



**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 (25)

2501- Environ 10% des décès dans le monde sont d'origine traumatique et 30 à 40% d'entre eux sont liés à une hémorragie. L'état de choc hémorragique est caractérisé par une hypoxie tissulaire systémique persistante, conséquence de la diminution de la volémie plasmatique et de la perte des hématies transportant l'oxygène. Pour tenter de compenser le manque d'oxygène au niveau tissulaire, le métabolisme anaérobie sera activé. Une acidose lactique, la production de radicaux libres et de protons sont ainsi observées entraînant inflammation et mort cellulaire dont les conséquences (défaillance multi-viscérale et coagulopathie) engagent le pronostic vital du patient. En conséquence, améliorer l'oxygénation tissulaire en cas de choc hémorragique présente un intérêt majeur dans la prise en charge du choc hémorragique. Parmi les pistes potentielles, un substitut d'hémoglobine peut être un excellent candidat. Le substitut utilisé pour ce projet a démontré sa grande capacité de fixation de l'oxygène (156 molécules d'O<sub>2</sub> à saturation). Si son innocuité a été montrée (pas de mortalité après injection chez la souris), son efficacité dans le cadre de la prise en charge du choc hémorragique n'a jamais été évaluée. Ce projet nous permettra de mieux comprendre les effets de cette molécule et son intérêt dans le cadre du choc hémorragique. Les travaux réalisés se veulent au plus proche « du terrain ». Ainsi, les protocoles expérimentaux réalisés sur modèle murin seront calqués sur les modalités de prise en charge clinique du choc hémorragique. In fine, l'objectif est de réaliser des travaux précliniques permettant d'évaluer l'intérêt et l'innocuité d'un substitut de l'hémoglobine dans le cadre de la prise en charge du choc hémorragique avant de proposer, en fonction des résultats, des essais cliniques.

Ce projet a une durée de 24 mois. Il a pour objectif d'évaluer les effets d'un substitut d'hémoglobine sur la coagulation et l'inflammation. Il impliquera l'utilisation de 492 rats Sprague Dawley.

Les expérimentations seront réalisées dans le respect de la règle des 3R : -

- il s'agit d'une étude des effets au niveau de l'organisme pour laquelle le remplacement n'est pas possible
- le nombre d'animaux utilisés est limité au minimum permettant une étude statistique cohérente.
- le raffinement est respecté au niveau des conditions d'hébergement des animaux et au niveau des procédures d'anesthésie/Analgésie.

Les résultats attendus sont une amélioration significative de la coagulopathie entraînée par un choc hémorragique et des processus inflammatoires des rats bénéficiant d'une prise en charge par le substitut d'hémoglobine par rapport aux rats avec une réanimation conventionnelle ainsi que vis-à-vis du groupe contrôle. A terme l'objectif est le développement d'une solution de réanimation utilisable en perfusion par voie intraveineuse assurant à la fois une oxygénation tissulaire et un maintien de la volémie.

2502- Ce projet s'inscrit dans la recherche d'un traitement pour la sclérose en plaques, une maladie qui touche le système nerveux central, en particulier le cerveau, les nerfs optiques et la moelle épinière. Dans cette pathologie, la transmission des influx nerveux est altérée, ce qui se manifeste par des symptômes très variables : engourdissement d'un membre, troubles de la vision, sensations de décharge électrique dans un membre ou le dos, troubles des mouvements. La sclérose en plaques évolue par poussées au cours desquelles les symptômes réapparaissent, mais aussi accompagnés de nouveaux symptômes. Au bout de quelques années, les poussées laissent des séquelles qui peuvent devenir très invalidantes (altération du contrôle des mouvements, de la perception sensorielle, de la mémoire, de la parole).

La sclérose en plaques est une maladie auto-immune chronique, caractérisée par des réactions inflammatoires qui aboutissent par endroits à la destruction de la myéline. La myéline est une gaine qui entoure les fibres nerveuses et qui a pour rôle de protéger ces fibres et d'accélérer la transmission des messages ou influx nerveux. Le système immunitaire des personnes atteintes de sclérose en plaques détruit la myéline en la considérant comme étrangère au corps. En conséquence, les influx nerveux sont ralentis, voire complètement bloqués selon l'ampleur de zone touchée. En dehors des poussées inflammatoires, la myéline peut se reformer en partie autour de la fibre nerveuse, ce qui se traduit par une régression complète ou partielle des symptômes. Cependant, lorsque la démyélinisation est répétée et prolongée, les neurones peuvent être détruits

définitivement. Les parties du système nerveux touchées par la maladie ressemblent à des plaques que l'on peut visualiser par IRM, d'où le terme de sclérose en plaques.

La sclérose en plaques est la maladie neurologique la plus répandue chez le jeune adulte, avec une estimation d'une personne atteinte sur 1000. De façon inexplicable, il y a deux fois plus de femmes que d'hommes atteints par cette maladie. Le diagnostic se fait la plupart du temps chez des personnes âgées de 20 à 40 ans, et dans de rares cas chez l'enfant (< 5% des cas). En l'absence de traitement thérapeutique efficace, hormis sur la composante inflammatoire et la douleur, il est donc essentiel d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques pour permettre la régénération de la myéline et ainsi ralentir l'évolution de la maladie, avec une possible disparition des symptômes si le traitement est initié à temps.

Dans ce contexte, un modèle animal est nécessaire pour étudier les différentes phases d'inflammation, de destruction et de régénération de la myéline, car les modèles cellulaires *in vitro* ne permettent pas de récapituler tous les processus mis en place lors de la réparation neuronale *in vivo*, avec l'implication de différents types cellulaires 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. Ils seront testés en mode préventif pour mesurer leur capacité à empêcher l'apparition des symptômes, ou en mode thérapeutique pour déterminer leur efficacité lors de la poussée inflammatoire sur des symptômes déjà existants.

La sclérose en plaques sera induite chez la souris par injection sous cutanée de fragments de protéines capables d'induire une encéphalomyélite auto-immune. Les premiers symptômes de la maladie apparaissent normalement dans les 9 à 14 jours suivant l'injection et se traduisent par une mobilité réduite de l'animal. Afin de préserver une alimentation et une hydratation correctes des animaux, la nourriture et l'eau sous forme gélifiée seront mises à disposition directement sur le fond de la cage dès l'apparition des symptômes. Des injections sous cutanées, par exemple de sérum physiologique, pourront aussi être réalisées pour empêcher la déshydratation des animaux. Le poids des animaux sera suivi quotidiennement, ainsi que le degré de sévérité de la maladie qui sera déterminé chaque jour pendant les 4 semaines suivant l'injection à l'aide d'une grille pré-établie de signes cliniques liés à la pathologie. Des prélèvements sanguins pourront être réalisés durant l'étude. Tous les moyens seront mis en œuvre pour réduire la souffrance des animaux. 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.

2503- L'insuffisance rénale est une maladie fréquente dans la population générale avec une prévalence de 6 à 9%. Le rein joue un rôle indispensable dans le maintien de l'homéostasie. L'altération de la fonction rénale dont la conséquence est la baisse du débit de filtration glomérulaire est à l'origine de troubles hydro électrolytiques, d'une augmentation du risque cardiovasculaire global et d'une altération du pronostic.

Par sa vascularisation importante, représentant environ 10% du débit sanguin global, le rein est particulièrement sensible à l'hypoxie. La survenue d'une insuffisance rénale aiguë en situation clinique peut s'apparenter à une situation d'ischémie-reperfusion. L'ischémie correspondant à la période de baisse des apports en oxygène au niveau tissulaire lié à une situation d'hypovolémie vraie ou relative (tout types de chocs, chirurgie cardiaque...), le rétablissement de la perfusion tissulaire et de l'apport en oxygène induit une reperfusion.

Dans les situations d'ischémie-reperfusion au niveau myocardique (infarctus du myocarde) les techniques de pré-conditionnement ischémique à distance (RIC) consistant à réaliser de brèves séquences d'ischémie répétées au niveau d'un membre, ont montré leur efficacité.

Au niveau rénal, l'influence réelle du RIC est partiellement méconnue. En effet les données cliniques disponibles concernent l'étude de la fonction rénale en post-opératoire de procédure à haut risque d'insuffisance rénale aiguë (chirurgie cardiaque, chirurgie vasculaire et angioplastie coronaire...). Cependant ces études n'étaient pas destinées à étudier spécifiquement l'influence du conditionnement ischémique sur la néphroprotection. Elles sont donc insuffisantes pour caractériser l'influence du RIC sur la néphroprotection. L'influence du RIC se situe t'elle sur l'altération de la souffrance rénale initiale ou sur la récupération de la fonction rénale à distance (processus de régénération) ? Quelle est l'influence de la masse néphronique fonctionnelle ?

Nous proposons de tester et de comparer la néphroprotection induite par le pré-conditionnement ischémique à distance ou RIC dans deux modèles expérimentaux d'ischémie rénale prolongée. Un modèle d'ischémie rénale (IR) bilatérale et un modèle de néphrectomie unilatérale avec ischémie rénale controlatérale chez des rats Sprague-Dawley. Le nombre d'animaux fixé pour l'expérimentation est de 136 rats répartis en deux durées de suivi (J7 et J14). Pour chaque durée de suivi on distinguera 6 groupes d'animaux : contrôle, IR bilatérale, IR bilatérale+ RIC, contrôle avec néphrectomie droite, néphrectomie droite + IR gauche, néphrectomie droite + RIC + IR gauche. Le RIC consistera en l'application de brèves séquences d'ischémies répétées au niveau d'une patte par compression d'un brassard avant l'IR. L'ischémie rénale sera réalisée par clampage du ou des pédicules rénaux sous anesthésie générale et analgésie. Après l'expérimentation initiale, les animaux seront suivis par des prélèvements biologiques à J1 et J3 précédant la mise à mort de l'animal à J7 (ou J14).

Il s'agit d'un modèle expérimental bien maîtrisé par les équipes concernées par le projet. Il n'existe pas de possibilité d'étudier *in vitro* les multiples conséquences de l'ischémie-reperfusion. De plus, il n'existe pas de modélisation mathématique dans ce domaine.

2504- Les lipides de basses densité (LDL) s'accumulent dans l'intima des artères et vont permettre le recrutement de cellules immunitaires par l'endothélium. Cette agglomération va peu à peu donner lieu à un cœur lipidique. Ce dernier va être entouré de cellules musculaire lisses qui auront perdu leur capacité contractile, auront migré vers l'intima, et auront

également acquis un rôle sécrétoire (sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire). C'est ainsi que se constitue la plaque d'athérome dans l'athérosclérose.

La protéine "Optic Atrophy 1" (OPA1) est une protéine ancrée dans la membrane interne de la mitochondrie. Elle permet la fusion lors de la dynamique mitochondriale et a également beaucoup d'autres fonctions, notamment dans le métabolisme énergétique, dans la prévention de l'apoptose et dans l'homéostasie calcique. Plus récemment, des études ont permis de prouver que OPA1 avait un rôle protecteur dans les maladies cardiovasculaires tels que l'hypertension ou le vieillissement vasculaire.

Notre hypothèse est que OPA1 pourrait aussi avoir un rôle dans la formation de plaque d'athérome, notamment au niveau du stress oxydatif (moment où les LDL sont oxydés et ne peuvent plus être reconnus par leurs récepteurs spécifiques, mais par les récepteurs "éboueurs" des macrophages). En diminuant l'expression de cette protéine d'environ 50%, nous pourrions alors étudier si OPA1 a bien un rôle protecteur dans la formation des plaques athéromateuses.

Nous utiliserons un lot de 200 souris, qui seront utilisés en premier lieu pour des études préliminaires afin d'évaluer le rôle protecteur de OPA1, puis dans un second temps, nous rechercherons grâce à des prélèvements les mécanismes intervenant dans cette protection.

En accord avec la règle des 3 R, et dans le but d'obtenir des résultats significatifs, nous utiliserons le moins de souris possible. De plus, le régime alimentaire des souris n'induit aucune douleur, et n'induit pas non plus l'obésité ou une maladie autre que l'athérosclérose. Il n'est cependant pas possible de remplacer le modèle animal dans cette expérimentation par une méthode alternative.

2505- La stéatohépatite non alcoolique (NASH) est une pathologie chronique fréquente dans le monde occidentale. Elle est une conséquence possible du syndrome métabolique (insulinorésistance, diabète de type II, obésité), d'infections virales (hépatite C chronique) ou de l'exposition à certains médicaments (chimiothérapie). La NASH se caractérise par une stéatose du tissu hépatique (accumulation de lipides dans le foie) accompagnée d'une nécro-inflammation, avec ou sans fibrose. Cette affection est associée à une évolution pathologique grave puisqu'au stade tardif de la maladie, une cirrhose hépatique et ses complications potentielles, insuffisance hépatique et hépato-carcinome (HCC) peuvent survenir.

A ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la NASH. L'objectif de ce projet est de démontrer l'efficacité thérapeutique de molécules dans la prévention et le traitement de la NASH et de la fibrose. L'évaluation des propriétés thérapeutiques de ces composés pharmaceutiques dans des indications plus avancées telles que la cirrhose et le HCC est également envisagée.

De nombreux modèles utilisant des rongeurs ont été décrits dans la littérature pour l'étude de ces pathologies. Aucun de ces modèles ne reproduit parfaitement la physiopathologie humaine de la NASH. Aussi, nous avons développé un modèle innovant que nous souhaitons caractériser et sur lequel nous évaluerons les capacités thérapeutiques de nos molécules.

Dans un souci permanent du bien-être animal et afin de minimiser l'emploi des animaux de laboratoire, l'évaluation des molécules sera réalisée en priorité dans des modèles *in vitro*. Les molécules ayant prouvé un potentiel thérapeutique dans ces études feront alors l'objet d'une évaluation chez l'animal. 2736 rats seront utilisés sur cinq années afin d'évaluer le potentiel thérapeutique des composés. Par ailleurs, l'hébergement des animaux pendant la phase d'acclimatation et pendant l'expérimentation sera faite avec enrichissement du milieu afin d'améliorer leur bien-être.

2506- Le but de ce projet est de confirmer les effets immunosuppresseurs d'une thérapie cellulaire à base de cellules humaines préparées *ex-vivo*, les HuMoSC (Human Monocytes-derived Suppressor Cells), dans un modèle de transplantation. L'intérêt thérapeutique est de réduire l'administration d'immunosuppresseurs classiques couramment utilisés dans les transplantations d'organes chez l'homme et qui ont des effets secondaires reconnus. Le projet consiste à évaluer le potentiel thérapeutique des HuMoSC dans un modèle de transplantation de peau chez la souris humanisée. Il a été déjà démontré que les HuMoSC ont une efficacité thérapeutique en prévenant une GVHD (Graft Versus Host Disease) dans un modèle préclinique chez la souris NOD/SCID/IL2-R gamma  $\gamma$   $\gamma$   $\gamma$  humanisée.

Dans cette saisine, la règle des 3R sera suivie de la façon suivante :

- Remplacer : L'étude de l'effet immunosuppresseur des HuMoSC dans un modèle de greffe de peau chez la souris NSG humanisée permettra de réduire l'administration des drogues immunosuppressives classiques ayant des effets indésirables en transplantation d'organes. Le modèle de souris humanisée est une alternative à l'utilisation préclinique de primates.

- Réduire : Les données issues de cette saisine, combinées aux résultats obtenus *in vivo* dans le modèle GVHD permettront de confirmer le potentiel thérapeutique des HuMoSC. Nous prévoyons dans un premier temps 3 groupes de 5 souris greffées. Pour évaluer l'effet immunosuppresseur à long terme des HuMoSC et en fonction des résultats obtenus avec les 3 premiers groupes, un quatrième groupe de 5 souris greffées sera réalisé.

- Raffiner : Les animaux seront suivis quotidiennement après les greffes et l'injection des cellules et seront euthanasiés lorsque les animaux obtiendront une perte de poids consécutive de 20% et/ou lorsque les signes cliniques notables ou sévères seront atteints. Tous les animaux seront analysés *post-mortem* par des études histologiques permettant de caractériser la réponse immunitaire.

Le nombre total d'animaux s'élèvera à 20 souris (4 groupes de 5 souris).

2507- La coelioscopie est une technique chirurgicale qui s'est imposée pour de nombreuses indications chez l'Homme et de manière similaire tend à s'imposer également en chirurgie vétérinaire pour certaines interventions, tant de convenance (par

exemple stérilisation) où une obligation de résultat est présente que dans un contexte pathologique (retrait de calculs vésicaux, retrait de vésicule biliaire...).

Il est à présent très clairement établi que les procédures sous coelioscopie présentent de nombreux avantages en chirurgie vétérinaire et notamment une diminution de la douleur postopératoire et de la durée d'hospitalisation.

La formation au métier de chirurgien requiert un enseignement technique précis. Cependant, la chirurgie, à la différence de nombreuses autres disciplines médicales, reste un domaine où aucun apprentissage théorique ne pourra remplacer l'apprentissage pratique. La coelioscopie nécessite de plus un apprentissage spécifique qui doit se faire en dehors de l'exercice clinique quotidien et la mise en place d'un enseignement structuré est une nécessité.

L'avènement des nouvelles technologies et les progrès des ressources audiovisuels ont permis de grands progrès éducatifs et depuis quelques années des simulateurs chirurgicaux de coelioscopie se sont développés; cependant pour des raisons inhérentes à leur disponibilité, leur coût, l'absence de développement pour les indications opératoires vétérinaires, l'entraînement sur animal reste la référence. De plus, une étude récente met en évidence que la formation chirurgicale sur animal des chirurgiens humains reste à l'heure actuelle la plus formatrice des techniques d'apprentissage car elle correspond à un exercice plus proche de la réalité, dans des conditions d'autonomie opératoire notamment en stimulant la réflexion sur la gestuelle et les stratégies opératoires. Le but du projet est donc de proposer un enseignement spécialisé de coelioscopie vétérinaire sur animal vivant (cochon) afin de pouvoir proposer une formation permettant d'éviter l'apprentissage direct en clinique.

