui se développent en majorité sur les céréales (blé, avoine, orge, maïs). Ces mycotoxines sont retrouvées très largement dans l'alimentation humaine et animale et les données de toxicité disponibles ne sont pas suffisantes pour évaluer le risque sanitaire pour l'homme. C'est pourquoi des études de toxicité complémentaires sont nécessaires, en particulier la détermination de leur potentiel génotoxique c'est-à-dire leur capacité à altérer le matériel génétique, qui est un marqueur de potentiel cancérigène. L'évaluation de la génotoxicité repose sur une batterie de tests réalisés sur des modèles in vitro et in vivo sur des animaux de laboratoire. Les données de génotoxicité obtenus in vitro sont équivoques et nécessitent d'effectuer des études in vivo pour confirmer la capacité ou non de ces 2 mycotoxines à générer des lésions à l'ADN, le recours à l'expérimentation sur animal est donc nécessaire. Après détermination de la dose maximale tolérable pour la beauvericine et l'énniatine B par la souris, l'objectif de l'étude est de réaliser différents tests de génotoxicité après administration orale des toxines à des souris. Une pré-étude de toxicité aiguë permettant de déterminer la dose maximale tolérable sera réalisée sur quelques animaux (20) afin de déterminer les niveaux de doses pour l'étude principale. Le nombre d'animaux est réduit au maximum (au total, 80 animaux seront utilisés) et suit les recommandations des lignes directrices européennes. Un point limite a été défini et les animaux seront euthanasiés dès que ce point limite sera atteint ; cependant, les doses administrées sont faibles et ne devraient pas entraîner de souffrance chez les animaux.

2483- A la naissance, les cellules immunitaires T sont produites dans un organe spécifique, le thymus. Dans un contexte physiologique, plusieurs mécanismes de mort cellulaire vont permettre d'éliminer les lymphocytes T afin de maintenir un équilibre cellulaire dans le thymus. En revanche, un défaut des mécanismes de mort conduit à un déséquilibre cellulaire à

l'origine de nombreuses maladies comme les maladies auto-immunes, et les cancers hématologiques. Les mécanismes exacts qui régulent cet équilibre cellulaire restent à ce jour peu explorés.

OBJECTIF : Il est impératif de comprendre comment cette dérégulation des mécanismes de mort cellulaire in vivo conduit à l'apparition de maladies lymphoprolifératives (leucémies, lymphomes, maladies auto-immunes comme la polyarthrite).

METHODE : A l'aide de modèles murins adaptés, nous modulerons dans les lymphocytes T spécifiquement, l'expression de protéines qui inhibent la mort cellulaire afin de révéler des mécanismes impliqués dans la tumorigenèse et la réponse immunitaire.

BENEFICE ATTENDU : La découverte de nouveaux candidats impliqués dans ces mécanismes de mort cellulaire nous permettra de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cas de maladies lymphoprolifératives.

Conformément aux exigences de remplacement (R1), réduction (R2) et raffinement (R3), les expériences in vivo sont précédées de multiples expériences in vitro utilisant des méthodes in vitro de différenciation des cellules T mises en place au laboratoire ce qui permettra de n'utiliser que le nombre de souris strictement nécessaire (R1+R2). De plus, nous feront pas de distinction entre souris mâles et femelles (R2). Les souris sont hébergées au maximum par 5 dans des cages de 500 cm² avec un enrichissement systématique du milieu par diamond twist et igloo rouge. De plus, toute manipulation des animaux sera effectuée par des manipulateurs expérimentés afin d'éviter tout geste susceptible de faire souffrir l'animal. Toute douleur, souffrance, angoisse sera limitée par l'application des points limites précises et adaptés.

Ce projet prévoit l'utilisation de 4026 souris.

2484- Le sens de l'équilibre est une fonction vitale pour la survie car il permet de manière réflexe, automatique, le maintien et la stabilisation d'une posture cohérente. Les organes de l'équilibre, appelés organes vestibulaires, sont localisés au niveau de l'oreille interne. Ils nous permettent de nous orienter dans l'espace et de distinguer nos mouvements propres et ceux de notre environnement, et ainsi de nous déplacer en toute sécurité.

Lors de séjours dans l'espace, l'absence de gravité perturbe ces organes, ce qui est à l'origine de désorientations, d'illusions d'inversion et d'une forme de mal des transports : le mal de l'espace. Le sens de l'équilibre est capable de s'adapter à ces nouvelles conditions en quelques jours. De retour sur terre, le sens de l'équilibre revient à la normale après un temps d'adaptation plus ou moins long selon la durée du séjour dans l'espace.

Le but de nos expériences est de comprendre comment le sens de l'équilibre s'adapte lorsque les mammifères sont exposés à des changements de gravité. Il est très difficile de mener à bien ces expériences dans l'espace pour des questions de coût et d'accessibilité. Sur terre, il est impossible de supprimer la gravité. Afin d'étudier cette question nous faisons donc appel à une centrifugeuse qui permet d'augmenter la gravité. Les protocoles expérimentaux consistent donc à étudier comment les animaux s'adaptent à des transitions répétées entre des niveaux de gravité de 1G et 2G.

Nos résultats comportementaux menés chez des souris adultes centrifugées 50 jours à 2G ont montré que la dynamique de réadaptation est très variable d'un individu à l'autre et incomplète après 100 jours à 1G chez certaines souris.

Nous cherchons maintenant à identifier les mécanismes cellulaires mis en jeu au cours de l'adaptation à l'hypergravité, les mécanismes cellulaires qui s'opposeraient à une réadaptation complète, ainsi que éventuels facteurs de susceptibilité individuels. Nous explorons notamment l'hypothèse d'un lien entre des processus inflammatoires et les capacités d'adaptation des souris.