Au delà du simple entraînement technique l'apprentissage pédagogique sera optimisé par un enregistrement vidéo de l'intervention en cours, qui permettra une auto-observation différée et permettra d'accélérer la courbe d'apprentissage des techniques coelioscopiques.

Les vétérinaires s'entraîneront préalablement sur des modèles inertes afin d'acquérir les rudiments techniques liés à la manipulation des instruments et à leur contrôle par le biais d'une caméra, mais pour les raisons exposées ci-dessus, une phase d'entraînement sur l'animal est déontologiquement indispensable avant de pouvoir pratiquer ces techniques sur des patients animaux, en ce qui concerne les vétérinaires. Nous estimons que 3 opérateurs peuvent être formés sur un porc. De ce fait, pour former un groupe de 15 vétérinaires par an, le nombre d'animaux estimé nécessaire est de 5 par an, soit 10 au total pour ce projet qui s'étend sur deux années. Afin que leur utilisation impacte aussi peu que possible le bien-être animal, les porcs seront maintenus sous anesthésie et analgésie pendant toute la procédure et seront mis à mort par injection intraveineuse de barbituriques à l'issue de celle-ci.

2508- Les pathologies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité dans le monde. Ces pathologies sont très modulables par des facteurs génétiques, environnementaux et nutritionnels. Dans ce contexte, la prédiction du risque lié à ces pathologies s'avère une démarche précieuse pour une meilleure prise en charge. Plusieurs études ont proposé des indices permettant de quantifier ce risque. Malgré l'utilité avérée de ces indices, il y a un besoin pressant de pouvoir disposer de biomarqueurs quantifiables et pertinents.

Différentes études ont mis en exergue la relation liant l'apparition de certaines maladies comme le diabète ou les maladies cardiovasculaires au mode de vie et aux régimes alimentaires. Elles ont particulièrement souligné la responsabilité des lipides (cholestérol, acides gras saturés) comme facteurs de risques majeurs. Parallèlement, un intérêt important et encore croissant est porté aux acides gras polyinsaturés (AGPI) comme agents préventifs, voire dans certains cas, thérapeutiques, de nombreuses maladies chroniques. L'importance nutritionnelle et la compréhension des mécanismes biochimiques mis en jeu par ces AGPI au niveau cellulaire ainsi que la recherche de nouvelles voies thérapeutiques ou de prévention, représentent actuellement un enjeu de santé publique et scientifique. Notre projet privilégie une étude sur l'impact nutritionnel des lipides (acides gras oméga-3 et oméga-6, stérols, ...) et des molécules antioxydantes issus de nouvelles sources marines d'origine végétale. Les microalgues, représentent une source importante d'AGPI oméga-3, notamment les acides eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque (EPA et DHA), ayant un fort potentiel hypoglycémiant, hypolipidémiant, antioxydant et anti-inflammatoire. En outre, l'utilisation de microalgues est de plus en plus importante en nutrition humaine.

La problématique de ce projet se situe dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles dans l'optique de la prévention du risque cardio-métabolique et de son traitement par l'utilisation de compléments alimentaires d'origine végétale. Cette étude permettra de cibler plus l'utilisation nutritionnelle préventive des molécules à activité biologique de microalgues dans la prévention des pathologies associées au syndrome métabolique.

Notre étude consiste à étudier l'influence que peut avoir la prise de compléments alimentaires contenant des microalgues d'intérêt sur la prise alimentaire, l'évolution de la masse corporelle et sur les principaux paramètres biochimiques (insuline, triglycérides, cholestérol, teneurs en acides gras et molécules à activités anti-oxydantes) sériques et hépatiques.

Le modèle animal retenu, le rat Wistar présentant une dyslipidémie d'origine nutritionnelle, nous permettra d'atteindre les objectifs visés à savoir l'amélioration des paramètres physiologiques et biochimiques des animaux, grâce à des lyophilisats de microalgues utilisés en tant que complément alimentaire. 36 animaux seront utilisés pour cette étude, hébergés dans une animalerie en conditions contrôlées (éclairage, température, hygrométrie) et dans le respect de la méthode des 3R. Un suivi de soin journalier sera effectué (suivi de la prise alimentaire, évaluation de l'eau de boisson consommée) ainsi qu'un suivi bi-hebdomadaire du poids corporel des animaux. Au cours de ces visites, il sera aisé d'observer un comportement éventuel non approprié tel qu'un comportement agressif, un aspect physique pouvant être un signe de carence ou de domination. Le milieu sera enrichi en objets modifiables permettant aux animaux de créer un environnement propice à leur développement et à leur épanouissement.

2509- La douleur neuropathique est une affection touchant près de 30 millions de personnes dans le monde. Elle est caractérisée par des douleurs chroniques intenses, difficiles à traiter qui sont liées à des lésions neuronales. Les patients sont traités par des antidépresseurs (tels que l'amitriptyline) ou des anti-épileptiques. Cependant, de nombreux besoins médicaux persistent, notamment concernant le relatif manque d'efficacité de ces produits dans la réduction de la douleur chronique.

Les connexines sont des protéines transmembranaires, fortement exprimées dans le tissu cérébral et impliquées dans la communication intercellulaire. Il a récemment été montré que l'inhibition de ces protéines permettait d'améliorer le profil pharmacologique des antidépresseurs, dans divers modèles animaux.

Une combinaison innovante a été identifiée, montrant de bons effets de réversion de la douleur dans des modèles animaux de douleur neuropathique. Cette combinaison, appelée THN101, associe un antidépresseur tricyclique de référence dans la douleur neuropathique et une molécule repositionnée et modulant les connexines, codée sous l'appellation THN01. La société développant ce produit souhaite maintenant évaluer son intérêt chez l'homme et prépare actuellement les étapes de préclinique réglementaire. En parallèle, il est important de mieux approcher les mécanismes d'action de la combinaison. C'est l'ambition de ce projet d'imagerie visant à identifier les zones cérébrales modulées par THN101 en comparaison à celles modulées par l'antidépresseur seul ou le produit THN01, chez le rat.

L'utilisation du modèle animal est indispensable à la compréhension des mécanismes d'action de ces molécules. Cependant, dans le but de respecter au mieux la règle des trois R, un design de type cross-over a été sélectionné afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires à cette étude. Ainsi seuls 6 animaux seront inclus dans cette étude. Ils recevront de façon aléatoire et espacée dans le temps les 5 traitements (dont le véhicule) suivis d'une imagerie TEP au 18F-FDG, un sucre marqué, permettant de visualiser l'impact des différentes molécules sur le métabolisme cérébral.

Les animaux seront habitués à la manipulation avant le début du protocole et ils seront hébergés dans une cage enrichie avec des accessoires de jeu et du matériel pour la fabrication de nids. Aucune douleur ni souffrance ne sont attendues dans ce protocole.

2510- Le projet vise à mettre au point une nouvelle technologie optique permettant de contrôler optiquement l'activité des neurones, c'est-à-dire les photo-activer, à l'échelle de la cellule individuelle, en profondeur dans le cerveau. Pour cela nous concevons et construisons de nouveaux microscopes utilisant des lasers infrarouges et des systèmes holographiques permettant d'illuminer spécifiquement des cellules individuelles choisies en profondeur dans le cerveau, et ce avec une très grande précision spatio-temporelle.

Cette nouvelle technologie est prometteuse pour comprendre les fonctions du cerveau. En effet, en conditions physiologiques ou pathologiques, ces fonctions mettent en œuvre l'activation éparsée de neurones distribués dans des réseaux tridimensionnels, en profondeur dans le cerveau. La compréhension du fonctionnement de ces réseaux nécessite de comprendre le rôle exercé par l'activité d'un ou plusieurs neurones sur l'ensemble du réseau et les conséquences fonctionnelles de cette activation. A l'heure actuelle les techniques permettant de photoactiver le cerveau à l'échelle du neurone ne peuvent être appliquées qu'en surface et ne peuvent donc pas être utilisées dans l'immense majorité des réseaux du cerveau qui sont tridimensionnels et en profondeur. Nos travaux apporteront un nouvel outil qui sera utilisé in vivo et que nous devons donc tester in vivo. Nous les testons sur des neurones génétiquement modifiés pour pouvoir d'une part être photo-activés à une longueur d'onde donnée, et d'autre part émettre un signal lumineux à une autre longueur d'onde lorsqu'elles sont activées. Ces tests sont réalisés en collaboration avec des laboratoires spécialisés en génie génétique.

Notre modèle animal est la souris adulte car c'est le principal modèle utilisé par les laboratoires de recherche pour étudier le fonctionnement du cerveau dans des conditions physiologiques et pathologiques.

Pour modifier génétiquement le cerveau des souris nous injecterons des virus non pathogènes portant les gènes des protéines d'intérêt. Nous garderons ensuite les animaux 4-8 semaines afin que ces protéines aient le temps de s'exprimer. Nous fixerons certains animaux afin d'étudier leur distribution dans le cerveau. Nous testerons tout d'abord la photo-activation ex vivo pour mettre au point les différents paramètres en jeu, comme la puissance lumineuse à utiliser pour photo-activer, la durée d'exposition, la photo-toxicité... Nous réaliserons ensuite des expériences in vivo chez la souris anesthésiée afin de contrôler que les paramètres précédemment mis au point permettent de photo-activer efficacement les neurones in vivo et nous contrôlerons cette activation en mesurant l'émission de lumière induite dans les cellules photo-activées. Enfin, nous utiliserons ces techniques afin de mieux comprendre le fonctionnement de la région du cortex qui traite les informations visuelles, in vivo, chez la souris anesthésiée.

Ces études ne peuvent pas être réalisées in vitro, ce qui nécessite l'utilisation des modèles murins adultes. Nous prévoyons d'utiliser au total 2780 souris. Cependant pour minimiser le nombre d'animaux utilisés, nous veillerons à effectuer les tests préliminaires sur des cultures cellulaires. De plus des expériences ex-vivo sont réalisées pour mettre au point un certain nombre de paramètres et minimiser le nombre d'expériences in vivo. Plus généralement nous veillerons à respecter les règles de remplacement, de réduction et de raffinement.

A terme, les outils développés permettront de mieux comprendre le rôle exercé par l'activité d'un ou plusieurs neurones sur l'ensemble du réseau et les conséquences fonctionnelles de cette activation en conditions physiologiques ou pathologiques. Ces outils pourront être utilisés pour de nombreuses fonctions du cerveau. De plus une meilleure compréhension des réseaux neuronaux permettra de pouvoir concevoir et utiliser des modèles in silico pour mimer ces réseaux, et donc réduire l'utilisation des animaux.

2511- L'obésité s'accompagne d'une inflammation chronique dite de bas grade à l'origine d'un grand nombre de désordres métaboliques dont le diabète de type 2. Le tissu adipeux est un véritable organe endocrine qui sécrète de nombreuses molécules inflammatoires. Ces molécules sont à l'origine d'une inflammation localisée au niveau du tissu adipeux. Cependant, ces facteurs pro inflammatoires peuvent avoir une action plus systémique. Ainsi, la production et la circulation de ces molécules ont des conséquences néfastes sur le fonctionnement de divers organes tels que le foie ou le tissu adipeux entraînant une insulino-résistance qui pourra évoluer en un diabète de type 2.

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

A travers ces expérimentations, nous souhaitons évaluer les effets de l'hyperglycémie sur la réparation cérébrale en étudiant :

- 1) l'activité régénérative mise en place.
- 2) la neuro-inflammation via l'expression des adipokines et de leurs récepteurs.
- 3) la perturbation de la barrière hémato-encéphalique.

Cette étude sera réalisée sur 90 poissons zèbre maximum. De part des mécanismes physiologiques fortement conservés au cours de l'évolution, le poisson zèbre présente l'avantage d'être un modèle simplifié pour la modélisation de maladies humaines, ainsi que pour la découverte et le développement de composés pharmaceutiques. Aujourd'hui, le poisson zèbre est reconnu pour sa pertinence dans l'étude d'un certain nombre de mécanismes physiologiques transposables à l'Homme. Cette étude 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 plusieurs fois par jour, et toute manipulation invasive sera suivie d'une anesthésie générale.

2512- L'alcool-dépendance est une maladie chronique et hautement récidivante en dépit des thérapies existantes puisque 70% des patients rechutent après 12 mois de prise en charge (plus de 90% après 4 ans). Les mécanismes neurobiologiques impliqués dans la perte de contrôle sur la consommation d'alcool sont encore mal connus et trop peu de médicaments sont actuellement disponibles pour le traitement de l'alcool-dépendance. Certaines structures cérébrales ainsi que certains systèmes de neurotransmission ont tout de même été identifiés comme étant des acteurs clefs des addictions en général et de l'alcool-dépendance en particulier. Ces systèmes de neurotransmission sont le système dopaminergique et le système glutamatergique qui communiquent entre eux au travers de structures impliquées dans le circuit de la récompense (noyau accumbens, striatum dorsal, cortex préfrontal). Nous avons d'ores et déjà identifié un certain nombre de cibles moléculaires d'intérêt comme par exemple les récepteurs des systèmes dopaminergiques et histaminergiques, les récepteurs des opioïdes endogènes ou encore les récepteurs canaux au glutamate mais certaines nouvelles pourront se présenter à nous au cours de ce projet.

Dans ce projet nous étudierons donc les déterminants génétiques des réponses comportementales à l'alcool ainsi que la possibilité de bloquer ces réponses par des agents pharmacologiques. Pour ce faire nous aurons, en partie, recours à des animaux génétiquement modifiés. L'utilisation des souris est tout à fait approprié dans ce projet d'une part pour avoir accès à des animaux dont certains gènes sont invalidés et d'autre part pour l'étude de comportements associés à l'alcool qui sont inobservables chez d'autres animaux comme le rat par exemple.

Nous envisageons d'utiliser trois modèles différents de souris génétiquement modifiés au cours de ce projet : tout d'abord les souris knockout (KO, invalidation de l'expression d'un gène) STOP. Ces souris présentent un déficit de transport axonal des vésicules contenant les neurotransmetteurs. Pour les autres souris, le choix des gènes inactivés/délétés se fera au long cours. Pour chacune de ces souches génétiquement modifiées une demande d'autorisation sera déposée avant l'arrivée des animaux au sein de l'établissement utilisateur.

En ce qui concerne les expériences menées sur des souches non génétiquement modifiées nous utiliserons des souris de souches différentes car certains comportements liés à l'alcool ne sont pas observables chez certaines souches. Le choix de la souche se fera en fonction du comportement d'intérêt. Pour ce qui est des traitements, nous envisageons de tester 5 molécules (nouvellement synthétisées ou nouvelle application d'une molécule déjà connue) pouvant viser les différents systèmes de neurotransmission mais également les mécanismes épigénétiques. Le nombre total de souris nécessaire pour ce projet sera de 7200 en comptant un nombre de 8, 15 ou 20 souris par groupe en fonction des expériences (analyses au niveau moléculaire et cellulaire, comportements stables, comportements variables respectivement) ce qui nous permet de réduire le nombre d'animaux au total. Les souris auront un enrichissement social puisqu'hébergées à 5 par cage. En ce qui concerne le traitement de la douleur, un analgésique de type morphinique (buprénorphine 0,05 mg/kg i.p.) sera injectée en i.p. immédiatement après les différentes opérations qui pourront être réalisées puis une nouvelle fois le soir pour les souris opérées le matin. Pour les souris opérées en fin de journée, une première injection interviendra immédiatement après

l'opération puis le lendemain matin dès notre arrivée au laboratoire. Bien entendu, un suivi sera réalisé et le bien-être des animaux sera noté en fonction de grilles de notation et au besoin de nouvelles doses de buprénorphine pourront être administrées.

L'objectif de ce projet global est de comprendre les mécanismes neurobiologiques, qui sous-tendent la vulnérabilité vis-à-vis de l'alcool. L'obtention de ces données constituera une étape décisive dans la compréhension de la pathologie et l'identification de cibles thérapeutiques pertinentes. En général nos études visent aussi à fournir la preuve de concept avant de passer aux études de phase 1 en clinique.

2513- Les arythmies cardiaques chez l'Homme sont traitées dans de nombreux cas par application de courant de radiofréquence. Il n'existe pas actuellement de méthode permettant de monitorer directement l'effet de la radiofréquence sur le tissu cardiaque. Or une application trop importante peut avoir des effets délétères (inflammation, y compris des structures adjacentes, perforation cardiaque), une application trop faible ne permet pas d'obtenir l'effet escompté (disparition de l'activation électrique anormale des cellules cardiaques).

L'objectif de ce travail est d'étudier par échographie haute résolution couplée au cathéter de radiofréquence les changements fonctionnels et structurels induits par le traitement par radiofréquence, et de vérifier ensuite si ces changements sont corrélés aux effets réels observés aux niveaux tissulaire et cellulaire, notamment concernant la taille et l'extension de la lésion. On pourrait alors prédire avec une meilleure précision l'efficacité et la sécurité des applications de radiofréquence chez les patients.

Le modèle porcin a été choisi car il présente une anatomie cardiaque assez volumineuse et comparable à l'Homme. Dans le cadre de ce projet, tout sera mis en œuvre pour respecter au mieux la règle des 3R :

(Remplacer) Il s'agit d'une étude qui a pour objectif de démontrer l'efficacité et la précision d'une technique interventionnelle. Il n'existe pas de méthode alternative permettant d'atteindre cet objectif dans des conditions le plus proches possibles des cas cliniques.

(Réduire) Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum, défini sur les données d'une étude préliminaire, ainsi que sur une évaluation statistique permettant de calculer le nombre nécessaire pour obtenir une différence significative entre plusieurs groupes. Ainsi 3 groupes de 8 animaux ont été définis, soit 24 animaux au total.