Nos résultats obtenus ces dernières années démontrent que les mécanismes de l'adaptation ne se situent pas au niveau de l'oreille interne (système nerveux périphérique). La présente demande concerne désormais des études des mécanismes de l'adaptation impliquant le système nerveux central. Chez certains animaux, la présence d'immunoglobuline suggère que la centrifugation pourrait conduire à des processus inflammatoires que nous voulons corrélés à la qualité de l'adaptation/réadaptation. La présente demande concerne un total de 90 souris dont une partie sera centrifugée 50 jours à 2G. Nous évaluerons ensuite l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et les changements immuno-histochimiques intervenant au niveau cérébral. Le présent protocole a été développé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Ces recherches nous permettent de mieux comprendre les mécanismes de plasticité adaptative, ainsi que leurs limites. Elles conduisent à une meilleure compréhension de pathologies humaines, notamment liées à des problèmes vestibulaires entraînant des vertiges comme lors de la maladie de Ménière, ou les névrites vestibulaires qui sont secondaires à des inflammations.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes sociaux harmonieux ; dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

2485- Les maladies du système musculo-squelettique touchent une large proportion de la population, que ce soient des maladies génétiques affectant le développement et la croissance telles que les dystrophies musculaires et dysplasies osseuses, les cancers, les maladies dégénératives liées au vieillissement telles que l'ostéoporose et l'arthrose ou encore les défauts de régénération suite à un traumatisme. Nos recherches visent à mieux comprendre le processus de régénération osseuse afin de mettre au point des applications thérapeutiques et d'améliorer la réparation.

Le but de nos projets est d'identifier les sources de cellules souches participant à la réparation osseuse, et grâce au développement de marqueurs génétiques chez la souris, de déterminer les mécanismes de recrutement et de différenciation des cellules souches osseuses pendant la régénération tissulaire normale ou pathologique.

Nous utilisons différents modèles murins de défauts osseux réalisés sous anesthésie, afin d'étudier le rôle des cellules souches osseuses pendant le processus de régénération et l'impact de greffes cellulaires et tissulaires sur le processus de réparation.

Compte tenu de l'état actuel de nos connaissances sur le rôle des cellules souches osseuses et les différentes voies de signalisation impliquées dans la régénération osseuse, nous avons établi le nombre exact de groupes expérimentaux et d'échantillons nécessaires pour atteindre nos objectifs tout en respectant la règle des trois R. Notre longue expérience dans ce domaine de recherche et dans l'utilisation des modèles murins nous permet de définir précisément le nombre minimum d'animaux (=1720) nécessaires aux tests statistiques requis, tout en limitant le nombre total d'animaux, en réduisant les temps de prélèvements et en regroupant les animaux contrôles. Toutes nos expérimentations sont pratiquées sous anesthésie accompagnée d'une analgésie.

Les animaux reçoivent une deuxième dose d'analgésique après opération, et sont suivis quotidiennement jusqu'à la fin de l'expérimentation.

2486- La prédiction et l'amélioration de l'efficacité alimentaire (produits animaux/aliment ingéré) chez les animaux d'élevage s'avèrent essentielles pour accroître la rentabilité de l'éleveur ainsi que pour diminuer les impacts environnementaux liés à l'élevage. Cette question est particulièrement importante chez les ruminants, qui présentent la plus faible efficacité alimentaire rencontrée chez les animaux de rente. Il est bien connu qu'il existe une variabilité individuelle non négligeable dans l'efficacité avec laquelle l'animal assimile les nutriments contenus dans les aliments. Néanmoins, cette efficacité est coûteuse à quantifier et d'ailleurs difficilement mesurable dans des conditions d'élevage classique. En outre, l'efficacité d'utilisation de l'azote (N retenu dans les produits animaux/N ingéré) est un facteur prépondérant de l'efficacité alimentaire chez le ruminant et détermine l'importance des rejets azotés vers l'environnement, rendant sa mesure encore plus complexe à déterminer. Il s'avère donc essentiel de trouver des méthodes alternatives et faiblement invasives permettant de prédire les variations individuelles de l'efficacité alimentaire et d'utilisation de l'azote dans des conditions pratiques et à grande échelle à fin de : i) sélectionner les animaux sur des critères d'efficacité alimentaire et ii) adapter la conduite des animaux à leur potentiel d'utilisation des différents rations.

L'objectif de ce projet est d'évaluer le potentiel de différents bio-marqueurs/indicateurs à refléter la variabilité individuelle de l'efficacité alimentaire et d'utilisation de l'azote chez le bovin (*Bos Taurus*, race Charolaise) en croissance – engraissement alimentés avec deux régimes utilisées en pratique mais de composition contrastée (riches en amidon vs riche en fibre). Pour cela et en respect de la règle des 3Rs il est proposé de réaliser cette étude en minimisant le nombre d'interventions sur chaque animal, dans des conditions de stabulation libre et sur un nombre suffisant d'animaux (n = 400) pour mettre en évidence les relations recherchées.

2487- La myéломéningocèle est une malformation qui survient au cours des premiers mois de la grossesse et qui engendre de lourdes conséquences pour l'enfant à naître. Elle touche le tube neural, base de la moëlle épinière et du système nerveux central. Le tube neural ne se referme pas complètement au niveau du bas du dos et on observe une ouverture du bas de la colonne vertébrale. Cette fente implique que la moëlle épinière ainsi que les méninges ne sont plus protégées avec parfois même une extériorisation de ces structures au niveau de la peau. Cette pathologie grave touche 1/500 à 1/2000 naissances. Elle peut être responsable d'une paralysie des jambes, d'une incontinence urinaire et fécale ainsi que d'un retard mental. Aujourd'hui, cette malformation est dans la grande majorité des cas diagnostiquée avant la naissance, lors des échographies réalisées pendant la grossesse. Certains parents choisissent alors d'interrompre cette grossesse étant donné le sombre pronostic de cette maladie.

Une équipe américaine a montré récemment qu'il existait un bénéfice à opérer les enfants durant la grossesse en terme de mortalité ainsi qu'en terme de morbidité (moins d'enfants opérés à la naissance, plus d'enfants capables de marcher sans béquilles ou orthèses). Cette intervention consiste à ouvrir l'utérus maternel pour fermer l'ouverture du bas de la colonne vertébrale. Malgré ces résultats satisfaisants en termes d'efficacité, il existe de nombreuses complications à cette chirurgie, notamment car elle implique une ouverture de la cavité utérine (naissance plus prématurée des enfants, risque de rupture utérine chez la mère...).