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

Le personnel impliqué dans le projet possède toutes les compétences nécessaires, d'un point de vue technique notamment, puisqu'il s'agit de praticiens hospitaliers habitués à réaliser les mêmes gestes chez des patients humains, qui sont formés à l'expérimentation animale ("Conception et réalisation des procédures expérimentales"), et qui seront assistés par une personne du Plateau Technique ayant suivi une formation à la chirurgie expérimentale chez le porc.

2514- L'épilepsie est une affection neurologique très répandue (1% de la population) caractérisée par des décharges spontanées neuronales synchrones et l'apparition récurrentes de crises. Dans la plupart des cas, l'épilepsie est contrôlée par un traitement chronique de médicaments antiépileptiques.

Malheureusement dans certains cas les médicaments n'ont pas d'effet. L'épilepsie focale du lobe temporal (nommée mTLE) est une des formes d'épilepsies parmi les plus réfractaires aux traitements anti-épileptiques actuels. En effet, cette forme d'épilepsie représente à elle-seule la moitié des patients épileptiques en échec thérapeutique. La qualité de vie de ces patients en est grandement affectée.

Les neurostimulations intracérébrales constituent une nouvelle approche thérapeutique efficace, désormais couramment utilisées dans de très nombreuses pathologies neurologiques. Des électrodes sont implantées dans le cerveau afin de prendre le contrôle des réseaux neuronaux.

Dans le cadre de l'épilepsie, notre laboratoire met au point un nouveau type de neurostimulations (locales, à basse fréquence et à basse intensité) à visée diagnostique. Elles sont destinées à tester les niveaux d'excitabilités du tissu neuronal.

En fonction des réponses neuronales aux stimulations électriques par pulses il peut être déterminé si le réseau neuronal est sain ou malade (hyperexcitable).

Le modèle expérimental in vivo de souris dite « kainate » constitue un modèle validé de mTLE, utilisé en routine depuis plusieurs décennies. Il consiste en l'injection d'un très faible volume d'acide kainique dans le cerveau d'un animal sain, rendant l'animal progressivement épileptique dans le mois qui suit. Nous souhaitons étudier l'évolution de l'excitabilité neuronale au cours de la mise en place de l'épilepsie, en utilisant notre protocole de neurostimulation diagnostique à très faible intensité chez des souris épileptiques traitées au kainate.

Le projet prend en compte la règle des 3R:

REPLACER: il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car il n'existe pas de modèle non-animal ou de modèle in vitro d'épileptogénèse (transformation d'un cerveau normal en un cerveau épileptique).

REDUIRE: Nous utiliserons 20 animaux pour le projet. Le nombre d'animaux est adapté au plus juste pour permettre des analyses statistiques fiables. Le nombre d'animaux inclus dans le projet a été minimisé pour permettre une approche statistique pertinente pour l'évaluation de nos hypothèses.

RAFFINER: nous utiliserons la méthode neurostimulation en suivit longitudinal (au cours du temps de chaque individu) qui est la meilleure pour mesurer l'évolution de l'excitabilité au cours de l'épileptogénèse. La santé et le bien-être de l'animal sera surveillé quotidiennement et tout sera fait pour éviter une éventuelle souffrance.

2515- La rentabilité économique et la survie des élevages de petits ruminants dépendent en partie du contrôle des infections parasitaires au pâturage. Ce contrôle ne peut plus faire appel exclusivement aux vermifuges chimiques compte tenu du développement de parasites résistants et de la présence de résidus dans les produits d'origine animale et l'environnement. Le lupin est utilisé en alimentation animale et humaine et renferme des composés susceptibles de cibler des récepteurs impliqués dans la transmission nerveuse chez les parasites. L'association du lupin à des plants de vigne a montré un effet protecteur contre un ravageur de la vigne apparenté aux parasites des moutons et des chèvres. Le lupin pourrait donc être utilisé comme « alicament » en élevage, c'est-à-dire un aliment aux propriétés pharmacologiques.

Dans le cadre de cette étude, nous testerons l'effet antiparasitaire du lupin en comparaison d'une ration classique sur des agneaux en croissance et des chèvres en lactation infestés expérimentalement, et évaluerons le bilan économique d'une telle approche.

Au total, 48 agneaux en croissance et 48 chèvres en lactation (répartis en 4 lots de 12 animaux dans les deux cas) seront intégrés dans l'étude. Ces effectifs ont été déterminés afin de conférer au dispositif la puissance statistique nécessaire à la mise en évidence des différences biologiques d'intérêt, conformément à la règle des 3R:

Réduction: les effectifs minimum pour démontrer l'effet antiparasitaire ont été déterminés ;

Raffinement: les animaux sont infestés à des doses non létales, classiquement observées dans les conditions naturelles; ils font également l'objet de soin et d'une observation quotidienne et bénéficient d'un enrichissement approprié.

Remplacement: l'étude vise à démontrer l'effet antiparasitaire dans des conditions d'utilisation du terrain; des effets ont été mis en évidence in vitro, mais sur des stades de vie du parasite qui ne sont pas des stades présents dans l'hôte. De plus, les tests in vitro ne rendent pas compte de la métabolisation de la graine de lupin par l'hôte.

2516- Des études récentes ont montré la présence de microARNs, petits ARN non codants qui régulent l'expression des gènes, dans les fluides corporels suggérant qu'ils peuvent avoir des fonctions de signalisation entre cellules. Ainsi la question du rôle des microARNs présents dans le lait se pose. Des travaux récents ont montré que les microARNs présents dans le lait bovin seraient détectés chez l'adulte qui a bu ce lait. Actuellement aucune étude n'a été réalisée sur la transmission des microARNs du lait vers la descendance. Cette question est importante pour la filière lait et les résultats pourront nécessiter par la suite une prise en compte de la composition en microARN des laits, aussi bien en santé humaine qu'en élevage. L'analyse de la répartition des microARNs dans les différentes structures moléculaires présentes dans le lait permettra de comprendre les mécanismes par lesquels les microARNs peuvent agir ou non sur la descendance. Ces données seront des éléments fondamentaux à prendre en compte si des modifications en microARNs ayant des effets sur la santé de la descendance veulent être envisagées à l'avenir. Le projet que nous souhaitons développer a pour objectif de voir si les microARN présents dans le lait sont transmis à la descendance et s'ils ont un effet sur celle-ci. Afin de répondre à ces différentes questions nous allons utiliser un modèle murin génétiquement modifié qui produit un lait très enrichi en un microARN, miR-30b. L'effet de ce lait modifié sera étudié sur des souriceaux ayant tété ce lait pendant 5, 10 et 15 jours, permettant d'appréhender le rôle en fonction de la mise en place de la barrière intestinale qui se fait pendant les premières semaines de vie des souriceaux. L'effet du microARN miR-30b sera recherché dans les différentes fractions du tissu intestinal, mais aussi dans le sang, le foie et le rein de la descendance. La répartition du microARN miR-30b dans les différentes structures moléculaires du lait sera analysée après collecte du lait chez les femelles aux différents stades de lactation. Ce projet nécessite l'utilisation de 15 souris mâles, 48 souris femelles et 90 souriceaux. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés les 15 mâles seront utilisés plusieurs fois pour l'accouplement des 48 femelles, de plus les femelles utilisées pour la collecte de lait seront accouplées une seconde fois pour produire les souriceaux nécessaires. Par ailleurs le nombre d'individus a été réduit au maximum tout en générant un nombre de données suffisantes permettant des analyses statistiques fiables. Les prélèvements se feront sur des animaux morts sauf pour la collecte de lait. Afin de prendre en compte le bien-être animal la collecte de lait sera effectuée sur des souris anesthésiées et analgésifiées.

2517- Le diabète est un trouble du métabolisme caractérisé par une hyperglycémie chronique (taux de glucose dans le sang trop élevé) lié à une déficience soit de la sécrétion de l'insuline, soit de l'action de l'insuline, soit des deux. Il existe différents types de diabète.

Le diabète de type 2 est la forme la plus fréquente du diabète (plus de 92 % des cas de diabète traité de l'adulte). Il est caractérisé par une résistance à l'insuline, ce qui signifie que cette hormone nécessaire à la consommation des sucres comme source d'énergie par les organes et tissus est inefficace, et aussi caractérisé par une carence de sécrétion d'insuline, l'une ou l'autre de ces deux caractéristiques peuvent être présentes. Cette forme de diabète survient essentiellement chez les adultes d'âge mûr mais peut également survenir à un âge plus jeune, voire même pendant l'adolescence.

Le diabète de type 1, beaucoup moins fréquent (environ 6 % des cas de diabète traité de l'adulte), est principalement causé par la destruction des cellules bêta du pancréas, d'où l'incapacité de la personne atteinte à sécréter de l'insuline. Pour cette raison, les injections d'insuline sont vitales chez ces personnes. Cette forme de diabète survient essentiellement chez les enfants et les jeunes adultes.

Cette destruction est elle-même causée par une réaction auto-immune, comme en témoigne la présence d'autoanticorps.

Chez les patients atteints de diabète de type 1, des cellules du système immunitaire, les lymphocytes T se mettent à reconnaître des molécules du soi présentes dans les cellules bêta du pancréas, comme s'il s'agissait de molécules d'agents infectieux à éliminer. Le système immunitaire réagit de manière anormale : on parle alors de maladie auto-immune.

Les symptômes apparaissent plusieurs mois voire plusieurs années après le début de ces événements, quand plus de 80 % des cellules du pancréas ont été détruites.

Bien que l'administration à vie d'insuline constitue aujourd'hui la seule thérapeutique établie du diabète de type 1, elle est un traitement de remplacement qui ne s'adresse pas à la cause de la maladie.

Si l'on veut traiter la cause de la maladie il faut intervenir sur le système immunitaire, et plus particulièrement sur les lymphocytes de l'individu atteint, afin de stopper la progression de la maladie c'est à dire freiner la destruction des cellules  $\beta$  du pancréas, on parle alors d'immunothérapie.

Depuis maintenant près de 20 ans différentes approches d'immunothérapie ont été tentées dans le diabète de type 1 avec, pour certaines, des résultats très prometteurs notamment grâce à l'administration d'anticorps.

Ce projet a pour ambition d'atteindre par voie pharmacologique la sous-population de lymphocytes T concernée et de moduler la production par ces cellules des molécules toxiques qui sont à l'origine de la destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques.

Le programme de développement de nouveaux médicaments destinés à traiter les maladies auto-immunes dont le diabète de type 1 fera appel à un modèle de souris qui développe la même forme de diabète, la souris NOD (non obèse diabétique)

La souris NOD est un modèle animal du T1D qui développe une insulite (invasion du pancréas par les cellules inflammatoires) dès 4-5 semaines d'âge ce qui produit une destruction sélective des cellules bêta et un diabète à partir de 12 semaines d'âge.

L'apparition du diabète, plus fréquente chez les femelles, environ 60 à 80 % contre 20 à 30 % chez les mâles, à 40 semaines d'âge est sensiblement conditionnée par les conditions environnementales et d'hébergement, ceci nous obligera à caractériser le modèle dans un premier temps pour ensuite adapter le design de nNous utiliserons ce modèle animal au cours de la période du développement de la maladie et de l'apparition des troubles liés au diabète (soif intense et par conséquence production importante d'urine).

A cet âge les animaux ne présentent aucun symptôme, vivent normalement. Ils auront cependant dans leur environnement des accessoires qui ont pour objet d'enrichir l'environnement et améliorer les conditions d'hébergement. (Maisonnettes et accessoires de nidification). La première étape de caractérisation du modèle servira à mieux connaître l'incidence de l'apparition du diabète dans ce modèle, de manière à Réduire le nombre d'animaux et de l'optimiser lors des expériences ultérieures. La gravité des expériences sera considérée légère mais il est prévu de Raffiner les conditions expérimentales et d'établir des points limites dans le cas où un animal montrerait des signes d'inconfort ou de souffrance liés ou non à l'expérience pour qu'il soit pris en charge de manière individuelle pour améliorer son bien être. Ces dispositions considérées dans leur ensemble contribuent au respect de la règle des 3 Rs qui trace la ligne directrice de nos activités de recherche qui font appel à des animaux vivants.

Les procédures expérimentales envisagées seront longues mais sans gravité, le nombre total d'animaux engagés sera de 630 souris.

2518- Dans le contexte général de développement de l'obésité dans nos sociétés, la compréhension de la régulation du poids et de la composition corporelle est essentielle. Il est maintenant bien établi que les régimes gras et/ou sucrés tendent à favoriser la prise de poids et de gras, notamment chez certains individus plus sensibles tandis que les régimes riches en protéines au contraire tendent à réduire l'adiposité en particulier par le biais d'une diminution de la prise alimentaire. Cependant, contrairement aux mécanismes induits par les glucides et les lipides qui sont maintenant assez précisément détaillés, on sait peu de choses sur les mécanismes par lesquels les acides aminés exercent un contrôle sur la prise alimentaire. On sait cependant qu'une partie de leur action passe par un effet spécifique au niveau du foie. Le but de ce projet est de démontrer sur le plan fonctionnel, in vivo, l'importance effective de certaines voies de signalisation en étudiant les effets sur le comportement alimentaire et la prise de poids induits par l'inactivation de ces voies métaboliques.

L'objet de cette demande concerne l'étude des interrelations entre les voies AMPK, GCN2 et mTOR. L'étude nécessitera l'utilisation de 48 souris pour le génotype AMPK KO foie spécifique et 48 souris pour les GCN2 foie spécifique. Nous étudierons sur des cultures primaires issues des différentes lignées de souris l'effet des variations de concentration en acides aminés et 16 souris supplémentaires par génotype seront nécessaires pour cette partie de l'étude. Ceci portera à 128 souris le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet. La nécessité de mesurer les conséquences de l'ingestion de régimes à teneur variables en protéines sur le comportement alimentaire et le gain d'adiposité empêche de remplacer l'expérimentation animale par des modèles cellulaires ou moléculaires.

Deux procédures expérimentales seront mises en œuvre: la première in vivo et la seconde in vitro. L'étude in vivo consiste à soumettre les animaux pendant 3 semaines à un régime normo protéique puis les souris seront séparées et nourries avec l'un trois régimes (HP, NP ou LP) contenant des niveaux faibles (LP), normaux (NP) ou élevé (HP) en protéines n'entraîneront a priori aucune douleur. Néanmoins, un suivi quotidien des animaux sera réalisé afin d'agir dès le moindre signe de souffrance. Les animaux vivront en cages individuelles, enrichies (nid et tunnel), pour le suivi de leur consommation alimentaire et de l'évolution de leur poids corporel.

La composition corporelle des souris sera mesurée par DEXA (Dual X ray Absorbtiometry). Cette technique consiste à maintenir les souris pendant 2 à 3 minutes sous un rayonnement X permettant de mesurer la masse maigre et la masse grasse de l'animal. Cette procédure nécessite une anesthésie légère afin que la souris reste immobile au cours de la mesure

Pour la seconde procédure expérimentale, des cultures primaires d'hépatocytes seront réalisées afin d'étudier l'impact des variations de concentration d'acides aminés dans le milieu de culture sur les voies de signalisation mTOR, AMPK et GCN2 et l'inter-relation entre ces voies. Cette étude permettra de définir le rôle de la voie de signalisation mTOR, AMPK et GCN2 comme potentiel levier d'action contre la prise de poids en vue d'établir des stratégies contre le surpoids et l'obésité, bénéfiques justifiant le recours au modèle animal. Même si certaines hypothèses peuvent être vérifiées des expérimentations in vitro, les

objectifs du projet ne peuvent donc être atteints sans recours à un animal modèle de l'Homme, en particulier pour des analyses sur des organes et tissus. Dans le cas particulier qui concerne cette étude, nous aurons recours à des modèles de délétions organe-spécifique de certains gènes (tels que GCN2) disponibles uniquement chez la souris.

2519- L'objectif de ce projet est de tester l'effet d'une carence en vitamine D chez la souris femelle sur le métabolisme de sa descendance. Nous étudierons l'impact de cette carence sur la descendance à différents niveaux tels que la masse corporelle, l'adiposité, l'expression génique du tissu adipeux et l'empreinte épigénétique du tissu adipeux.

Les souris femelles seront nourries pendant 6 semaines avec un régime déficient en vitamine D avant d'être accouplées avec des souris mâles. Ce projet nécessitera l'utilisation de 48 animaux, repartis en 3 groupes (femelles alimentation standard, femelles carencées et mâles alimentation standard). Les paramètres tels que l'évolution de la masse corporelle, de la prise alimentaire, l'adiposité, l'expression génique du tissu adipeux et l'empreinte épigénétique du tissu adipeux seront étudiés sur la descendance, soumise à une alimentation standard, à différentes étapes de la vie (juste après la naissance, à la fin de la période de sevrage et à 8 semaines). Des groupes de 10 animaux de chaque sexe sont nécessaires afin de pouvoir mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les différents paramètres étudiés. Au total, l'étude sur la descendance portera donc sur 60 animaux (6 groupes de 10 animaux: mâles après naissance, femelles après naissance, mâles post-sevrage, femelles post-sevrage, mâles adultes, femelles adultes). Les animaux seront hébergés en cage conventionnelle par groupe de 3 ou 4 individus et l'environnement sera enrichi par ajout d'igloos et de nid végétal.

2520- Nos travaux de recherche visent la mise au point de compléments alimentaires appropriés pour le maintien de la santé osseuse chez les populations souffrant de dénutrition protéique. Après avoir identifié des peptides ou nutriments capables de diminuer le risque de maladies osseuses (notamment l'ostéoporose), leur effet est testé in vivo.

Pour tester les effets des peptides ou nutriments qui nous intéressent, nous avons réalisé avec succès une première étude comparant ostéoporose induite par une restriction protéique à celle induite par une ovariectomie. L'ovariectomie induit une ostéoporose par stimulation des ostéoclastes alors que la restriction protéique induit une ostéoporose par inhibition des ostéoblastes.