L'objectif de notre étude est de développer une technique chirurgicale de fermeture du défaut par fœtoscopie. Ceci consiste à placer une caméra et des instruments chirurgicaux dans l'utérus afin d'atteindre le fœtus sans ouvrir la cavité. Pour étudier cette technique il n'y a pas d'autres possibilités que de travailler sur un modèle animal et nous avons choisi de travailler sur un modèle de Brebis, modèle se rapprochant le plus de la malformation observée chez l'Homme. Chaque intervention est réalisée sous anesthésie générale maternelle et un traitement anti-douleur adapté est mis en place après l'intervention. Nous créons la malformation à mi-gestation et réopérons les fœtus environ quinze jours plus tard pour la réparer, de sorte nous opérerons 88 animaux (44 fœtus, 44 brebis gestantes). Deux groupes seront constitués afin de tester deux techniques : un groupe de 22 fœtus chez qui sera réalisé une dissection de la malformation et une suture par fœtoscopie et un groupe de 22 fœtus pour qui le défaut sera recouvert d'un biomatériel fixé à l'aide d'une colle biologique, toujours par fœtoscopie.

Ces groupes seront comparés à la naissance, entre eux, et à un groupe témoin de fœtus non réopérés ayant fait l'objet d'une étude antérieure, afin de savoir si, comme nous le supposons, la technique fœtoscopique permet d'obtenir les mêmes résultats que la chirurgie « à ciel ouvert », en réduisant les complications de cette dernière.

Le nombre d'animaux utilisés pour cette recherche a été réduit au maximum et un projet de réhabilitation des brebis après la césarienne est en cours de développement.

2488- Ce projet vise à créer un modèle d'étude pour le développement et la validation de traitement ou vaccin du cancer colorectal. Des études récentes ont montré qu'une bactérie spécifique aurait un rôle dans le développement et la progression du cancer colorectal chez l'homme. En effet, l'incidence de cette bactérie augmente avec la progression du cancer colorectal. L'objectif de cette étude est de développer un modèle de colonisation intestinal par cette bactérie spécifique chez la souris. La bactérie sera inoculée à un âge où la flore commensale intestinale n'est pas encore stable. L'évolution de la colonisation de l'intestin sera appréciée par l'analyse bactériologique des fèces des souris. Le modèle créé permettra de tester l'efficacité de différents traitements du cancer colorectal. Pour mettre au point le modèle, une étude pilote sera réalisée sur 60 souris. Le nombre d'animaux choisis pour cette procédure est toujours le nombre minimal nécessaire pour obtenir des résultats fiables et statistiquement significatifs. Les animaux utilisés seront hébergés dans un environnement adapté à l'espèce, au nombre et à l'âge, et dans un milieu enrichi et des points limites seront appliqués. Les résultats obtenus seront exploités statistiquement. Des processus aussi complexes que le cancer et les différentes réactions immunitaires et traitements associés ne peuvent pas être étudiés *in vitro*. Les cancers sont souvent dus à des mutations ou à l'absence de certains gènes qui entraînent des dysfonctionnements et des interactions physiologiques au sein de l'organisme. Ces différentes anomalies du fonctionnement ne sont pas des phénomènes isolés et par conséquent ne peuvent pas être étudiées *in vitro* sur un seul type de cellule. Ainsi, cette étude pilote impliquera 60 souris femelles. Selon les résultats obtenus, ce projet fera l'objet d'un amendement pour poursuivre les expérimentations avec le modèle adapté.

2489- Dans les sociétés industrialisées, le syndrome métabolique concerne, en France de plus en plus d'individus. Les anomalies métaboliques liées sont en partie dues à l'ingestion excessive d'acides gras saturés, conduisent à l'installation ultérieure du diabète de type 2 qui accroît le risque cardiovasculaire, notamment en favorisant le développement d'une obésité. Cette dernière est définie comme une accumulation excessive de masse grasse. Les défauts de fonctionnement des adipocytes, cellules responsables du stockage des graisses, contribuent fortement à l'apparition des troubles métaboliques au travers de leur produits de sécrétion (cytokines, hormones, acides gras). Les expérimentations seront réalisées sur 40 rats Wistar nourris avec un régime standard ou avec un régime riche en graisses saturées. Nous évaluerons l'évolution de la composition corporelle des animaux et leur tolérance au glucose et à l'insuline avant de procéder à la récupération de dépôts adipeux pour effectuer des analyses sur cellules primaires isolées afin de développer des approches nutritionnelles pour prévenir les altérations de fonctionnement de ces cellules. Le présent protocole permettra de stocker par congélation des cellules adipeuses et d'analyser l'effet de nutriments sur les cellules adipeuses *in vitro* et donc de limiter l'utilisation future d'animaux à des fins expérimentales. Ce projet s'inscrit ainsi pleinement dans le respect de la règle des "3R" en réduisant au minimum le nombre d'animaux utilisés, en utilisant des techniques de mesures de paramètres métaboliques ne nécessitant pas d'anesthésie ou autre contention chimique (EchoMri) et remplaçant l'utilisation d'animaux grâce au stockage de cellule qui permettront de mener d'autres études *in vitro*.

2490- Le projet repose sur l'isolement et la caractérisation de microvésicules produites par le parasite *Toxoplasma gondii* *in vivo*. A l'heure actuelle, les conditions de production de ces microvésicules parasitaires *in vitro* à partir de culture cellulaire (fibroblastes ou cellules dendritiques) ne sont pas connues et ne mimeront pas nécessairement la situation *in vivo*. C'est pourquoi, il est indispensable d'avoir recours à l'utilisation de souris. Ces souris seront infectées par voie intra-péritonéale avec des tachyzoïtes puis sacrifiées 3 jours après l'inoculation afin de récolter le lavage péritonéal contenant les microvésicules.

Un protocole de vaccination sera également mis en place sur 24 souris afin d'évaluer le potentiel protecteur de ces vésicules vis-à-vis d'une infection.

Cette expérimentation nécessitera l'utilisation d'un maximum de 84 souris CBA/J dans le respect de la règle des 3R.

Remplacer : En effet, nous avons d'ores et déjà essayé de remplacer cette production *in vivo* par une production *in vitro* sans succès.

Réduire: Les productions de microvésicules parasitaires étant obtenues en plusieurs fois à cause de la lourdeur des protocoles (successions d'ultracentrifugations sur plusieurs heures), il nous sera possible en cours d'expérimentation de réduire le nombre d'animaux utilisés si une des productions intermédiaires est jugée suffisante.