Le modèle de restriction protéique a été développé au sein de notre propre laboratoire à partir de la comparaison entre des murins soumis à un régime incluant 6% de protéine de soja (6% de l'énergie totale) et des murins recevant 20% de protéine de soja ou 6% de caséine dans leur ration. Il a ainsi été observé que le régime restreint induit une perte de densité minérale osseuse, une réduction de la longueur des fémurs et une altération de la microarchitecture osseuse, corrélées à une diminution de la formation osseuse alors que ces effets ne sont pas visibles avec l'autre régime.

Nous avons choisi dans cette étude d'analyser les effets d'une supplémentation alimentaire en glutamate monosodique. Des études in vivo ont en effet montré que le glutamate pourrait favoriser la différenciation des ostéoblastes et réduire l'apoptose. Les mécanismes responsables de son effet protecteur sur l'os n'ont pas encore été identifiés. Cependant certaines études suggèrent qu'ils seraient en partie liés à des modulations des récepteurs et des transporteurs du glutamate. L'augmentation de la biodisponibilité du glutamate favoriserait la formation de « Gla » protéine essentielle à la synthèse osseuse. Les mécanismes mis en œuvre afin d'augmenter la biodisponibilité du glutamate pourraient jouer un rôle important plus particulièrement en situation de dénutrition protéique. Ces éléments nous permettent de faire l'hypothèse que, grâce à sa capacité de stimulation des ostéoblastes, le glutamate monosodique pourrait être utilisé comme complément alimentaire permettant de réduire la perte de densité osseuse liée à une restriction protéique. Pour tester notre hypothèse, nous proposons de faire consommer à des souris Balb/c des régimes à faible teneur en protéines (6% de protéine de soja) incluant des concentrations variables de glutamate monosodique.

Ces expériences seront menées dans le respect du bien-être animal. Le nombre d'animaux utilisés (84 souris) est le minimum exigé pour l'analyse statistique des paramètres mesurés et nous avons veillé à nous limiter aux seules expériences considérées comme indispensables. Les conditions d'hébergement seront améliorées par enrichissement du milieu (maisonnettes) et les procédures stressantes pour les animaux seront limitées au maximum. Les animaux utilisés seront des souris Balb/c spécialement élevés pour l'expérimentation animale. Au cours de l'expérimentation (90 jours) nous évaluerons la densité minérale osseuse et un prélèvement de sang sera effectué à mi-parcours afin d'évaluer les marqueurs du métabolisme osseux. Ces mesures physiques seront réalisées sous anesthésie à l'isoflurane. A la fin de l'expérimentation les animaux seront euthanasiés afin d'analyser les répercussions des régimes sur la qualité des os.

2521- L'objectif de ce projet est de tester l'effet de compléments alimentaires sur la survenue de la stéatose hépatique dans un modèle de souris déficientes pour le gène de la leptine, qui développent spontanément une stéatose hépatique. Nous étudierons l'impact de ces compléments sur le poids du foie et la teneur en lipides du foie, ainsi que l'expression de gènes impliqués dans la stéatose.

Les animaux seront nourris pendant 6 semaines avec un régime contenant des compléments alimentaires. Ce projet nécessite l'utilisation de 50 animaux, repartis en 5 groupes. Des groupes de 10 animaux sont nécessaires afin de pouvoir mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les différents paramètres étudiés. Les animaux seront hébergés en cage conventionnelle par groupe de 3 ou 4 individus et l'environnement sera enrichi par ajout d'igloos et de nid végétal. Un suivi de croissance sera réalisé par pesée toutes les semaines et par quantification de la consommation alimentaire. Des prélèvements sanguins seront réalisés pour mesurer la glycémie et l'insulinémie toutes les 3 semaines.

A l'issue des 6 semaines de régime, les animaux seront euthanasiés afin de prélever les tissus d'intérêt.

2522- La leucémie aiguë lymphoblastique de la lignée B, un cancer du sang, est très fréquente chez l'enfant. Une grande proportion de ces enfants porte une anomalie génétique qui génère une protéine de fusion anormale appelée ETV6/RUNX1. Le pronostic de ce cancer est généralement bon, mais les traitements actuels conduisent à des risques de cancers secondaires avec un taux de 10% à 15 ans. Nos efforts se portent sur la compréhension de l'apparition et de la progression de ces leucémies.

Pour cela, nous injectons dans des souris des cellules leucémiques que nous modifions génétiquement pour étudier le rôle de certaines molécules sur la progression de la leucémie. Nous n'avons pas d'autre alternative pour étudier la progression de la leucémie. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux, l'ensemble du projet utilisera 270 souris, nombre minimal requis pour avoir des groupes significatifs (test de Mann-Whitney).

Dix souris par groupe seront utilisées pour ces expériences. Nous estimons le nombre d'animaux requis à 270 souris sur 5 ans. Lors de ces procédures, nous respecterons la règle des 3R. Remplacer : nous n'avons pas d'autre alternative pour étudier la progression de la leucémie que d'utiliser un modèle vertébré qui ne rejette pas les greffes de cellules-le modèle souris que nous utilisons répond bien à ce besoin. Réduire : dans un souci de réduction du nombre d'animaux, l'ensemble du projet utilisera 270 souris sur 5 ans, soit 10 souris par groupe, nombre minimal requis d'après nos études préliminaires, pour avoir des groupes significatifs (test de Mann-Whitney). Raffiner : nos études préliminaires nous ont permis d'ajuster les procédures pour définir au mieux les points limites et minimiser ainsi la souffrance animale. L'atteinte de ces points limites conduit à l'euthanasie de la souris.

2523- Ce projet a pour but d'évaluer les effets d'une exposition précoce à la génistéine, un perturbateur endocrinien qui est présent dans certains aliments comme le soja.

A ce titre, le fait que dans certains pays, les nourrissons et les enfants soient nourris avec du lait de soja pose un certain nombre de questions quant à l'effet possible de cette molécule sur la mise en place des circuits cérébraux contrôlant la prise alimentaire, la fonction de reproduction et aux éventuelles conséquences comportementales.

Dans ce cadre, nous traiterons des nouveau-nés de la naissance (P0) à 8 jours d'âge (P8) avec de la génistéine ou une solution témoin.

Afin de mesurer le développement des systèmes neuroendocriniens et l'effet de la génistéine au cours de ce développement, nous utiliserons les jeunes à 4 âges: 12, 22, 30 jours et à l'âge adulte à 60 jours. Nous mesurerons dans les deux sexes, l'expression d'un certain nombre de molécules impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Kisspeptin, NPY...), ainsi que l'effet sur les taux circulants de testostérone et les tractus reproducteurs. Nous mesurerons également l'effet sur un certain nombre de comportements cognitifs (anxiété) ou sociaux (préférence sexuelle) chez les animaux adultes (30 et 60 jours).

Cette expérience utilisera en tout 211 animaux expérimentaux (correspondants à 2 sexes, 4 âges et 3 types d'analyses: moléculaires, immunocytochimiques et comportementales +35 animaux parents reproducteurs).

Concernant la règle des 3R, le remplacement de l'expérimentation animale par d'autres méthodes n'est pas possible: en effet, aucune autre procédure ne permet de reproduire la complexité des interactions et des effets ayant lieu au sein d'un organisme vivant suite à l'exposition à des molécules de type perturbateur endocrinien. Ainsi, il est nécessaire de passer par l'expérimentation animale pour répondre à notre question. Concernant le raffinement, les animaux seront hébergés en groupe et l'environnement sera enrichi (structure cartonnée, enrichissement olfactif et acoustique...). L'ensemble des procédures d'euthanasie sera conduite après anesthésie des animaux. Le nombre de tests comportementaux sera limité à 3 afin de limiter le stress des animaux. Enfin, concernant la réduction, les effectifs ont été calculés afin d'obtenir des résultats significatifs en utilisant un nombre le plus réduit possible d'animaux (utilisation de tests de puissance). De plus, tous les animaux de même sexe et de même portée seront affectés à des groupes différents (contrôle et génistéine) afin d'exclure un effet portée.

2524- Ce projet vise à soutenir le développement d'un candidat vaccin thérapeutique destiné à soigner les femmes infectées par le virus HPV (Human Papilloma Virus) pour ainsi prévenir l'apparition de lésions cancéreuses au niveau du col de l'utérus et des autres pathologies associées aux infections persistantes à Papillomavirus de type HPV16 E7 et HPV18 E7. Actuellement en cours d'essai clinique chez la femme (Phase II), ce projet comporte plusieurs objectifs :

-Poursuivre le développement préclinique du candidat vaccin pour accroître les données de pharmacologie chez l'animal ainsi que les connaissances se rapportant aux mécanismes immunitaires et à la réponse thérapeutique induite suite à la vaccination.

-Réalisation des tests de contrôle et de spécification réglementaires nécessaires à la libération et à l'obtention de données de stabilité sur les lots utilisés en essai clinique chez la femme.

Pour répondre à l'ensemble de ces problématiques, le modèle choisit est la souris femelle de souche C57Bl/6. En effet, ce modèle est le plus communément utilisé pour l'évaluation des molécules immunothérapeutiques et immuno-prophylactiques. Sa réponse immunitaire est donc bien caractérisée et les outils disponibles sont nombreux et validés par de nombreuses équipes scientifiques.

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

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

-Chaque étude est discutée avec l'ensemble 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 indispensable 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 ex vivo effectués à partir des prélèvements réalisés sur les animaux (cellules immunitaires).

-Actuellement 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 ou de limiter le nombre de produits qui seront évalués chez l'animal.

A titre d'exemple, le nombre de souris utilisés pour ce projet au cours de l'année 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 d'une part, des éléments scientifiques à apporter au dossier préclinique qui supporte l'essai clinique et d'autre part, à la libération des lots de vaccin et au nombre de point d'étude de stabilité à réaliser.

2525- Le tube digestif héberge une communauté microbienne complexe, le microbiote intestinal, dont les capacités métaboliques sont plus riches et diversifiées que celles codées par le génome de l'hôte. L'implication du microbiote intestinal dans divers aspects de la physiologie de l'hôte, comme le métabolisme nutritionnel et l'immunité, est depuis longtemps étudiée. Cependant, ce n'est que dans la dernière décennie qu'a émergé le concept selon lequel le microbiote intestinal participe au dialogue intestin-cerveau en conditions physiologiques. Les comparaisons entre animaux axéniques (AX, dépourvu de microbiote intestinal) et conventionnels (CV, possédant donc un microbiote intestinal complexe) en ont apporté les preuves les plus spectaculaires, révélant que l'absence de microbiote intestinal augmente la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et altère la maturation des cellules de la microglie, qui sont responsables des défenses immunitaires du cerveau. L'influence du microbiote s'exerce aussi sur les systèmes de neurotransmission. Chez le rongeur, les concentrations cérébrales de certains neurotransmetteurs (ex: sérotonine, dopamine, noradrénaline) et de leurs métabolites diffèrent chez les individus AX et CV. Plus généralement, des analyses d'expression de gènes dans le cerveau de la souris ont démontré de grandes différences entre individus AX et CV. L'ensemble de ces données suggère que le microbiote intestinal contribue à réguler la neurotransmission cérébrale.

Dans ce projet, nous allons comparer le renouvellement cellulaire cérébral, ou neurogenèse dans l'hippocampe de souris mâles AX ou CV avec pour objectif d'améliorer la compréhension des mécanismes qui le régulent. Ce renouvellement est rendu possible par la présence de cellules souches dans certaines structures du cerveau : ces cellules sont des cellules indifférenciées ayant conservé la possibilité de se diviser et de se différencier dans les différents types cellulaires constituant l'organe, par exemple les neurones et les cellules gliales (cellules présentes dans l'environnement des neurones, et qui ne possèdent pas de caractéristiques neuronales). Dans l'hippocampe, la neurogenèse a pour fonction de déterminer la mémorisation, l'apprentissage, l'anxiété et l'humeur. Pour étudier le renouvellement cellulaire, nous comparerons la prolifération cellulaire après injection d'un marqueur, le BrdU, chez des souris AX et CV.

A l'issue des expérimentations, les animaux seront euthanasiés, et le cerveau sera prélevé pour réaliser des coupes où seront dénombrées les cellules en prolifération marquées par l'incorporation de BrdU.

Le projet, portant sur la relation entre l'hôte et ses bactéries, met en jeu des interactions complexes, il est donc impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Nous devons utiliser des rongeurs sans-germes (AX).

Le nombre total d'animaux (72) utilisés est le minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables sur le plan statistique.

Douze couples de souris (12 femelles et 12 mâles) seront accouplés pour engendrer les 48 souris mâles nécessaires à l'expérimentation. Ces dernières seront réparties en 4 groupes de 12 souris (2 groupes AX et 2 groupes CV). Un groupe AX et un groupe CV seront soumis pendant 5 semaines à une procédure de stress chronique modéré (SCM), destinée à reproduire des stress comparables à ceux qui, dans la vie quotidienne de l'Homme, peuvent conduire à un état dépressif. En effet, la neurogenèse de l'hippocampe est réduite lors de dépression et est stimulée et restaurée par les antidépresseurs. Cette procédure entraînera chez les souris un stress modéré qui se traduira, par un comportement de type dépressif (état du pelage négligé) et par une perte de poids. Aucun stress n'est attendu chez les 2 groupes témoins AX et CV n'ayant pas suivi la procédure de SCM. L'état de santé et de bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement. La comparaison AX-CV nous permettra de déterminer si la présence de bactéries peut modifier cette fonction cérébrale, ce qui pourrait alors permettre d'envisager des thérapies innovantes dans le domaine des neuropathologies.

2526- Ce projet vise à comprendre le rôle que joue une molécule appelée Dicer dans la biologie de cellules sanguines appelées Natural Killer (NK). Ces dernières sont des cellules du système immunitaire impliquées dans la défense contre les virus et d'autres microbes ainsi que dans la lutte anti-tumorale. Nous avons précédemment montré qu'en l'absence de Dicer, le développement et la fonction des cellules NK était profondément altérés. Nous voudrions maintenant déterminer le rôle de la molécule Dicer dans le contrôle de l'activité cytotoxique des cellules NK. Pour cela, nous allons analyser la fonction cytotoxique des cellules NK dans des souris mutantes présentant une délétion pour le gène codant Dicer et nous les comparerons à des souris contrôle. Ce travail permettra de mieux comprendre la fonction globale des cellules NK lors des réponses immunitaires, ce qui pourrait à terme conduire à de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur la manipulation de leur activité chez des patients immunodéficients ou au contraire souffrant d'immunopathologie. Ce type de projet ne peut

être mené sans utiliser d'animaux car le système immunitaire est un organe extrêmement complexe avec une multitude de cellules constamment en mouvement et organisées en un réseau tridimensionnel impossible à reproduire dans une éprouvette. Le nombre de souris nécessaire (54) au projet a été calculé au plus juste afin d'apporter des réponses fiables tout en évitant des mises à mort inutiles. Le projet impliquera une procédure visant à analyser la fonction cytotoxique des cellules NK in vivo. Par ailleurs, la douleur et l'angoisse causées aux animaux sera évaluée et réduite à chaque fois que cela sera possible. Au delà d'un point limite, déterminé à l'aide d'une grille d'évaluation, les souris seront mises à mort. Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer). Le nombre de souris a été calculé afin que les résultats aient une valeur statistique malgré les variations entre les animaux.

2527- Les étudiants vétérinaires doivent au cours de leur formation acquérir des notions d'abord et de bien être vis à vis de différentes espèces animales dont les poissons. Lors de cette formation, les étudiants travailleront sur l'espèce la plus produite en France, la truite arc en ciel (*Onchorynchus mykiss*). Différentes manipulations sur l'animal sont abordées et ceci dans un contexte de respect et de bien être animal : l'anesthésie, la prise de sang et l'euthanasie par surdosage d'anesthésique. Chaque étudiant travaille sur un individu (soit 160 poissons par an soit 800 poissons pour la durée totale du projet).

2528- Les naissances issues de l'assistance médicale à la procréation représentent une part non négligeable des naissances totales (2.6% en France, en 2009). Les techniques employées nécessitent une phase de culture in vitro des embryons avant réimplantation.

Chez l'Homme, de nombreuses études ont cherché à analyser l'impact de cette culture in vitro sur la santé à venir des enfants, mais les résultats restent difficiles à interpréter et soumis à controverse. De nombreux paramètres, indépendants de la culture in vitro, peuvent influencer sur les résultats. L'utilisation de modèles animaux, permet de s'affranchir de certains de ces paramètres, et rend possible l'étude et l'analyse des résultats à court, moyen et plus long terme.

Le choix du lapin comme modèle de l'embryon humain dans cette étude repose sur la constatation que l'embryon de lapin partage avec l'embryon humain des propriétés de métabolisme précoce qui autorisent l'utilisation de milieux de culture communs. Sa proximité avec l'homme concernant la cinétique de développement embryonnaire, le timing d'activation du génome embryonnaire, le mode de placentation, la possibilité de suivi échographique du développement fœtal, en font un atout pour la transposition des résultats à l'Homme.

Dans cette étude nous nous intéresserons aux perturbations épigénétiques induites par la culture in vitro de l'embryon préimplantatoire de lapin pouvant être responsables de défauts de développement fœtal ou de phénotypes tardifs (apparition de syndrome métabolique). Nous nous intéresserons également plus finement à l'effet de la culture sur l'évolution d'une nouvelle marque épigénétique: l'hydroxyméthylation.

En effet, la mise en place des marques épigénétiques peut être affectée par l'environnement. Or ces marques jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes, laquelle est cruciale pour les étapes de différenciation cellulaires nécessaires à un développement embryonnaire, foetal et post-natal correct.