Raffiner : Les souris sont hébergées en accord avec les directives européennes et dans un environnement enrichi.

2491- Notre projet repose sur l'étude de populations leucocytaires du système immunitaire innée impliquées dans la réponse inflammatoire aigüe et chronique et dont la durée de vie dans le sang est très courte. Certains aspects de ce projet requièrent la mise en place de parabioses entre des souris dites donneuses exprimant des reporters de fluorescences spécifiques des populations myéloïdes et ayant ou non des invalidations génétiques (souris KO) et des souris receveuses (ou hôtes) qui seront source du foyer inflammatoire.

Le but est de déterminer 1) les aspects migratoires des populations myéloïdes et le rôle des molécules de migrations génétiquement invalidées ou non.

2) de préciser l'origine des populations présentes dans les tissus de la souris receveuse ainsi que leur différenciation phénotypique.

Ce protocole de plus en plus utilisé dans notre domaine s'avère nécessaire et vise à remplacer l'utilisation de chimères hématopoïétiques (irradiation à dose létale des souris receveuses, suivi de reconstitution avec de la moelle osseuse de souris donneuse) qui sont source de biais considérables dans le cadre de ces questions scientifiques et dont la génération est en outre sujette à des variations importantes avec une re-calibration régulièrement nécessaire et un phénotype dommageable. Ce programme de recherche est développé dans le respect de la règle des 3R. Il est tiré profit de chaque animal pour nous apporter le maximum d'information. Si possible, nous utilisons les données de manière transversale entre les protocoles afin de réduire le nombre d'animaux. Les groupes d'études sont fait le plus souvent en même temps afin de réduire le nombre de groupe contrôles. L'utilisation de système in vitro pour remplacer les animaux n'est malheureusement pas applicable mais l'utilisation des parabioses sera restreinte au maximum pour répondre à une question scientifique précise. Et enfin nous améliorons au maximum nos protocoles pour maîtriser la souffrance animale ainsi que les variations individuelles qui peuvent en découler.

Dans son ensemble nous envisageons la réalisation de 60 parabioses impliquant donc 120 animaux.

2492- L'hypertrophie cardiaque compensée, se mettant en place suite à des surcharges de pression, de volume, ou une atteinte du myocarde, est à la base un mécanisme d'adaptation protecteur, transitoire, qui permet le maintien de la fonction contractile cardiaque. Si le stress persiste, la mort des cardiomyocytes, l'installation d'une inflammation et d'une fibrose mènent à la perte de la fonction contractile, c'est l'insuffisance cardiaque. L'identification de mécanismes recrutés en hypertrophie cardiaque compensée afin d'établir des stratégies thérapeutiques limitant l'évolution vers l'insuffisance cardiaque constitue un enjeu majeur de l'équipe.

Nous nous intéressons aux mécanismes qui régulent la réponse hypertrophique du cardiomyocyte, la mort du cardiomyocyte, la polarisation des cellules myéloïdes vers un phénotype inflammatoire, l'activation des fibroblastes vers un phénotype profibrogénique ainsi qu'aux interactions cellulaires cardiomyocytes/cellules myéloïdes/fibroblastes mises en jeu lors du remodelage cardiaque.

Ce projet comporte ainsi des approches in vitro sur cellules cardiaques isolées (cellules myéloïdes, cardiomyocytes et fibroblastes), essentiellement réalisées chez le rat, et des approches complémentaires in vivo pour attester du rôle des processus préalablement identifiés in vitro sur le remodelage cardiaque global via l'utilisation d'outils chimiques ou de biologie moléculaire activateurs ou inhibiteurs, études principalement réalisées chez la souris et chez le rat. Afin d'établir l'efficacité des molécules testées, nous voulons comparer leur impact sur les mécanismes de remodelage mis en jeu dans différents modèles complémentaires de stress cardiaques conduisant à l'insuffisance cardiaque, et soumettre les animaux:

- tout d'abord à un stimulus chronique d'isoprotérénol, analogue chimique de médiateur neuro-hormonal du système sympathique, puis, pour compléter l'étude des molécules validées,
- à une surcharge de pression par sténose de l'aorte abdominale (rat),
- à un stress oxydant par infarctus du myocarde suivi d'une reperfusion (IR).

Nous utiliserons environ 375 rats et 400 souris en 5 ans.

Dans nos protocoles et analyses, nous prendrons les mesures suivantes pour appliquer la règle des trois R :

1- Le suivi de l'atteinte cardiaque sera réalisé par échocardiographie à différents temps sur le même animal. Cela permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaires ainsi que de mesurer le cas échéant l'efficacité de la molécule pharmacologique testée avant euthanasie. Dans la même optique, les protocoles d'isolements cellulaires de cardiomyocytes, cellules myéloïdes, fibroblastes, seront réalisés en parallèle sur le même animal soit contrôle soit malade avec ou sans traitement. De même, les analyses de biologie moléculaires et biochimiques pour caractériser l'hypertrophie, la mort cellulaire, l'inflammation et la fibrose seront effectuées en parallèle sur les tissus du même animal.

2- Quel que soit le protocole, les molécules pharmacologiques données en traitement aux animaux seront sélectionnées au préalable par screening in vitro sur cellules isolées. Seule la molécule inhibitrice ou activatrice la plus puissante de la cible pharmacologique d'intérêt sera éventuellement testée chez l'animal. L'étape de tests pharmacologiques in vivo chez le rat ou la souris est cependant indispensable avant l'utilisation chez l'homme. Nous utiliserons 9 animaux par groupe expérimental afin de permettre de bonnes analyses statistiques même si certains animaux meurent en cours d'expérimentation (lors de la chirurgie, l'injection de molécules ou procédures de classe sévères). Chaque groupe d'animaux correspondra à une question scientifique précise et différente.

3- Les modèles d'hypertrophie cardiaque que nous réalisons sont associés à une insuffisance cardiaque plus ou moins sévère. Bien que les molécules testées ciblent la fonction cardiaque, nous prélèverons du sang sur tous les animaux au moment du sacrifice pour préparer du plasma et le conserver à -80°C pour des dosages ultérieurs. Concernant les tissus, nous prélèverons les cœurs, (éventuellement aussi reins, foies, tissus adipeux, rates) des animaux non traités contrôles et malades et des animaux traités pour extraire les ARN messagers (ARNm) et les protéines. Nous pourrions ainsi constituer une banque d'ARNm et d'extraits protéiques pour des analyses omiques postérieures qui permettront une caractérisation de nos modèles à l'échelle moléculaire. Cette banque pourra être utilisée par d'autres équipes pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter l'insuffisance cardiaque.

Les résultats attendus sont une meilleure compréhension des types de cellules et des voies de signalisation à l'origine de l'hypertrophie cardiaque et son évolution vers l'insuffisance cardiaque et nos résultats auront une forte valeur ajoutée sur le plan thérapeutique en raison de la possibilité d'identification de nouvelles cibles pour le traitement de l'insuffisance cardiaque.

Les procédures expérimentales proposées sont nécessaires et ne peuvent être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son

minimum sans compromettre les objectifs du projet. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

2493- La production de gaz à effet de serre (GES) dans les systèmes de production de ruminants est particulièrement préoccupante en raison de leur implication dans le changement climatique mondial. Parmi les GES, le méthane est produit dans le rumen par la fermentation microbienne anaérobie de composants d'alimentation. Les ruminants sont la principale source agricole de ce gaz à effet de serre puissant qui a un potentiel de réchauffement global 25 fois supérieur à celui du CO₂. La production de méthane représente aussi une perte d'énergie pour l'animal de 6% à 8% de l'apport alimentaire. Donc la réduction des émissions de méthane entérique est un objectif important en production des ruminants.

L'objectif de cette étude est de rechercher des marqueurs de la production de méthane chez les ruminants pour

a) mieux comprendre le processus de la méthanogenèse et son influence dans le métabolisme du microbiote et l'animal hôte, et

b) à terme, inclure ces marqueurs dans une méthode de monitoring non-invasive à l'échelle de la ferme.

Ce type d'expérimentation ne peut pas être remplacé par des modèles in vitro mais le nombre d'animaux et la méthodologie choisie tient compte des critères de réduction et raffinement (règle 3R). Nous utiliserons 20 vaches pour pouvoir détecter des différences significatives entre lots. Les techniques des prélèvements qui seront utilisées sont des pratiques couramment appliqués dans des élevages ne nécessitant pas une contention particulière. Les vaches sont immobilisées par blocage du cornadis et les opérateurs sont expérimentés maîtrisant bien les techniques. L'évaluation de la gêne ou éventuellement de la douleur générée par les techniques de prélèvement est faite par observation du comportement des animaux. Si ces observations mettent en évidence une perturbation de l'animal pendant la procédure, celle-ci sera arrêtée. Si le stress persiste, on fera appel à un vétérinaire praticien (jusqu'à maintenant nous n'avons jamais eu besoin d'administrer des médicaments ou de faire appel à un vétérinaire). De plus tout au long de l'année, les vaches sont régulièrement manipulées (traite, alimentation, soins, pesée, changement de localisation) et de ce fait habituées à l'animalier ce qui évite un trop grand stress lors des procédures

2494- La maladie de Parkinson est une affection neurologique caractérisée par une perte des neurones dopaminergiques localisés dans une région du cerveau. Une autre caractéristique de la maladie est la présence dans ces neurones dopaminergiques d'inclusions appelées « corps de Lewy ». Ceux-ci sont constitués d'aggrégats protéiques et en particulier d'une protéine appelée alpha-synucléine (α -synucléine). Le terme « synucléinopathie » est ainsi utilisée pour définir un des aspects neuropathologiques et physiopathologiques de la maladie de Parkinson et suggère un lien fort entre l' α -synucléine et les mécanismes de mort neuronale dans cette maladie. Associé à la mort neuronale et la synucléinopathie, des processus neuroinflammatoires chroniques ont également été mis en évidence. Par ailleurs, ces processus neuroinflammatoires jouent vraisemblablement un rôle essentiel dans les mécanismes neurodégénératifs. Il est donc crucial d'étudier ces mécanismes dans un modèle animal reproduisant la mort neuronale en lien avec la synucléinopathie.

Dans notre laboratoire, des études réalisées chez la souris ont montré que le transfert intracérébral de gènes codant pour l'alpha-synucléine humaine ou de fibrilles d'alpha-synucléine constituait une approche intéressante et validées pour l'établissement de modèles de synucléinopathie dégénérative progressive et caractérisés par une neuroinflammation importante. Toutefois ces modèles murins ne reproduisent pas l'ensemble des symptômes cliniques de la maladie et restent très limités pour l'étude de ces mécanismes par des approches de neuroimagerie.

Nous souhaitons présenter ici un projet en partie déjà validé par le comité d'éthique pour l'utilisation de vecteurs pour le transfert de gène codant pour la synucléine chez le singe écureuil (numéro de dossier validé 02422.01). L'objectif de cette demande est ici de compléter la précédente demande par l'étude chez le singe écureuil du rôle et des mécanismes de la neuroinflammation après injection intracérébrale de fibrille d'alpha-synucléine. L'avantage de tels modèles par rapport aux autres modèles lésionnels de la maladie classiquement utilisés est que la dégénérescence des neurones dopaminergiques sera non seulement progressive mais aussi directement liée à la synucléinopathie induite et donc plus proche de la pathologie humaine. De plus, du fait d'une importante divergence entre les primates et les rongeurs quant aux mécanismes de régulation de l'inflammation, il est primordial de compléter et comparer l'étude de ces aspects dans un modèle primate non-humain.

Nous avons choisi le singe écureuil, car la petite taille des structures cérébrales devrait permettre de mieux cibler une grande majorité des neurones dopaminergiques de la substance noire. Par ailleurs, ces animaux sont suffisamment petits pour permettre de suivre de manière non invasive et longitudinale l'évolution des lésions neuronales et réponses neuroinflammatoires en imagerie par résonance magnétique (IRM) à très haute résolution (11.7T).

L'étude proposée ici est une étude préliminaire afin de vérifier la faisabilité et la pertinence de ces nouveaux modèles. Le nombre d'animaux utilisés dans un premier temps sera de 6 (3 par modèle). La chirurgie nécessaire à ce projet sera réalisée sous anesthésie et dans les conditions d'analgésie adéquate.