Ce projet portant sur le développement foetal et post natal, il nous est impossible de remplacer l'animal par un modèle cellulaire ou in silico. Le nombre d'animaux impliqués dans chaque expérimentation a été réduit au maximum grâce aux techniques de superovulation maîtrisées chez cette espèce. Les protocoles d'analgésie et d'anesthésie pour la chirurgie réimplantatoire visent à réduire l'inconfort et le stress. Un suivi chirurgical et post-chirurgical permettra de mettre en place les traitements analgésiques, anti-inflammatoires et antibiotiques nécessaires. Les conditions d'hébergements seront enrichies par l'apport de foin (les animaux receveurs) et de balles en plastique, les cages sont équipées de mezzanine pour optimiser l'espace de vie.

Le nombre de lapin impliqués dans ce projet a été calculé de façon à en réduire au maximum le nombre tout en restant compatible avec l'utilisation des tests statistiques non paramétriques permettant l'interprétation des résultats. Il sera de 154 adultes et 108 fœtus, soit un total de 262 au maximum.

2529- La maladie veineuse chronique concerne 50 % de la population des pays européens et anglo-saxons et représente 2 à 3 % des budgets nationaux de la santé. L'obstruction veineuse profonde est le mécanisme le plus fréquemment impliqué. Les symptômes les plus graves sont représentés par la claudication veineuse, un œdème important, des troubles trophiques et des ulcères cutanés.

Ce projet a pour objectif de développer un dispositif médical destiné au traitement de pathologies veineuses obstructives. Il permettra de « rétablir une lumière » dans une veine obstruée par thrombose. L'étude doit également évaluer le risque de migration du dispositif (stents). Ceci est rendu possible par ses caractéristiques mécaniques, en particulier par la connexion du stent « branche », et par la jonction de la connexion comme point d'ancrage avec le stent « mère ».

Le protocole est effectué sur l'animal. L'espèce utilisée sera le cochon. L'expérimentation se déroulera en deux phases. La première évaluera les interconnexions sur des veines saines. D'un point de vue technique, le stent « mère » est positionné au ras de la terminaison de la veine cave afin d'éviter le déplacement du stent « branche » spontanément dans la veine cave (effet bouchon de champagne). Après validation, la seconde procédure évaluera la mise en place et l'implantation à court terme du procédé sur des veines thrombosées.

5 animaux seront utilisés. Pour la première phase, le sacrifice sera effectué le même jour sans réveil. Dans la seconde phase, il interviendra à 15 jours.

Ce projet remplit les conditions des 3R :

-Remplacement : Il n'y a pas de méthodes de remplacement. Il n'existe pas de système virtuel reproduisant la rhéologie des vaisseaux sanguins avec les contraintes des parois vasculaires. Les simulations virtuelles ont été effectuées. Le recours à l'animal est nécessaire. Le Porc est un modèle de choix, car son anatomie veineuse est similaire à celle de l'Homme.

-Réduction : l'étude se focalisera sur les veines. Les tests de validation porteront sur un petit nombre de modèles. Il n'y a pas de données dans la littérature permettant un calcul de l'échantillon a priori, les variabilités attendues étant inconnues. L'utilisation de 5 animaux devrait être suffisante pour obtenir des résultats satisfaisants.

- Raffinement : Les animaux seront sacrifiés sans réveil par injection d'une dose létale de chlorure de potassium sous anesthésie générale. Pour le groupe avec réveil, 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. Ils seront ensuite anesthésiés avant sacrifice à 15 jours.

2530- Les virus géants associés aux amibes constituent une thématique de recherche en plein essor depuis la découverte d'*Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus, son premier membre en 2003 dans notre laboratoire. Des arguments à la fois sérologiques, moléculaires et culturels ont permis d'établir un lien entre Mimivirus et la survenue de pneumonie chez l'Homme. En 2009, Marseillevirus devient le membre fondateur d'une nouvelle famille de virus géants associés aux amibes qui va se développer avec la découverte de 6 autres membres entre 2009 et 2014. En 2013, un membre de la famille des *Marseilleviridae* est mis en évidence dans le sang de donneurs de sang. On découvre également que les sujets ayant reçu de nombreuses transfusions sanguines sont plus nombreux à porter des anticorps dirigés contre Marseillevirus que les sujets non transfusés. Ces données posent inévitablement la question de la transmission Marseillevirus par voie sanguine et donc de la sécurité des produits sanguins.

Depuis des recherches plus systématiques sur échantillons de patients, on a pu prouver la présence de Marseillevirus ou des traces de son passage dans le sang et les ganglions, en particulier d'un bébé de 11 mois atteint d'une inflammation ganglionnaire ou adénite.

Grâce à la mise au point et au développement d'outils de détection des virus géants au sein de notre laboratoire, et en particulier pour Marseillevirus nous avons pu confirmer sur d'autres prélèvements cliniques soient 3 ganglions et 23 écouvillons pharyngés la présence de ce virus dans le système lymphoïde humain.

La question de la pathogénicité de Marseillevirus chez l'Homme et de façon plus générale chez les mammifères, reste posée : sa présence dans un tissu inflammatoire est-elle fortuite ou est-elle la cause de la réponse inflammatoire?

Par ailleurs par analogie avec d'autres virus comme l'Epstein Barr Virus, la présence dans le sang et dans des ganglions humains de Marseillevirus pose la question d'un lien éventuel entre l'infection par Marseillevirus et le développement de lymphomes.

Afin d'apporter des éléments de réponse à ces questions, ce projet vise à mettre au point un modèle murin d'infection expérimentale par Marseillevirus.

Le projet consiste à inoculer une suspension de Marseillevirus à des souris selon 3 voies différentes de pénétration dans l'organisme : aérosolisation, voies intra-nasale et intrapéritonéale. Seule l'inoculation par voie intra-nasale est supposée créer un inconfort de l'animal et sera réalisée sous anesthésie générale afin de réduire au maximum l'angoisse et la douleur. Le nombre d'animaux sera réduit grâce à un objectif de tout ou rien sur le résultat principal attendu, à la diminution du nombre d'animaux nécessaires à 4 pour chaque période d'évaluation, l'absence de répétition des contrôles, la réduction à 4 le nombre de périodes d'évaluation. Aucune procédure supplémentaire ne sera mise en œuvre dans l'intervalle qui sépare l'inoculation de l'euthanasie. Tous les animaux seront euthanasiés en fin d'expérimentation correspondant à 4 temps déterminés d'évaluation. Après euthanasie, des prélèvements d'organes seront effectués en post-mortem immédiat et Marseillevirus sera recherché après conditionnement des tissus ou liquides biologiques en particulier au sein des organes lymphoïdes, les poumons et le sang.

L'ensemble de ces expérimentations sera réalisé en parallèle sur un groupe de souris sauvages et un groupe de souris susceptibles de développer des lymphomes (Souris TL), afin d'établir un éventuel lien entre l'infection par Marseillevirus et le développement de lymphomes.

Le nombre maximal d'animaux utilisé dans cette étude sera de 132.

2531- La fragmentation des habitats naturels est une des causes principales de perte de biodiversité. Elle est notamment provoquée par l'expansion continue de l'urbanisation : accroissement des surfaces urbanisées et des infrastructures de voirie au détriment des habitats naturels. En isolant les individus les uns des autres, les aménagements urbains affectent le bon déroulement de la reproduction et le maintien de flux génétiques, indispensables à la survie des populations animales. Chez le Hamster d'Europe (*Cricetus cricetus*) en particulier, un déclin des populations est observé depuis les années 1970 en Europe de l'Ouest et s'étend aujourd'hui à toute son aire de répartition jusqu'en Ukraine. Les mesures de protection mises en place en Europe de l'Ouest n'ont pas suffi à enrayer ce déclin. Parmi les motifs impliqués dans ce déclin, l'urbanisation grandissante est une cause majeure, diminuant l'habitat favorable disponible à l'espèce et déconnectant les populations et les individus les uns des autres.

Puisqu'il est impossible de lutter contre le phénomène d'urbanisation qui répond à des besoins humains, il est primordial de penser les aménagements en faveur de la biodiversité et de réfléchir à la possibilité d'utiliser des zones urbanisées pour la conservation de certaines espèces. De cette façon, ces zones urbanisées pourront faire partie intégrante de tracés de corridors écologiques et permettre la reconnexion entre populations animales isolées. Dans certains pays d'Europe, des populations de

Hamster d'Europe ont occupé ou occupent des milieux urbains (Autriche, Ukraine, Pologne, Slovénie, République tchèque, Russie, Allemagne). Avant de considérer la possibilité d'utiliser les espaces péri-urbains pour la conservation du Hamster d'Europe dans notre région, nous souhaitons tester l'impact de la pollution lumineuse nocturne sur la biologie des hamsters, et plus spécifiquement sur le comportement des animaux lors de la recherche alimentaire en vérifiant si les animaux évitent ces zones trop éclairées même si elles présentent un avantage d'un point de vue alimentaire. Les résultats de cette étude pourront sans doute constituer un argument supplémentaire au plaidoyer incitant les communes à réduire leur éclairage artificiel nocturne en vue de protéger la faune.

Dans le règne animal, il existe une différence de comportement entre les individus. Si cette différence est constante dans le temps et suivant les contextes, elle est appelée tempérament ou encore personnalité. Elle se réfère à la configuration particulière des comportements qu'un individu exprime et est donc spécifique à l'individu. La différence de tempérament a déjà été étudiée chez de nombreuses espèces comme les écureuils, les souris, les cailles ou encore les hamsters dorés. Le tempérament a un intérêt écologique et évolutif car il apparaît comme étant héritable et il peut influencer la manière dont les individus interagissent avec leur environnement et par conséquent la fitness des individus des populations sauvages. La fitness représente la faculté d'un individu à transmettre ses gènes à la génération suivante.

Dans un contexte de recherche alimentaire dans des zones plus ou moins éclairées, le tempérament plus ou moins audacieux des individus pourrait constituer un facteur confondant lors de nos expériences. C'est pourquoi nous déterminerons le tempérament de tous les individus testés afin de prendre en compte le facteur tempérament dans nos analyses. Cette étude étant spécifique au Hamster d'Europe, il n'a pas été possible de la remplacer comme préconisé par la règle des 3 R. Toutefois, l'effectif des individus testés par groupe a été réduit autant que possible. Notre étude implique trois groupes :

- Le premier est constitué de 12 hamsters adultes (6 mâles et 6 femelles) issus de nos élevages qui n'ont jamais été exposés à une pollution lumineuse.
- Le second est constitué de 12 hamsters (6 mâles et 6 femelles) ayant séjourné dans l'enclos de la VRPV (Voie Rapide du Piémont des Vosges)
- Le troisième est constitué de 12 hamsters (6 mâles et 6 femelles) qui auront été maintenus dans nos élevages dans des conditions particulières (exposition à une pollution lumineuse de nuit).

Ceci conduit à un total de 36 individus adultes (dont 18 mâles et 18 femelles) pour 3 groupes.

A noter que des alternatives de raffinement seront mises en place (enrichissement de la cage avec des matériaux de nidification, des tubes, réduction des manipulations pour limiter le stress...) afin d'améliorer le bien-être des animaux utilisés dans le cadre de cette expérimentation.

2532- Depuis quelques années, il a été largement démontré que la gestation représente une fenêtre critique de programmation potentielle du fœtus par l'environnement. En plus des facteurs bien connus de stress, de consommation d'alcool ou de drogue, la nutrition de la mère est aussi un facteur déterminant pour l'enfant. On sait qu'un régime hypo-protéique prédispose le nourrisson à différentes maladies métaboliques ou cardiovasculaires telles que l'hypertension mais l'effet d'un apport supérieur aux besoins en protéines (régime hyperprotéique, HP) pendant la gestation n'est pas encore bien défini.

Depuis 4 ans, nous étudions chez le rat, les effets d'un régime HP (55% de protéine totale de lait) pendant les périodes de gestation, d'allaitement et après le sevrage, sur le phénotype de la descendance. Nos résultats montrent que les ratons issus de mères recevant un régime hyperprotéique pendant la gestation et nourris avec un régime de type occidental (riche en lipides et en glucides) ont une prise alimentaire et une prise de poids supérieures après le sevrage surtout chez les femelles et que différentes composantes de la prise alimentaires telles que le plaisir, la motivation, la satiété et le rassasiement pourraient également être perturbées. Le métabolisme glucidique (sensibilité au glucose) de ces ratons est également perturbé, laissant supposer qu'ils ne sont pas capables de gérer un régime riche en glucides et développent donc un risque de diabète. De plus, l'implantation du microbiote (bactéries intestinales) chez la progéniture pourrait elle aussi être programmée par l'environnement et notamment par le régime alimentaire suivi pendant la gestation.

Ce projet vise donc à approfondir et comprendre les effets d'un apport en protéines supérieur aux besoins et de qualité variable pendant la période de gestation sur le comportement alimentaire, le métabolisme et la santé des petits jusqu'à l'âge adulte. L'objectif, à plus long terme, est d'élaborer ou d'adapter des recommandations nutritionnelles pour la période de grossesse afin de préserver la santé des générations à venir.

Afin d'étudier l'ensemble de ces paramètres, 4 expérimentations sont nécessaires réparties sur 5 années. Chaque expérimentation répondra à une hypothèse :

- Le régime HP durant la gestation programme les préférences alimentaires des petits lorsqu'ils peuvent eux-mêmes sélectionner leurs apports en macronutriments.
- Le régime HP durant la gestation programme la motivation des petits à recevoir une récompense.
- La source de protéine contenue dans le régime de gestation influence la préférence des petits à recevoir cette source et perturbe le microbiote.
- La qualité et la quantité de protéines contenues dans le régime de gestation programment le métabolisme lipidique et glucidique des petits et perturbent le microbiote.

La progéniture (8 par groupe) femelle sera suivie jusqu'à l'âge de 10 ou 15 semaines (début de l'âge adulte ou âge adulte avancé). Pendant cette période de suivi et d'étude, le stress potentiel représenté par l'hébergement en cage individuelle sera atténué par un enrichissement par des tunnels en carton et des parois transparentes pour que les animaux voient leurs congénères. Ces expériences seront menées dans le respect du bien-être animal. Ce projet de 4 expérimentations concernera

sur les 5 années, 526 animaux, dont environ 208 petits mâles et 110 animaux reproducteurs. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum exigé pour l'analyse statistique des paramètres mesurés et nous avons veillé à nous limiter aux seules expériences considérées comme indispensables.

2533- Le but de ce projet vise à comprendre les mécanismes de la formation osseuse. Le projet est dédié à l'étude de la cellule responsable de la formation de l'os. Cette cellule est l'Ostéoblaste. Grâce à des modèles de souris, le projet va permettre d'étudier l'effet de l'inhibition spécifique dans la cellule ostéoblaste de l'expression de l'Autotaxine d'une part et du récepteur de type 1 de l'acide lysophosphatidique (LPA1) d'autre part que ce soit au niveau de la structure osseuse à l'état normal ainsi qu'en situation expérimentales analogues à deux pathologies humaines que sont l'ostéoporose et la polyarthrite rhumatoïde. Le projet consiste tout d'abord à générer 2 nouvelles lignées de souris génétiquement modifiées afin de stopper la production d'ATX d'une part et de LPA1 d'autre part spécifiquement dans les ostéoblastes. La qualité du tissu osseux de ces animaux sera tout d'abord évaluée par microtomographie en absence de toute autre manipulation. Puis la qualité du tissu osseux de ces animaux sera évaluée dans deux conditions pathologiques grâce à la mise en place de deux modèles expérimentaux viables pour l'étude de la perte osseuse qui présentent toutes les caractéristiques pour le premier de l'ostéoporose et pour le deuxième de l'arthrite rhumatoïde. Réduire : Le nombre d'animaux sera limité aux seules expériences indispensables. Le nombre d'animaux est estimé à 360 sur une période de 5 ans permettant l'obtention de résultats statistiquement exploitables sans avoir recours à une répétition des protocoles. Remplacer : L'emploi des modèles animaux est nécessaire au projet car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives permettant de reproduire in vitro la complexité physiologique des échanges entre les nombreux types cellulaires responsables de la formation du tissu osseux. Raffiner : Les expériences seront menées sur la base des meilleures connaissances actuelles de l'os humain et de souris à partir des protocoles les plus pertinents réalisés chez la souris. Ces protocoles seront réalisés en tenant compte de la sensibilité des animaux à l'environnement (enrichissement du milieu, soins, suivi du bien être) et à la douleur (traitements antalgiques pré- et post-opératoires, imagerie non-invasive sous anesthésie volatile). Les souris seront mises à mort à la fin des protocoles selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever les échantillons tissulaires permettant une exploitation maximale par des analyses histologiques des données issues de l'expérimentation

2534- Les cancers digestifs sont responsables chaque année de 40 000 décès, soit 30% des décès par cancer selon la Société Nationale Française de Gastro-Entérologie (SNFGE). Ces cancers peuvent concerner l'ensemble de l'appareil digestif : l'œsophage, l'estomac, le foie, les voies biliaires, le pancréas, le rectum et le côlon ; ce dernier étant le plus fréquent en France. Ils sont à l'origine de peu de symptômes donc pris en charge tardivement, ce qui diminue les chances de guérison.

Les cancers de l'ovaire font quant à eux plus de 3500 victimes chaque année. Ils correspondent à la première cause de décès par cancer gynécologique après le cancer du sein. Ils sont également diagnostiqués tardivement.

La chirurgie est le traitement principal du cancer. La chirurgie seule est le plus souvent limitée à un cancer de stade précoce. De ce fait, la chimiothérapie est alors utilisée en complément. Il faut savoir que la chimiothérapie est responsable de nombreux effets secondaires (nausées, vomissements, diarrhées, diminution des cellules du sang et de la moelle osseuse, mucite, stomatite, chutes des cheveux, troubles cutanés, fatigue, ...).

Le but de notre projet est d'évaluer l'effet cytotoxique d'implants de biopolymères de collagène traités avec une chimiothérapie (sels de platine : carboplatine ou cis-platine) avec ou sans Polycaprolactone (PCL)-Poly ethelene glycol (PEG). Ce sont des polymères résorbables qui permettront une diffusion locale de la chimiothérapie, et donc une diminution potentielle des effets secondaires.