2495- Le développement embryonnaire est un enchaînement d'étapes précises qui, à partir d'une cellule œuf, conduit à un organisme entier. Toutes les cellules de cet organisme contiennent le même patrimoine génétique. Cependant les différents types cellulaires mettent en œuvre des programmes génétiques spécifiques, impliquant l'activation séquentielle de certains gènes. La régulation de l'activité des gènes est essentielle au développement d'un organisme, ainsi qu'au fonctionnement normal des différents organes. Le dérèglement de cette activité est à l'origine de l'apparition de différentes pathologies de

développement ou de cancers. Certains gènes dits régulateurs jouent un rôle clef dans ces processus de contrôle génétique. C'est le cas du gène *Egr2/Krox20* qui est responsable de la formation de deux compartiments au sein du cerveau embryonnaire chez les vertébrés. L'activité de ce gène est contrôlée par des séquences d'ADN localisées à proximité. Plusieurs éléments de contrôle sont indispensables pour assurer l'expression de ce gène. Le projet de recherche vise à identifier l'ensemble des éléments nécessaires à cette régulation et à caractériser les mécanismes de coopération entre ces éléments et le gène *Egr2/Krox20* en utilisant comme système modèle le poisson danois car l'activité et la fonction de ce gène sont extrêmement bien conservées chez tous les vertébrés.

Ce projet prévu pour trois ans impliquera 3 personnes. Les poissons adultes ne sont utilisés que pour la production d'embryons que nous récupérons pour l'expérimentation avant 48h de développement embryonnaire. La population de poissons adultes est composée de 14 lots de mutants générés par édition de l'ADN par la technologie CRISPR. L'obtention de chaque lignée mutante requiert de trier par génotypage environ 20 poissons adultes. Chaque lot comprend environ 10 poissons (5 mâles, 5 femelles). Chaque aquarium (10 litres) est spécialement désigné pour la stabulation des poissons zèbres avec une circulation d'eau, filtrage et oxygénation adaptés aux poissons zèbres et sont nourris de proie vivante (artémias). La colonie adulte correspond à environ 420 poissons (20 poissons génotypés + 10 poissons adultes conservés pour la reproduction par lignée).

Pour diminuer le nombre d'animaux en expérimentation, nous prenons les mesures suivantes pour respecter la règle des 3Rs (réduire, raffiner et remplacer) : Nous utilisons le nombre minimum d'adultes pour générer les embryons nécessaires aux expériences ce qui particulièrement approprié avec le poisson zèbre dont les pontes génèrent un grand nombre d'embryons (plus de 100). Au laboratoire nous utilisons les embryons d'une même ponte pour plusieurs expériences.

Malheureusement, la complexité du développement du cerveau embryonnaire ne nous permet pas l'utilisation des modèles cellulaires *in vitro* pour analyser les mécanismes de régulations spatio-temporels de l'expression de gènes de développement du système nerveux central embryonnaire. Malgré nos tentatives, il n'existe pas de modèle de culture cellulaire qui reproduise le phénomène de spécification cellulaire et de segmentation observé.

Par contre, notre projet repose sur l'analyse *in silico* des marques de chromatine reflétant l'activité de séquences non codantes disponibles sur ENCODE, ce qui nous permet de réduire le nombre de régions régulatrices à tester chez l'animal

2496- A l'instar du langage chez l'humain, le chant des oscines est acquis par transmission culturelle. Des travaux récents mettent en exergue des parallèles intéressants entre le chant des oiseaux et la musique dans l'induction de réponses émotionnelles. Ainsi, des aires homologues du circuit mésolimbique, activées à l'écoute de la musique chez l'Homme, sont aussi activées chez des femelles oiseaux lors de la diffusion de chants. Chez le Canari (*Serinus canaria*), les femelles sont particulièrement stimulées par certaines phrases de chant (dites « sexy ») produites par les mâles. Récemment, les méthodes d'imagerie cérébrale *in vivo* développées chez l'Homme ont été appliquées chez l'oiseau chanteur. En utilisant l'imagerie cérébrale (Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle ou IRMf), nous allons vérifier si l'écoute de phrases de chant « sexy » entraîne une activation particulière dans le cerveau de femelles Canari, en particulier dans les aires homologues du circuit mésolimbique. Le chant des oiseaux constitue un modèle biologique de choix pour étudier les substrats comportementaux, moléculaires et cellulaires de l'apprentissage vocal. Avec ce projet, nous espérons consolider ce modèle pour étudier les émotions chez les animaux.

Mesures prises pour le respect de la règle des 3Rs :

Remplacement : ce projet de recherches a pour but d'étudier les émotions chez un animal, le Canari domestique, pour lequel il a été clairement montré que les femelles expriment des préférences pour des phrases de chant particulières.

Réduction: nous utiliserons 12 oiseaux pour cette étude. Cet effectif garantit une analyse statistique fiable des résultats obtenus.

Raffinement : différentes mesures seront prises pour réduire l'inconfort, la douleur, la peur, le stress et la souffrance au cours de nos expériences. Les oiseaux seront transférés le jour de l'expérience du LECD (université Paris Ouest Nanterre) au Centre de Neuro-imagerie situé à l'hôpital de la Pitié Salpêtrière (aller simple : 1h environ en voiture). Afin de limiter le stress, les oiseaux seront transportés par groupe de 2-4 individus. Les oiseaux seront laissés au repos pendant 1h minimum à leur arrivée avant de commencer les passations dans le scanner. Pendant l'expérience qui s'effectuera sous anesthésie (durée: 2h maximum), différents paramètres biologiques de l'animal (rythme cardiaque, température) seront mesurés. Ils retrouveront leur cage d'élevage au LECD le soir après l'expérience. Un expérimentateur effectuera une inspection visuelle à intervalles réguliers les oiseaux pendant le transport, lors de l'expérience et après leur retour au LECD. Les animaliers prendront le relais le lendemain de l'expérience.

A la fin de l'expérience, les oiseaux ne seront pas sacrifiés. Ils retrouveront leur cage d'origine et pourront éventuellement être réutilisés pour d'autres expériences d'éthologie. Nous avons également débuté récemment un programme de réhabilitation de nos animaux qui ne sont plus utilisés à des fins scientifiques. Ils sont alors transférés dans un sanctuaire (nous avons également un contact avec un parc zoologique).