Pour ce projet, nous utiliserons 311 souris (112 balb/c et 199 nudes) femelles de 6 semaines. Il y a un risque de mortalité dû au traitement ou à la maladie ; De ce fait, nous pensons que 12 animaux par groupe est le minimum nécessaire à des résultats significativement différents et donc pouvant permettre l'évaluation du traitement.

Une étude in vitro est en cours afin de déterminer la concentration optimale de chimiothérapie ; Mais ce projet ne peut pas être réalisé qu'in vitro car pour observer l'efficacité de ces implants résorbables, il faut tester ces derniers dans un système intégré.

Pour permettre une diffusion locale, nous devons dans un premier temps créer une tumeur. De ce fait, nous voudrions injecter des cellules cancéreuses dans la patte de la souris (système lymphatique) et ainsi créer une tumeur dans le ganglion lymphatique inguinal (au niveau de l'aîne). L'implant de collagène pourra être posé sur le ganglion inguinal.

En plus d'évaluer l'effet sur 3 lignées cancéreuses (ovarienne, colique et gastrique), ce projet aura également pour objectif d'évaluer l'effet de ces implants sur les ganglions : En effet, lors de curages lombo-aortiques dans les cancers gynécologiques, ce type de traitement pourrait venir à bout des microtumeurs au niveau des ganglions.

La première partie de l'étude correspond au suivi de la croissance tumorale par bioluminescence. En effet, les lignées utilisées expriment la luciférase, ce qui permettra un suivi régulier et diminuera le nombre d'animaux nécessaires à l'expérimentation. Ce suivi nous permettra de déterminer le temps optimal au bout duquel les implants seront insérés ainsi que la durée de l'expérience.

L'évaluation cytotoxique des implants sera effectuée dans un deuxième temps. Pour cela, il y aura 6 groupes de 12 souris où nous testerons les 3 différents implants après injection des cellules cancéreuses avec ou sans cellules souches mésenchymateuses (MSC). Ces dernières apporteront un environnement favorable à la croissance tumorale, ces cellules étant responsables de la chimiorésistance des cellules cancéreuses.

3 groupes de 5 souris « sham » nous permettront de nous assurer de l'effet des implants cytotoxiques sur la tumeur et non sur le bien-être des animaux.

A la fin de l'étude, les ganglions ainsi que les implants seront alors prélevés et analysés par le service d'anapathologie. Les points limites sont les suivants : perte de poids >20%, taille de la tumeur (1cm de diamètre), comportement anormal (yeux fermés, dos voûté, isolement), apparence physique anormale (automutilation, plaies), gêne pour se déplacer. Nous effectuerons une visite des animaux les deux jours suivants l'injection des cellules et l'insertion de l'implant cytotoxique. Ensuite, ces points seront surveillés 2 fois par semaine et consignés dans un cahier de suivi par l'expérimentateur pour permettre de limiter au minimum la douleur de l'animal. En cas d'atteinte des points limites, les animaux seront mis à mort dans les 24h. Aussi, les souris disposeront de fibres de peupliers leur permettant de construire un nid et ainsi améliorer leur condition d'hébergement.

2535- Le projet de recherche proposé s'intéresse à l'initiation et la progression de la cancérogenèse pancréatique et ovarienne. Le cancer du pancréas est l'un des cancers les plus mortels et aucune thérapie efficace n'est disponible pour le moment. Les cancers ovariens non opérables sont très résistants et de mauvais pronostic. L'utilisation de lignées cancéreuses pancréatiques ou ovarienne humaines en culture ne nous permet pas de comprendre complètement cette pathologie. Ceci est en partie expliqué par le fait que les tumeurs solides sont composées de plusieurs types cellulaires en dehors des cellules tumorales qui jouent des rôles importants dans la progression du cancer. Afin de mettre en place des traitements plus efficaces, la communauté scientifique a ainsi développé des modèles murins de référence pour l'étude de ces cancers. Dans ces modèles, l'introduction dans l'ovaire ou le pancréas d'altérations génétiques à l'origine de ces cancers mime l'évolution de ces pathologies chez l'homme. Des modèles de cancers du pancréas et de l'ovaire reconstitués in situ après injection de cellules tumorales ou stromales sont également utilisés. Nous suivons l'évolution des paramètres de la progression tumorale. Les cancers solides du pancréas et de l'ovaire sont en effet des maladies complexes très métastatiques, impliquant des cellules non tumorales. Il est démontré que ces cellules non tumorales composant le stroma jouent un rôle négatif dans la survie des patients.

Enfin, notre mode de vie actuel, l'alimentation ou les pathologies associées à ce mode de vie, le diabète, la pancréatite ou l'obésité modifient l'incidence de ces cancers.

Seuls nos modèles murins nous permettront d'étudier la cinétique d'apparition et les étapes critiques de cette cancérogenèse, le rôle des cellules non tumorales, les interactions entre les cellules tumorales / stromales, le développement de métastases et l'importance des facteurs de risque associés. Nous voulons en particulier démontrer le rôle thérapeutique de l'inhibition génétique ou pharmacologique d'une cible majeure en oncologie. Cette étude nous permettra de valider cette voie ou un des composants particuliers comme cible thérapeutique. Le projet aboutira par des essais cliniques de Phase I/II pour des molécules déjà en cours de développement.

Ce projet comporte une expérimentation sur 4180 animaux. Nous travaillons dans le respect de la règle des 3 Rs. 1- Remplacer: Nous créerons les lignées cellulaires à partir des animaux pour modéliser les conditions in vitro à l'aide de co-cultures. 2- Réduire: Les groupes d'animaux sont prévus afin de permettre des analyses statistiques concluantes et éviter les duplications d'expériences. Nous prélevons le maximum de données par souris et d'organes que nous partageons avec des collaborateurs au niveau d'une banque d'échantillons. 3- Raffiner: Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, qui auront été définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal. Nous utilisons des techniques d'imagerie de pointe afin de suivre nos expérimentations.

2536- Le choc cardiogénique est lié à une défaillance du cœur (principalement suite à un infarctus) entraînant des désordres de la circulation sanguine et par conséquent 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 %). Pour le choc cardiogénique réfractaire traduisant un état de choc persistant malgré l'optimisation des thérapeutiques conventionnelles maximales, l'assistance circulatoire est proposée (ECMO : extracorporeal membrane oxygenation).

La mise en oeuvre d'une ECMO au cours de la prise en charge de choc cardiogénique peut remplacer la fonction cardiaque, mettre au repos le cœur et ainsi de gagner du temps pour une récupération vasculaire. Il maintient une perfusion tissulaire satisfaisante dans l'attente d'une récupération myocardique ou d'une transplantation.

Habituellement, le traitement de bêtabloquants est recommandé en cas de myocardite aiguë, en particulier en cas d'insuffisance cardiaque ou d'arythmies, mais sans réelle justification scientifique. En 2005, la Société Européenne de Cardiologie a recommandé l'administration de bêtabloquants par voie intraveineuse dans le cas d'une ischémie myocardique ou de tachycardie en cas de choc cardiogénique. L'administration de bêtabloquants permet d'abaisser la fréquence cardiaque, de prolonger le temps de la diastole (relâchement du cœur après la contraction), d'augmenter la perfusion de l'artère coronaire et de diminuer la demande myocardique d'oxygène. Notre équipe vient de mettre en évidence un effet cardioprotecteur au cours d'un choc septique qui est probablement dû à l'effet anti-inflammatoire du bêta-bloquant administré. Il y a peu d'étude concernant le cardioprotection par bêtabloquant dans le choc cardiogénique notamment pendant le traitement de l'assistance d'ECMO. Nous proposons donc d'étudier ce phénomène sur un modèle porcin sous l'ECMO.

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. Les animaux seront répartis en 2 groupes : un groupe d'animaux témoins + un groupe d'animaux auxquels des bêtabloquants seront administrés. De nombreux paramètres physiologiques et biologiques seront étudiés afin d'établir ou non un impact positif à l'apport de bêtabloquant dans le traitement du choc

cardiogénique. A la fin de la procédure, les animaux sont mis à mort afin d'effectuer une étude anatomopathologique sur les tissus.

Ce modèle animal est utilisé pour sa similitude avérée, en terme d'hémodynamique (circulation sanguine) et de morphologie cardiaque, avec les processus physiologiques rencontrés en clinique humaine. Il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de s'affranchir du modèle animal (Remplacement).

Ce projet portera sur 20 cochons mâles (poids = 50-60kg) permettant ainsi une étude statistiquement exploitable. Nous avons une bonne connaissance de ce modèle dans notre structure ce qui nous permet de réduire le nombre d'animaux (mortalité-chirurgie <30%).

Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique permettent un raffinement de la méthodologie. Nous avons également défini des points limites qui ne seront pas dépassés grâce aux procédures médicamenteuses disponibles au laboratoire (analgésie contrôlée, anesthésie chirurgicale).

2537- L'obésité est devenue depuis 20 ans une pandémie mondiale et la prise en charge de celle-ci et de ses pathologies associées (dyslipidémie, diabète, stéatose hépatique, hypertension artérielle, etc...) constitue un enjeu majeur en santé publique. L'obésité maternelle pendant la grossesse a un impact très fort sur le risque d'obésité précoce de la descendance et sur le développement ultérieur de pathologies cardiovasculaires et métaboliques avec, à terme, une augmentation de la morbi-mortalité. La chirurgie bariatrique s'est progressivement placée au premier rang des traitements efficaces en termes de perte de poids et de résolution des comorbidités, mais il n'existe actuellement aucune donnée clinique ou expérimentale concernant son impact sur la descendance de mères obèses opérées.

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

Pour cela, nous allons induire une obésité chez 60 souris C57Bl6 par un régime alimentaire "high fat high sugar" pendant 6 semaines. Ces souris seront alors opérées dans un centre expert soit d'une sleeve gastrectomie, soit d'un by-pass gastrique, soit d'une laparotomie blanche avec biopsie hépatique simple. Un groupe de 20 souris contrôle non obèse aura également une laparotomie blanche.

Après 15 jours de récupération post-opératoires, les souris seront transférées vers une autre animalerie pour poursuite du protocole: les souris seront mises en accouplement et suivies quotidiennement durant leur gestation. Après le sevrage des portées, les altérations métaboliques, hépatiques et cardio-vasculaires seront évaluées chez les mères après sacrifice des animaux. Ces mêmes altérations seront étudiées chez les descendants (mâles et femelles) de ces mères à l'âge de 3, 6, 12 et 18 mois.

Au total, en incluant la mortalité opératoire, il est prévu d'utiliser 170 souris. Le respect de la règle des 3R passe par l'utilisation d'un nombre minimal d'animaux pour obtenir des groupes permettant d'avoir des données statistiquement significatives et l'utilisation d'analgésiques et d'antalgiques adaptés à toutes les étapes du protocole.

2538- Le changement climatique (CC) doit entraîner une augmentation des événements hydrologiques extrêmes (crues, étiage), en fréquence et en intensité. De par leur localisation et leur géomorphologie (forte pente), les cours d'eau localisés à l'amont des bassins versants sont particulièrement exposés. Les salmonidés sont des espèces dont les sites de reproduction se trouvent plutôt sur l'amont des cours d'eau, voire sur les affluents de tête de bassin pour la truite. Le présent projet vise à estimer les potentiels effets des événements hydrologiques extrêmes (principalement les crues) et de la température sur la croissance des jeunes. Chez les salmonidés, la ponte est enfouie sous le gravier et la durée du développement, qui aboutit à l'émergence des alevins en eau libre pour y démarrer leur alimentation exogène, est principalement dépendante de la température. Au contraire, l'abondance de leurs proies, les larves d'invertébrés, est essentiellement dépendante de l'hydrologie avec des crues pouvant lessiver la plus grande partie des ressources. Il est admis que la durée de développement sous graviers des salmonidés est le résultat de la sélection naturelle, et que le moment de leur sortie correspond au pic d'abondance des larves d'invertébrés (printemps). Il y a donc dans l'évolution rapide que connaît le régime des températures et des précipitations, un possible décalage temporel entre l'émergence des graviers et l'abondance des larves d'invertébrés. Les expérimentations se feront à partir d'animaux produits par fécondation artificielle à partir de géniteurs mâles et femelles de truite prélevés dans le milieu naturel. On pense utiliser chaque année pendant 2 à 3 ans jusqu'à 4 femelles et 4 mâles afin d'obtenir plusieurs pontes. Parmi les embryons produits, les alevins non utilisés seront relâchés dans le milieu naturel. Chaque année on estime à 146 le nombre d'alevins qui entreront effectivement en expérimentation (début de l'alimentation exogène). Les jeunes salmonidés seront placés dans des conditions de ressources en nourriture variables. Leur croissance sera appréciée par mesure de longueur et poids après anesthésie. Ils seront sacrifiés en fin d'expérimentation afin de travailler sur les mécanismes mis en place au niveau métabolisme nutritionnel face à la restriction alimentaire. Ces travaux devraient nous permettre d'évaluer les possibles impacts des événements climatiques extrêmes chez la truite, salmonidés à forte valeur halieutique et patrimoniale.

2539- Le changement climatique (CC) doit entraîner une augmentation des événements hydrologiques extrêmes (crues, étiage), en fréquence et en intensité. De par leur localisation et leur géomorphologie (forte pente), les cours d'eau localisés à l'amont des bassins versants sont particulièrement exposés. Les salmonidés sont des espèces dont les sites de reproduction se trouvent plutôt sur l'amont des cours d'eau, voire sur les affluents de tête de bassin pour la truite. Le présent projet vise à

estimer les potentiels effets des événements hydrologiques extrêmes (principalement les crues) sur la croissance des jeunes stades de développement de ces deux espèces. Chez les salmonidés, la ponte est enfouie sous le gravier et la durée du développement, qui aboutit à l'émergence des alevins en eau libre pour y démarrer leur alimentation exogène, est principalement dépendante de la température. Au contraire, l'abondance de leurs proies, les larves d'invertébrés, est essentiellement dépendante de l'hydrologie avec des crues pouvant lessiver la plus grande partie des ressources. Il est admis que la durée de développement sous graviers des salmonidés est le résultat de la sélection naturelle, et que le moment de leur sortie correspond au pic d'abondance des larves d'invertébrés (printemps). Il y a donc dans l'évolution rapide que connaît le régime des températures et des précipitations, un possible décalage temporel entre l'émergence des graviers et l'abondance des larves d'invertébrés. Nous étudierons l'impact des crues sur la production d'invertébrés, et sur la croissance des jeunes stades de salmonidés en milieu semi-naturel. Par ailleurs, les périodes d'étiage pouvant selon les scénarios devenir plus fréquentes, nous étudierons l'impact d'un étiage sur la disponibilité en invertébrés et la croissance de juvéniles âgés de quelques mois. Les expérimentations sur les jeunes stades se feront à partir d'animaux produits par fécondation artificielle à partir de géniteurs mâles et femelles de truite prélevés dans le milieu naturel. On pense utiliser chaque année pendant 2 à 3 ans jusqu'à 4 femelles et 4 mâles afin d'obtenir des pontes étalées dans le temps permettant de faire plusieurs expériences la même année. Parmi les embryons produits, les alevins non utilisés seront relâchés dans le milieu naturel. Enfin, l'impact de juvéniles de truite d'un an sur le benthos soumis ou non soumis à une crue sera apprécié. Ces individus de 1an seront obtenus par pêche électrique. Chez les alevins, les comportements (prises alimentaires en dérive ou sur le fond) pourront être échantillonnés grâce à la vidéo ou à l'observation directe.

C'est une trentaine de géniteurs (pêche électrique), 500 alevins (issus de ces géniteurs) et 32 truitelles d'un an (pêche électrique) qui entreront en expérimentation sur les 3 années. 240 alevins seront mis à mort pour analyses physiologiques ; tous les autres individus seront relâchés sur leur site d'origine.

2540- Véritable enjeu de santé publique, la douleur motive près de deux tiers des consultations médicales. La douleur aiguë (brûlure, piqure, crampe, ..) joue un rôle d'alarme permettant à l'organisme de réagir et de se protéger. La douleur est perçue par des neurones spécialisés appelés nocicepteurs localisés dans des ganglions situés de part et d'autre de la moelle épinière. Leurs fonctions consistent à détecter et transmettre les informations sensorielles depuis la périphérie (peau, muscles ou viscères) vers le système nerveux central (moelle, cerveau). Les populations neuronales des ganglions impliquées dans la perception de la douleur présentent une très grande hétérogénéité. On distingue différentes sous-populations responsables de la détection de stimuli douloureux spécifiques tels que les douleurs mécaniques (pincement, piqûres,...) ou thermiques (brûlures). Les réponses thérapeutiques proposées à ce jour pour lutter contre la douleur présentent le plus souvent une efficacité limitée et des effets secondaires indésirables. La mise en évidence de nouvelles molécules ayant un spectre d'action plus spécifique est donc primordiale pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et ainsi améliorer la qualité de vie des patients.

Notre projet a pour but l'étude in vivo des différentes populations neuronales en condition normale et pathologique (en réponse à une inflammation et aux traitements analgésiques).

L'organisme modèle que nous utilisons est la souris pour laquelle nous avons élaboré une stratégie dont le but est d'étendre le répertoire moléculaire du système nocicepteur. Pour cela, nous avons identifié de nouvelles molécules exprimées dans des sous-populations de nocicepteurs. Pour chacune de ces nouvelles molécules, nous avons généré un modèle murin sophistiqué en insérant au locus d'intérêt le gène codant pour un récepteur à une toxine.

Les objectifs proposés sont parfaitement réalisables sur 5 ans aux vues des différentes ressources financières (ERC) et humaines disponibles (3 chercheurs statutaires, 1AI, 1 chercheur post-doctoral, 2 étudiants en Thèse et 1 en Master). Les personnes affectées au projet sont formées et qualifiées à l'expérimentation animale : 3 chercheurs (1 formations B et 2 chirurgie), tous les étudiants en thèse suivent la formation B. Par ailleurs nous utilisons du matériel de dernière génération et notre établissement possède un agrément propice à l'expérimentation animale.

La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés. Ainsi ce projet utilisera 770 souris sauvages et 690 souris génétiquement modifiées.

Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence d'objets permettant le raffinement de l'environnement. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et 5 personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et environnemental des animaux sont contrôlés.

2541- Notre activité est dédiée à la production d'anticorps monoclonaux (Acm) pour la recherche et le diagnostic. Les Acm sont la base de nombreux tests de diagnostics biologiques dans les domaines de la santé humaine et vétérinaire en particulier. Récemment, ces Acm ont été développés pour la thérapie, par exemple pour le traitement des maladies inflammatoires, cancer, ...

Le recours aux Acm permet de Réduire le nombre d'animaux puisque la production d'anticorps monoclonaux est réalisée en grande partie in-vitro. Cette méthode représente une alternative (Remplacement) à la production d'immun sérum très consommatrice en animaux.

La technique permettant de générer des Acm nécessite une maturation de la réponse immunitaire chez la souris, pour cela nous immunisons les souris avec un antigène élaboré (Raffinement) permettant d'obtenir une réponse immunitaire spécifique et orientée. Nous suivons les lignes directrices pour la production d'anticorps établi par le CCPA (Conseil Canadien de

Protection des Animaux). L'immunisation n'induit pas de dommage chez la souris, un léger inconfort limité dans le temps peu résulter de la stimulation du système immunitaire suite à l'injection de l'immunogène. Cet inconfort est pris en compte et est pallié par l'injection de substance analgésique. Toutes ces expérimentations seront réalisées dans le respect des recommandations du Comité d'Éthique Languedoc-Roussillon. Nous comptons utiliser un nombre maximal de 750 souris sur 5 ans.

2542- Un certain nombre de maladies neurodégénératives appelées protéinopathies comme la maladie de Huntington (MH), la maladie de Parkinson (MP) ou la maladie d'Alzheimer (MA), présentent la caractéristique commune d'induire l'apparition progressive d'agrégats protéiques intracérébraux. Ces agrégats protéiques restent néanmoins caractéristiques de chaque pathologie. Ainsi la MH se caractérise-t-elle par la présence d'agrégats intracellulaires de protéine huntingtine. En ce qui concerne la MP, elle est associée à la présence d'agrégats protéiques intracellulaires (corps de Lewy) formés pour une grande part d'alpha-synucléine agrégée. Enfin, la MA est caractérisée par l'apparition progressive de deux types de lésions : d'une part des dépôts extracellulaires d'amyloïde beta (plaques amyloïdes) et d'autre part des agrégats intracellulaires de protéine tau hyperphosphorylée appelés dégénérescences neurofibrillaires ou « tangles ».

Si les processus neurodégénératifs mis en jeu dans ces différentes pathologies émanent très certainement de causes différentes, il est néanmoins possible d'imaginer l'existence de processus cellulaires et moléculaires communs à ces maladies, comme ceux conduisant à ce processus d'agrégation protéique.

Il a été ainsi émis l'hypothèse que ce processus d'agrégation pourrait être un mécanisme de neuroprotection assez ubiquitaire permettant de séquestrer dans des agrégats « inertes » des espèces chimiques plus toxiques (oligomères) formées lors de l'évolution de ces maladies. Inversement, au fur et à mesure de l'évolution des pathologies et sous l'effet combiné du vieillissement cellulaire, ces agrégats protéiques deviendraient eux-mêmes toxiques pour les cellules qui les hébergent.

Dans ce contexte, une question centrale est donc de déterminer le rôle joué par ces agrégats protéiques dans l'apparition des symptômes associés à ces pathologies et d'étudier si des stratégies visant à promouvoir leur formation (peptide proagrégants) ou au contraire à faciliter leur disparition (immunothérapies par ex.) pourraient avoir un effet thérapeutique éventuel.

Si les modèles animaux existants tel que le rongeur permettent de mimer certaines des lésions caractéristiques de ces différentes protéinopathies, ils peinent, pour une grande part, à induire l'apparition des symptômes caractéristiques, et en particulier cognitifs, associés à ces maladies. Une des hypothèses pour expliquer ceci serait l'organisation anatomique particulière du cerveau humain qui pourrait jouer un rôle important dans l'expression comportementale de ces lésions. Il est donc indispensable de faire appel à une espèce phylogénétiquement proche de l'Homme, afin d'étudier l'impact fonctionnel de l'accumulation excessive de protéines aberrantes dans le cerveau.

L'apparition récente de nouveaux outils de transfert de gènes permettant de surexprimer localement une protéine anormale et la publication récente d'observations décrivant le caractère « infectieux » de certaines espèces protéiques impliquées dans les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington, rendent maintenant possible le développement de nouveaux modèles chez le primate non humain (PNH) qui seraient capables à la fois de mimer le processus d'agrégation protéique caractéristique de chacune de ces trois pathologies et également d'induire l'apparition de troubles moteurs et cognitifs très similaires à ceux observés chez les patients.

D'une part, l'utilisation du modèle PNH permet ainsi un suivi longitudinal des effets de différentes stratégies d'agrégation protéique sur le comportement moteur et cognitif. D'autre part, ce suivi neurologique pourrait être complété par une évaluation longitudinale de l'évolution des lésions en utilisant de manière combinée deux techniques non invasives, l'imagerie anatomique IRM et l'imagerie fonctionnelle par émission de positons (TEP).

Ce projet permettra ainsi au même temps d'évaluer in vivo la spécificité de nouveaux radiotraceurs TEP réputés cibler spécifiquement ces protéines agrégées et d'en confirmer post-mortem chez le PNH la spécificité avant une utilisation chez le malade en clinique.

L'objectif de ce projet est donc double. D'une part, nous voulons générer chez le PNH des modèles de maladies neurodégénératives, capables d'induire l'apparition progressive des agrégats, caractéristiques de chacune de ces pathologies (Parkinson, Alzheimer). Pour cela, différentes approches telles que l'utilisation de vecteurs viraux pour surexprimer localement des gènes codant pour ces protéines mutées ou l'injection de protéines extraites de cerveaux de patients malades ou encore des protéines synthétisées in silico (mimant les protéines isolées chez les patients) seront testées et comparées en utilisant également différentes voies d'administration (intracérébrale, intrathécale et intraveineuse). D'autre part, l'évolution des lésions dans chacun de ces modèles sera suivie in vivo par imagerie anatomique (IRM) et fonctionnelle (TEP) et relation avec l'évolution des déficits moteurs et cognitifs, observés en parallèle lors de tests spécifiques déjà validés.

Les PNHs étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité, dans des élevages reconnus. Leur nombre de 60 sur 5 ans (12 par an) a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données significatives afin d'évaluer l'effet de la délivrance de protéines pathologiques et la spécificité de plusieurs radioligands dans le cerveau de l'animal après injection intracérébrale/intrathécale/intraveineuse de ces protéines pathologiques.

Le modèle PNH se justifie par la complexité anatomique du cerveau de cet animal qui offre la possibilité d'évaluer les fonctions motrices et cognitives dans une espèce proche de l'Homme, en utilisant des échelles et tests de comportement non-douloureux et non-invasifs, très comparables et pour certains semblables à ceux utilisés en clinique. De même, la résolution des images IRM et TEP des équipements disponible à MIRCen, en rapport avec la taille des structures intracérébrales du cerveau du PNH, permet d'appliquer le même suivi longitudinal chez l'animal et de disposer d'index prédictifs de la progression des maladies neurodégénératives avant et après traitement, similaires à ceux qui permettraient l'évaluation de traitements thérapeutiques chez le patient.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Des échelles cliniques journalières, un soutien nutritionnel et l'application de critères d'arrêt permettent de veiller au bien-être des animaux. Tous les animaux seront hébergés en groupe social.

2543- Les chèvres laitières à haut niveau de production doivent recevoir une ration alimentaire adaptée à leurs besoins, donc de valeur nutritive précisément connue. Différentes équations de prédiction ont été proposées pour l'estimer à partir de leur composition chimique. Cependant, les productions de lait observées avec des animaux recevant certaines rations sont nettement plus faibles que celles attendues, avec des écarts variables suivant les animaux.

L'objectif de notre projet est de proposer des réponses à la filière caprine concernant l'utilisation d'aliments peu ou mal connus ou dont la valeur nutritionnelle est surestimée par les méthodes de mesure actuellement disponibles. Il s'agit de mieux cerner les différents aspects pouvant expliquer les variabilités inter-animaux en intégrant les facteurs de variation connus (niveau et vitesse d'ingestion, niveau de production et race) et en étudiant les animaux à différents niveaux de manière simultanée: animal entier, rumen, métabolisme, analyse et composition du lait, afin de limiter le nombre d'essais et de prélèvements.

Au cours des 5 années d'étude, la dizaine de rations testées contiendra des foin ventilés avec différents niveaux d'apport de concentré, ou des ingrédients dont on ne connaît pas la valeur nutritionnelle. L'expérimentation se fera, sur des chèvres laitières en début de lactation. Il est en effet important d'optimiser la valorisation de la ration alimentaire à cette période au cours de laquelle les animaux sont à leur maximum de production. Le projet comportera deux phases successives : une première phase (quatre semaines) avec trois groupes de 15 animaux menés en lots (soit 225 animaux, 5 répétitions en 5 ans). Un groupe recevra le régime habituel de la chèvrerie (groupe témoin). Les 2 autres groupes recevront les régimes à tester. Dans la seconde phase (quatre semaines), douze animaux (six par race) seront choisis dans chacun des deux groupes expérimentaux afin d'être le plus différents possibles en termes de production laitière, ce qui pourrait expliquer les variations inter-individus. Ils seront placés dans des cases individuelles pour mesurer leur cinétique d'ingestion (deux semaines), puis dans des cases à digestibilité (deux semaines).

La durée totale de l'expérience sera au maximum de 10 semaines, car du fait des contraintes liées au nombre de cases de digestibilité disponibles, une 1ère vague de 12 animaux enchainera directement les phases 1 (4 semaines) et 2 (4 semaines), tandis que la 2nde vague restera en lots pendant deux semaines supplémentaires ce qui portera à 6 semaines la durée de la phase 1, puis ce lot d'animaux enchainera la phase 2 de durée inchangée (4 semaines).

Les animaux seront pendant la moitié de l'expérience en lots, dans les conditions habituelles d'élevage. Comme les cases individuelles sont mitoyennes, les congénères voisines peuvent avoir un contact tactile. Leur comportement à la traite et leur niveau d'ingestion seront observés quotidiennement pour déceler toute anomalie très rapidement. Cette étude ne peut se faire qu'avec des animaux, puisque les résultats obtenus avec les méthodes classiques d'estimation sont en désaccord avec les observations sur le terrain. Nos travaux visent à répondre aux demandes de la filière caprine tout en approfondissant la connaissance de certains mécanismes physiologiques du ruminant.

2544- Dans les sociétés industrialisées, les problèmes de fertilité humaine sont de plus en plus fréquents. Pour pallier ce problème sociétal, la médecine moderne dispose de traitements hormonaux qui stimulent l'ovulation chez la femme. Au cours du traitement, les patientes reçoivent des doses massives d'hormones, rendant étroit le champ d'action entre une bonne stimulation ovarienne et un risque d'hyperstimulation qui, dans certains cas peut conduire à des complications (détresse respiratoire, perturbation des fonctions hépatiques et rénales, accidents thromboemboliques), allant exceptionnellement jusqu'au décès. De plus, certaines de ces patientes sont réfractaires et plusieurs doses successives sont alors nécessaires pour que la stimulation soit efficace.

Nous développons une solution alternative à ces traitements hormonaux d'induction de l'ovulation chez la femme. Le projet s'appuie sur des travaux préalables menés in vitro. Pour autant, dans l'état actuel des connaissances, les modèles cellulaires ou tissulaires ne sont pas suffisants pour l'étude de la reproduction et le recours au modèle animal est nécessaire et complémentaire. Un premier essai a été réalisé chez le macaque cynomolgus car du point de vue physiologie, son cycle sexuel est très proche de celui de la femme et présente les mêmes particularités. C'est également l'espèce réglementaire pour l'étude de composés destinés à traiter l'infertilité chez la femme. Cet premier essai a permis de montrer que la stratégie thérapeutique imaginée est fonctionnelle et efficace.

Cette nouvelle étude préclinique permettra de préciser les modalités d'administration (doses, moments d'injection). Ce projet comptera 20 femelles pubères de 4 ans n'ayant pas eu de gestation, nées et élevées à des fins scientifiques dans des élevages agréés.

La mise en œuvre de méthodes non invasives de suivi au cours du temps (échographie et IRM) permet de réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions, les manipulations se feront soit sur animal conscient entraîné soit sous anesthésie générale. Des critères d'arrêt sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus, ce qui permettra d'intervenir immédiatement, avec un recours au vétérinaire afin de mettre en œuvre les traitements approuvés.

2545- Plus de la moitié des patients souffrant d'un cancer reçoivent un traitement par radiothérapie. Cependant certaines cellules tumorales résistantes aux rayonnements ionisants sont à l'origine des récives tumorales. Trouver de nouveaux traitements permettant de rendre plus sensible à la radiothérapie ces cellules tumorales permettrait de diminuer ces récives. Nous avons identifié dans des cellules tumorales humaines cultivées in vitro des molécules responsables de la

radiorésistance de ces cellules et nous avons fait la preuve de concept in vitro que le blocage de ces molécules permet de rendre la radiothérapie plus efficace. Chez le patient les cellules tumorales se développent dans un microenvironnement vascularisé, contenant d'autres types cellulaires, au contact duquel elles se modifient, s'adaptent, diffusent. Il est donc indispensable de valider notre preuve de concept dans ce contexte plus global qu'il est impossible de reproduire in vitro. Nous envisageons donc d'utiliser un modèle murin très largement utilisé en cancérologie pour valider les études in vitro, le modèle de souris « nude » dans lequel seront implantées des cellules tumorales humaines dans lesquelles les molécules responsables de la radiorésistance auront été bloquées. Après irradiation focalisée sur la tumeur nous nous attendons à observer une diminution ou un blocage de la croissance tumorale beaucoup plus important dans les tumeurs qui seront invalidées pour nos molécules d'intérêt ce qui validerait cette approche comme une nouvelle thérapie potentielle permettant de radiosensibiliser les cellules tumorales. Sur la base de nos études antérieures et des données de la littérature, nous avons limité le nombre d'animaux à 8 par groupe de traitement. 5 animaux par groupe est le minimum requis pour avoir une significativité statistique. L'hétérogénéité de la prise tumorale, de la croissance des tumeurs chez les animaux et de la réponse aux irradiations nous oblige à prévoir un nombre plus important d'animaux au départ. Le fait de prévoir des animaux supplémentaires nous épargnera de renouveler plusieurs fois les mêmes expériences. Quatre groupes sont nécessaires pour valider chacune des cibles que nous avons identifiées in vitro. Un total de 160 animaux sera utilisé pour valider un maximum de 5 cibles.

Les animaux sont hébergés dans des conditions qui répondent à la fois à la réglementation nationale et aux directives européennes dans le domaine de l'expérimentation et l'éthique animale. De plus une personne est spécifiquement dédiée au bien-être des animaux. Afin de réduire au maximum le stress des animaux, ils seront manipulés avec précautions et calme durant toute la durée de l'expérience. Les animaux seront observés quotidiennement afin de repérer précocement les signes de souffrance. Les animaux seront mis à mort dès l'apparition de signes de souffrance par surdosage anesthésique. Toutes les manipulations qui pourront être stressantes ou douloureuses pour l'animal seront réalisées après anesthésie (implantation des tumeurs, irradiation des animaux).

2546- La fragmentation des habitats naturels est une des causes principales de perte de biodiversité. Elle est notamment provoquée par l'expansion continue de l'urbanisation : accroissement des surfaces urbanisées et des infrastructures de voirie au détriment des habitats naturels. En isolant les individus les uns des autres, les aménagements urbains affectent le bon déroulement de la reproduction et le maintien de flux génétiques, indispensables à la survie des populations animales. Chez le Hamster d'Europe (*Cricetus cricetus*) en particulier, un déclin des populations est observé depuis les années 1970 en Europe de l'Ouest et s'étend aujourd'hui à toute son aire de répartition jusqu'en Ukraine. Les mesures de protection mises en place en Europe de l'Ouest n'ont pas suffi à enrayer ce déclin. Parmi les motifs impliqués dans ce déclin, l'urbanisation grandissante est une cause majeure, diminuant l'habitat favorable disponible à l'espèce et déconnectant les populations et les individus les uns des autres.

Puisqu'il est impossible de lutter contre le phénomène d'urbanisation qui répond à des besoins humains, il est primordial de penser les aménagements en faveur de la biodiversité et de réfléchir à la possibilité d'utiliser des zones urbanisées pour la conservation de certaines espèces. De cette façon, ces zones urbanisées pourront faire partie intégrante de tracés de corridors écologiques et permettront la reconnexion entre populations animales isolées. Dans certains pays d'Europe, des populations de Hamster d'Europe ont occupé ou occupent des milieux urbains (Autriche, Ukraine, Pologne, Slovaquie, République tchèque, Russie, Allemagne). Avant de considérer la possibilité d'utiliser les espaces péri-urbains pour la conservation du Hamster d'Europe dans notre région, nous allons tester l'impact de la pollution lumineuse nocturne sur la l'activité journalière et saisonnière, le succès reproducteur et l'hibernation des hamsters.