2497- La technologie des ultrasons focalisés, connue par l'acronyme HIFU, permet d'effectuer l'ablation de tissus pathologiques d'une manière totalement non invasive. Une sonde émet des ultrasons qui traversent la peau et se concentrent sur le tissu à traiter, provoquant sa coagulation puis sa nécrose. La sonde comporte aussi une barrette d'échographie qui permet de guider en permanence le geste. Les HIFU sont déjà utilisés en routine pour traiter notamment les cancers de la prostate et les fibromes utérins. De nombreuses autres applications cliniques sont en développement. Nous envisageons de traiter de cette façon les varices.

Cette technologie permet de remplacer les techniques chirurgicales ou les méthodes endo-veineuses (laser, radio-fréquence...) par un geste totalement non invasif. Les avantages comparatifs du dispositif concernent aussi bien le patient, les praticiens et les centres de traitement que la collectivité. Pour le patient, les avantages se traduisent par des durées d'intervention chirurgicale et d'hospitalisation réduites, par l'amélioration de la qualité de vie post opératoire (absence de cicatrice, durée d'hospitalisation faible, douleurs moindres...). Pour les praticiens et les centres de traitement, les avantages du dispositif se caractérisent par l'augmentation du nombre de patients traités, la possibilité d'adresser différentes pathologies via un dispositif unique et la sécurité, l'efficacité et la facilité d'utilisation. Pour la collectivité, les avantages comparatifs sont d'ordre économique et se traduisent notamment par la réduction des coûts induits par les traitements médicamenteux longs ou les actes chirurgicaux (la durée d'hospitalisation, notamment).

Objectif général. Notre but est d'évaluer l'efficacité de notre dispositif de traitement HIFU pour l'occlusion des veines dans le contexte du traitement des varices.

Modèle animal et méthode : Des traitements HIFU seront délivrés sur la veine saphène de brebis. Ce modèle est pertinent pour atteindre l'objectif de ce projet qui ne peut être mené sur des modèles inertes car la circulation sanguine dans l'organe traité est un facteur important de l'étude. Sa localisation la rend accessible avec le dispositif de traitement HIFU. Il est nécessaire de traverser des tissus superficiels, ce qui correspond à la situation observée chez l'humain. De plus elle est entourée d'une membrane dans laquelle il est possible d'injecter une solution anesthésique à l'instar de ce qui est envisagé en clinique. Les 5 brebis de chaque groupe, nombre minimum pour que les résultats soient exploitables, seront anesthésiées et on appliquera l'énergie HIFU sur une veine saphène par voie externe. Après traitement, les brebis seront réveillées pour que le processus de fibrose conduisant à l'occlusion veineuse, dont la durée est de l'ordre de quelques semaines, puisse avoir lieu. Après leur réveil, elles seront placées sous analgésique en cas de douleur et l'évolution du flux sanguin dans la veine traitée sera suivie par Doppler au cours des jours et des semaines suivantes. Un suivi particulier sera effectué durant une durée minimale d'une semaine pour voir si, comme prévu, elles se servent normalement de la patte traitée. Le cas échéant, un second traitement pourra être délivré sur la seconde patte selon le même protocole. Au réveil de l'animal, celui-ci bénéficiera de la même prise en charge de la douleur éventuelle et du suivi de l'occlusion de la veine par Doppler. Dans le but d'étudier la cinétique d'occlusion, les animaux seront ensuite euthanasiés après différentes durées n'excédant pas huit semaines après le premier traitement. Les veines traitées seront prélevées post mortem. Une analyse histologique des sections de veines prélevées sera réalisée afin de vérifier l'occlusion et l'avancée du processus de fibrose. Vingt cinq brebis seront nécessaires à la réalisation de l'étude.

2498- La sclérose en plaque (MS) touche plus de 2.3 millions de personnes dans le monde avec des atteintes neurologiques invalidantes. Différentes formes cliniques existent selon la progression de l'aggravation des attaques de ces fonctions neurologiques. Il s'agit de pathologies autoimmunes conduisant à des attaques des constituants de Système Nerveux central (CNS). La forme la plus courante est la forme RR-MS ou Relapsing Remitting où les patients sont touchés par des poussées, espacées par des périodes de "relapses". Pour cette forme, il existe de nombreux modèles in vivo dont le modèle d'Encéphalite Autoimmune Expérimentale (EAE) induite chez la souris C57BL/6 par immunisation avec une protéine exprimée au niveau du CNS, MOG. Dans ce modèle dit chronique, les souris développent des signes d'atteintes neurologiques conduisant à une paralysie progressive des membres postérieurs puis antérieurs.

Il existe aussi des formes moins fréquentes telles que la forme Primary Progressive PP-MS pour laquelle peu de traitements sont développés et dont la physiopathologie n'implique pas en priorité une altération prononcée de la Barrière Hémato-Cérébrale (BBB).

Les patients atteints de MS ont une qualité de vie extrêmement altérée selon l'intensité et la fréquence des poussées. Nous souhaitons évaluer l'approche de thérapies cellulaires autologues utilisant les propres cellules T régulatrices du système immunitaire du patient (isolées puis expandues à partir du sang). Elles seront soit isolées et expandues et sélectionnées pour l'expression d'un récepteur spécifique d'un antigène exprimé au niveau du CNS (Ag-Treg) et/ou modifiées par génie génétique pour induire l'expression d'une molécule chimérique (CAR-Treg) permettant un ciblage local de leur activité immunorégulatrice.

Le rôle des cellules T régulatrices (Treg) du système immunitaire a largement été démontré dans des nombreuses pathologies auto-immunes. Chez les patients atteints de MS, une réduction du nombre ou de la fonction des Treg ont été décrites. L'approche d'une thérapie cellulaire basée sur la génération des cellules CAR-Treg est une approche thérapeutique innovante, présentant une toxicité potentielle moindre comparée aux molécules de type stéroïdien par exemple et pourrait apporter une nouvelle approche pour les patients réfractaires aux traitements actuels. Afin de pouvoir développer cette approche thérapeutique chez les patients atteints de MS, il convient de démontrer son efficacité et sa sécurité chez l'animal. Ces données non-cliniques seront la base pour constituer les dossiers réglementaires de soumission d'essai clinique. Dans une approche éthique et rationalisant le nombre d'animaux en limitant au maximum le nombre d'animaux avec des scores cliniques sévères avec la mise en place de point limite adapté, nous anticipons un nombre de 1734 souris pour l'utilisation de deux modèles souris EAE (RR-MS et PP-MS). Nous veillerons à optimiser les conditions d'hébergement pour limiter l'inconfort des animaux souffrant de paralysie des membres. Les cellules CAR-Treg à tester in vitro seront au préalable caractérisées et sélectionnées in vitro. Ce projet comprend à la fois la génération des données d'efficacité, de pharmacocinétique et des données préliminaires de toxicité et de potentiel co-médications avec les médicaments généralement utilisés chez les patients dans des essais cliniques de Phase I à la phase II voire III.

2499- Dans le cadre du développement de candidats vaccin thérapeutiques destinés à protéger et à soigner les femmes du cancer du col de l'utérus et des autres pathologies associées aux infections à Papillomavirus humain (HPV), ce projet vise à développer un candidat vaccin multivalent dans le but de protéger les femmes contre les types de virus HPV les plus répandus dans le monde.

Actuellement en cours de développement préclinique, ce projet comporte plusieurs objectifs :

-Effectuer les expériences précliniques d'immunogénicité nécessaire à la sélection d'un candidat vaccin.

-Réaliser les études de pharmacologie préclinique et de caractérisation du candidat vaccin sélectionné.

-Réaliser les études nécessaires à la préparation d'un essai clinique de phase I (établissement de la brochure investigateur clinique (BI)).

-Développer un test de potency afin de pouvoir ensuite réaliser les tests de contrôles réglementaires nécessaires à la libération d'un lot de vaccin GMP et à l'obtention de données de stabilité.

Pour mener à bien cette phase de développement préclinique, le modèle principal choisit est la souris femelle de souche C57Bl/6. En effet, ce modèle est le plus communément utilisée pour l'évaluation des molécules immuno-thérapeutiques et immuno-prophylactiques, sa réponse immunitaire est donc bien caractérisée et les outils disponibles sont nombreux et validés. Ce modèle a déjà été utilisé pour le développement d'un candidat vaccin bivalent utilisant la même plateforme technologique actuellement en cours d'essai clinique de Phase II chez la femme.

L'ensemble des fondements de la règle des 3R est appliqué dans le projet de développement du candidat vaccin :

-Les conditions d'expérimentation ont fait l'objet d'un travail particulier qui a permis d'aboutir à la mise en place d'enrichissement adapté aux études, de procédures de travail définies, d'une procédure de suivi du bien-être des animaux adaptées en fonction des expériences et d'un travail d'amélioration continu des conditions d'expérimentation.

-Chaque étude est discutée avec l'ensemble des membres des équipes de recherche et de développement afin de garantir la pertinence de chaque expérience. La planification de ces expériences est organisée de manière à optimiser au maximum les études afin de réduire le nombre d'animaux en évitant la répétition des groupes contrôles indispensables à la validation des résultats. Pour les études exploratoires de pharmacologie et de thérapie, un protocole est rédigé et validé par le responsable scientifique. La planification de ces études permet de raffiner chaque expérimentation en multipliant les tests in vitro effectués à partir des prélèvements réalisés sur les animaux (cellules immunitaires). De plus, les expériences effectuées dans le cadre du développement d'un candidat vaccin bivalent permettent d'augmenter les conditions de raffinement en exploitant au maximum les données existantes. Un test in vitro visant à caractériser l'activité des produits est en cours de développement et pourrait permettre de remplacer une partie des expérimentations effectuées sur l'animal. A titre d'exemple, le nombre de souris utilisés pour ce projet en 2013 est de 714 et le nombre d'animaux pour la durée totale du projet est estimé à 3000. Chaque année le nombre d'animaux est variable et dépend de nombreux paramètres liés à la phase de développement du candidat vaccin et aux éléments scientifiques à apporter au dossier préclinique.

2500- Ce projet s'inscrit dans la recherche d'un traitement accélérant la cicatrisation des lésions de la peau, notamment chez le sujet diabétique qui est plus enclin à développer des plaies non cicatrisantes, avec à la clef des complications infectieuses et nécrosantes.

Il est estimé que 20 % de toutes les hospitalisations pour le diabète sont liées à des complications de lésions cutanées au niveau du pied. En effet, le risque de gangrène chez le sujet diabétique est multiplié par 17 comparé à celui de la population non diabétique. Les amputations consécutives à des lésions de gangrène, de nécroses, ou d'ulcérations sont chiffrées à plus d'un million par an dans le monde. Il est donc essentiel d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques pour favoriser la cicatrisation et ainsi éviter la chirurgie d'amputation chez le sujet diabétique.

Dans ce contexte, un modèle animal est nécessaire pour étudier les différentes phases de la cicatrisation, car les modèles cellulaires in vitro ne permettent pas de récapituler tous les processus mis en place lors de la réparation tissulaire in vivo, avec l'implication de types cellulaires différents au cours du temps.

Les composés chimiques ou biologiques évalués dans ce projet seront pré-sélectionnés in vitro sur des critères d'efficacité, afin de limiter le nombre de produits à tester chez l'animal.

Dans le cadre de ce projet, deux lésions cutanées d'un diamètre de 5-6 mm seront pratiquées à l'aide d'un emporte pièce sur des souris diabétiques et non diabétiques. Afin de limiter au maximum la douleur liée à ce geste, cette étape se fera sous anesthésie générale accompagnée d'un traitement antalgique. Le processus de cicatrisation sera observé de manière accrue pendant les 3 jours suivant le geste chirurgical, puis chaque jour sur une période de 3 à 4 semaines. En cas de complications, toutes les mesures seront prises pour remédier à la souffrance des animaux.

Dès la création des lésions cutanées, un pansement sera appliqué sur les lésions. Les souris seront donc hébergées individuellement pour éviter l'arrachement du pansement, mais un contact visuel avec leurs congénères sera maintenu grâce à un hébergement en cages transparentes. Deux types de matériel de nidification seront fournis en permanence aux animaux pour assurer leur bien être durant les études.

Il est prévu d'utiliser 120 animaux par an, soit un total de 600 animaux sur les 5 ans de ce projet.