Cette étude étant spécifique au Hamster d'Europe, il n'a pas été possible de la remplacer comme préconisé par la règle des 3 R. Toutefois, l'effectif des individus testés par groupe a été réduit autant que possible. Notre étude, d'une durée de deux ans, implique un total de 564 individus dont une partie est issue de la reproduction de deux premiers groupes d'étude. Enfin, aucun animal ne sera sacrifié à l'issue de cette expérience et les animaux seront relâchés en milieu naturel pour les renforcements des populations par l'ONCFS (en lien avec le Plan National d'Actions en faveur de l'espèce) si l'état des individus le permet (état corporel, âge, comportement normal).

A noter que des alternatives de raffinement seront mises en place (enrichissement de la cage avec des matériaux de nidification, des tubes, réduction des manipulations pour limiter le stress...) afin d'améliorer le bien-être des animaux utilisés dans le cadre de cette expérimentation. Par ailleurs, les animaux auront à leur disposition un dispositif simulant le terrier (boite opaque accolée à leur cage) dans laquelle ils pourront se mettre à l'abri de la lumière si besoin.

2547- La qualité des protéines alimentaires est une question cruciale lors du développement d'ingrédients protéiques à haute valeur ajoutée. De plus, la limitation des ressources comme les matières premières agricoles posent des questions de sécurité alimentaire à l'échelle planétaire. Dans ce contexte, l'évolution des régimes et des pratiques alimentaires et notamment concernant le type de source de protéines consommées fait partie des leviers majeurs pour répondre aux défis de la durabilité.

Plusieurs critères rendent compte de la qualité protéique. Parmi eux, le coefficient d'efficacité protéique (CEP) et le score chimique corrigé de la digestibilité (PD-CAAS).

Le CEP consiste à évaluer chez le rat en croissance la capacité d'une protéine à soutenir la croissance. D'un point de vue pratique, des rats en croissance sont nourris pendant un mois avec un régime contenant l'ingrédient à tester. Le CEP est sa prise de poids sur la période d'observation est ramenée à l'apport protéique.

Le PD-CAAS, officiellement recommandé par la FAO, est basé sur l'analyse de la composition en acides aminés indispensables de la protéine pour évaluer sa capacité à satisfaire les besoins nutritionnels. Ce score chimique est corrigé de la digestibilité, mesurée souvent au niveau fécal chez le rat.

Ces protocoles ne nécessitant pas d'euthanasier les animaux, nous les ferons adopter par une association agréée.

Ces études nous permettront de tester des extraits protéiques ou des protéines qui jusqu'à présent n'ont pas fait l'objet d'études et dont l'utilisation peut s'avérer nécessaire pour participer à la satisfaction des besoins en protéines.

2548- Décrypter les réseaux de neurones dans le cerveau et les principes fondamentaux qui les sous-tendent sont deux des objectifs majeurs des neurosciences aujourd'hui. L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) est maintenant une technique établie pour mesurer les fonctions du cerveau sur la base des changements dans l'oxygénation du sang pendant une activation (i.e. l'effet BOLD). Augmenter le champ magnétique auquel les scanners IRM opèrent permet d'obtenir des images avec une meilleure sensibilité, spécificité et résolution. Cependant, certaines limitations des hauts champs magnétiques telles que l'augmentation du bruit physiologique, les effets de susceptibilité, etc. freinent la multiplication des applications en IRMf à très haut champ magnétique.

Un des objectifs de ce projet est de développer de nouvelles stratégies d'acquisitions en IRMf qui vont permettre de surmonter les contraintes des très hauts champs magnétiques (éliminer les artefacts introduits par les différences de susceptibilité magnétique sur les images, sensibiliser les acquisitions à des marqueurs plus spécifiques de l'activité neuronale (par exemple, le gonflement des cellules)) et de réaliser des études précliniques. De plus, nous allons développer et appliquer de nouvelles méthodologies basées sur des principes qui n'utilisent pas l'effet BOLD et qui peuvent rendre compte de l'activité neuronale tout en ne dépendant pas du couplage neuro-vasculaire. Ces nouvelles méthodologies seront comparées avec la technique traditionnelle d'IRMf-BOLD. L'utilisation d'animaux est nécessaire, car nous avons besoin d'un modèle qui exprime des fonctions similaires à celles du cerveau humain. De telles expériences ne sont pas possibles *in vitro*.

Ce projet d'une durée de 5 ans, sera réalisé sur des rongeurs en s'assurant qu'aucune angoisse, douleur ou souffrance ne soit ressentie lors de toute intervention (injection en IP, chirurgie, pose des cathéters, stimulation électrique ou thermique, examen d'IRM) sur les animaux et, pour cela, des protocoles d'anesthésie et d'analgésie sont définis et validés par une équipe vétérinaire. Une observation quotidienne des animaux sera effectuée pour s'assurer de leur bien-être. Dans le cas d'un effet inattendu, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en œuvre les traitements appropriés ou de décider de l'euthanasie. Le nombre d'animaux (100) a été réduit au minimum nécessaire pour détecter un effet statistique.

2549- Les Norovirus sont maintenant reconnus comme la cause principale de gastroentérites non-bactériennes aiguës, à la fois chez les enfants et les adultes. Ces gastroentérites affectent mondialement des millions de personnes. L'identification rapide des Norovirus est essentielle pour mettre en place des mesures de prévention qui permettront de réduire la propagation de l'épidémie. La méthode standard pour la détection des Norovirus est la PCR en temps réel, mais cette technique est longue et nécessite des équipements lourds que seuls des laboratoires spécialisés possèdent.

Dans ce contexte, nous désirons développer un test immuno-chromatographique rapide permettant la détection des Norovirus dans les selles. Ce test, basé sur la réaction anticorps-antigène, nécessite de disposer d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux très sensibles. Ces anticorps ne sont pas commercialement disponibles.

De nombreux essais d'immunisation réalisés depuis 2008, pour l'obtention d'anticorps monoclonaux n'ont pas permis d'obtenir des anticorps répondant à nos besoins. Les anticorps polyclonaux sont connus et utilisés pour apporter la sensibilité faisant parfois défaut aux anticorps monoclonaux.

C'est dans ce contexte que nous soumettons ce protocole d'immunisation pour approbation. Ce protocole conduira à l'obtention d'un immunosérum qui, une fois purifié, fournira les anticorps polyclonaux qui seront utilisés dans le test. Le choix des animaux, le nombre d'animaux par série, l'immunogène et le protocole ont été définis de manière à minimiser le nombre d'injections et à obtenir la meilleure réponse immunitaire possible.

Il est prévu pour notre projet d'immuniser plusieurs séries de 3 ou 5 lapins. Le nombre total de lapins immunisés sera au maximum de 20.

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

2550- La parathormone ou hormone parathyroïdienne (PTH en anglais) joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme phosphocalcique. Une diminution de la calcémie entraîne une augmentation de la sécrétion de PTH, alors qu'une augmentation de la calcémie et un apport élevé en vitamine D inhibe la sécrétion de PTH.

D'un point de vue diagnostique, le dosage sanguin de l'hormone parathyroïdienne, associé à un dosage de la calcémie, permet d'établir le diagnostic d'hyperparathyroïdie. Une surveillance et un traitement peuvent ainsi être mis en place, avec notamment un suivi des conséquences qu'elle entraîne au niveau osseux.

Dans ce contexte nous souhaitons développer un test de dosage de cette hormone dans les sérums humains. Ce test sera un immunoessai, dont le principe repose sur la réaction anticorps-antigènes et qui nécessite donc de disposer d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux sensibles et spécifiques. De nombreux essais d'immunisation réalisés depuis 2010 pour l'obtention d'anticorps monoclonaux, ont montré la faisabilité de l'approche mais n'ont pas abouti, faute d'une sensibilité suffisante. Les anticorps polyclonaux sont connus pour apporter la sensibilité faisant parfois défaut aux anticorps monoclonaux. C'est dans ce contexte que nous souhaitons pouvoir immuniser des animaux afin d'obtenir des immunosérums qui, une fois purifiés, donneront les anticorps polyclonaux qui seront utilisés dans le test.

Le choix des animaux, l'immunogène et la procédure ont été définis de manière à minimiser le nombre d'injections et à obtenir la meilleure réponse immunitaire possible. Les animaux retenus devraient, en outre, permettre de constituer un stock d'anticorps couvrant de nombreuses années de production, les antisérums ayant dans notre société une durée de conservation de 16 ans.

La chèvre est l'animal choisi pour ce projet, car c'est un animal docile, patient, « intelligent » convenant parfaitement pour des protocoles nécessitant des prélèvements sanguins multiples et des volumes satisfaisant d'antisérum présentant un titre élevé et une forte affinité vis à vis de l'antigène injecté. De plus, le prélèvement de sérum peut être réalisé par plasmaphérèse qui est un mode de prélèvement moins traumatisant et éprouvant pour l'animal.

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

Les animaux sont hébergés et soignés quotidiennement dans des conditions conformes à la réglementation.

2551- L'hémophilie est une maladie de la coagulation sanguine caractérisée par un déficit d'un facteur de la coagulation. Ce déficit peut être dû à une mutation génétique ou à la présence d'anticorps contre l'un de ces facteurs. Les manifestations cliniques de la maladie sont proportionnelles au déficit et correspondent à des hémorragies pouvant atteindre différents organes. Il existe plusieurs types d'hémophilie selon le facteur de coagulation déficitaire : les plus communes, même si elles sont considérées comme des maladies rares, sont l'hémophilie A (déficience en facteur VIII) et l'hémophilie B (déficience en facteur IX).

L'objectif de ce projet est d'étudier dans un modèle murin d'hémophilie, la concentration sanguine en fonction du temps (propriétés pharmacocinétiques) et l'efficacité de nouveaux médicaments : des facteurs de la coagulation (protéines humaines d'origine plasmatisque ou recombinantes).

Aucun modèle in vitro ne permet de caractériser ces deux propriétés pour les protéines de la coagulation et principalement les propriétés pharmacocinétiques.

Les rongeurs utilisés, ont moins de 1% de Facteur VIII circulant, un temps de saignement allongé par rapport aux témoins et sont couramment utilisées pour évaluer l'efficacité de facteurs de la coagulation.

L'étude de pharmacocinétique consiste en une administration unique intraveineuse du médicament sous anesthésie et un seul prélèvement terminal sous anesthésie générale.

L'étude de l'efficacité des différents médicaments consiste à analyser le temps nécessaire à l'arrêt du saignement. L'animal est anesthésié pendant toute la durée de l'étude et sera euthanasié en fin d'expérimentation.

Nous aurons recours à un total de 2088 animaux sur 3 ans, nés et élevés dans des établissements agréés. Ce nombre a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Des méthodes d'anesthésie sont pratiquées avant chaque injection ou prélèvement afin d'éviter les souffrances. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir leur bien-être. Dans le cas où des effets indésirables interviendraient, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de procéder à une euthanasie.

2552- Le cancer de vessie est la 11ème cause de cancer dans le monde. On dénombre environ 430 000 nouveaux cas par an, la plupart dans les pays industrialisés, notamment en Europe et en Amérique du Nord. C'est le 6ème cancer en terme d'incidence. La probabilité de développer un cancer de vessie est de 4% chez l'homme et de 1,2% chez la femme. Le risque apparaît surtout après 60 ans. Les cancers de vessie sont la cause de 165 000 décès par an, soit 4% des décès par cancer. L'apparition des tumeurs de vessie peut s'expliquer grâce à plusieurs facteurs de risque, notamment le tabagisme. A l'heure actuelle, le cancer de vessie reste l'un des cancers les plus coûteux à traiter, du fait du nombre d'interventions qui peuvent être nécessaires. Les thérapies utilisées actuellement peuvent être divisées en deux groupes en fonction de l'envahissement ou non du muscle par la tumeur. Les seuls traitements existants à l'heure actuelle sont lourds et invasifs. Le premier est une cystectomie (résection totale de la vessie) couplée ou non à une chimiothérapie composée des agents chimiothérapeutiques suivants: le méthotrexate, la vinblastine, l'adriamycine et le cisplatine (appelé traitement MVAC) ou alors un couplage cisplatine et gemcitabine (appelé traitement GC). Malheureusement, ces traitements, en plus d'être lourds, n'ont que peu d'impact bénéfique et la survie des patients n'est alors que de 12 à 15 mois. Cette description des traitements existants pour les cancers de vessie montre bien qu'il est réellement important de mieux caractériser ces tumeurs, leurs altérations moléculaires et les voies de signalisation intracellulaires associées afin de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Ceci dans le but d'ouvrir la voie à de nouveaux traitements thérapeutiques.

Le projet a pour objectif d'évaluer l'activité anti-tumorale potentielle d'une nouvelle molécule sur deux modèles précliniques de cancer de vessie. Il sera effectué dans le cadre d'une prestation de service pour le compte d'une industrie privée.

D'un point de vue pratique, ce projet utilisera au total 30 souris immunodéficientes (Swiss nude mâles) âgées de 6 à 8 semaines qui seront xénotreffées par des échantillons tumoraux de modèles précliniques de cancer de vessie. A la fin de l'étude, les souris seront sacrifiées par dislocation cervicale après sédation à l'isoflurane (anesthésie gazeuse) et les tumeurs prélevées pour des analyses ultérieures.

Pour ce projet, la règle des 3R sera respectée de la façon suivante :

- Réduction : 10 souris (5 par modèle) seront nécessaires pour la phase d'amplification et 20 souris (10 par modèle) pour l'étude proprement dite. Ce nombre d'animaux est un nombre minimal pour la validation statistique des résultats (Kruskal-Wallis one-way Anova) et il tient compte d'un taux de prise de greffe > à 90%. Par ailleurs, ce nombre de souris permet d'avoir assez de matériel pour les analyses ultérieures nécessaires à la caractérisation de l'activité tumorale de la molécule testée.

- **Raffinement** : Ce projet sera réalisé au sein d'une animalerie agréée et par conséquent les animaux seront manipulés par du personnel habilité et soucieux de leur bien-être. En l'occurrence, le raffinement sera assuré par un enrichissement des cages pour le confort des animaux. Les souris seront nourries ad libitum et hébergées en groupe; elles ne seront séparées qu'en cas de comportement agressif avec induction de plaie. Nous diminuerons la douleur et l'angoisse liées à l'acte chirurgical (xénogreffe en sous-cutané dans la région interscapulaire) en opérant sous anesthésie et en appliquant une analgésie locale au moment du réveil. Pour finir, les animaux seront surveillés pendant toute la phase de réveil. Nos interventions ne semblent pas particulièrement douloureuses pour l'animal. Le suivi et la surveillance de nos souris montrent d'ailleurs un comportement normal dès le réveil avec prise alimentaire normale les jours suivants, sans perte de poids et sans modification de la température corporelle.

- **Remplacement** : Les tumeurs de vessie se caractérisent par une grande variabilité cytogénétique. Ainsi, la réalisation d'études fiables pour une validation préclinique d'un nouveau traitement in vivo passe par l'utilisation d'un panel étendu de modèles porteurs de tumeurs aux caractéristiques moléculaires variables et nécessite l'utilisation de modèles animaux reproduisant fidèlement les caractéristiques des tumeurs humaines. Ainsi, les modèles expérimentaux in vitro sont clairement inadaptés à ce projet car obtenus à partir de lignées cancéreuses clonales ne reflétant pas l'hétérogénéité de la tumeur in situ. Par conséquent, aucune méthode de remplacement n'existe.

La molécule à tester est en cours de développement par un groupe pharmaceutique qui en est le seul dépositaire. Ce groupe a sous-traité la validation préclinique in vivo de leur molécule car il ne disposait pas de modèles précliniques adéquats pour une validation préclinique fiable. Pour toutes ces raisons, ce projet n'a donc aucunement été réalisé auparavant.

2553- Les différentes sociétés utilisatrices d'anticorps monoclonaux, possèdent différents clones, dont les anticorps produits sont utilisés dans des kits diagnostics en santé humaine (allergie, hémostase...) largement distribués sur le marché mondial, et parmi les plus référencés depuis de nombreuses années. Ces trousse de diagnostics sont des kits I.V.D (In Vitro Diagnostic) enregistrés officiellement et marqués CE sous la réglementation « ISO 9001-2008 » et « 13485 ». Certains sont également FDA Approved.

Ces clones doivent aujourd'hui être produits par la technique des ascites, à raison de une à seize productions par clones et par an, correspondant à 125 000 animaux (souris) sur 5 ans. Ces clones ont été développés et sélectionnés pour leur spécificité et leur rendement il y a plus de 25 ans.

Suite à la demande des autorités de favoriser d'autres techniques de production, des démarches ont été entamées depuis 2007, pour le transfert des productions d'anticorps en culture « in vitro » et limiter ainsi le recours à l'utilisation de murins. Malheureusement, la production en bioréacteur pour les différents clones, dont cette DAP fait objet, a modifié certaines caractéristiques de l'anticorps et ne permet pas, à ce jour, de valider l'équivalence entre l'anticorps monoclonal "in vitro" et l'anticorps monoclonal "in vivo". Cette perte de qualité n'est pas acceptable ni autorisée par les autorités compétentes en raison du marquage CE et de la finalité diagnostic de nos produits.

Des investigations et des essais sont toujours en cours pour parvenir à utiliser certains anticorps monoclonaux "in vitro".

Dans le but de limiter au maximum la douleur, il est envisagé de réaliser un essai en raccourcissant le temps de l'expérimentation, en utilisant un adjuvant moins invasif que le Pristane, et en administrant à l'animal un analgésique par voie orale. A noter également, qu'un prélèvement unique est réalisé sur animal préalablement euthanasié.

Par ailleurs, les souris utilisées ne sont pas élevées à cette fin, mais sont des femelles anciennes reproductrices destinées à la réforme.

2554- Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est responsable d'une pandémie touchant 35 millions de personnes qui continue de s'étendre avec plus de 2 millions de nouvelles infections chaque année. Un vaccin préventif serait le moyen le plus efficace de diminuer la propagation du virus et d'éliminer la pandémie tandis qu'un vaccin thérapeutique aiderait à contrôler l'évolution de la maladie et à développer des stratégies d'éradication du virus chez les personnes infectées. Toutefois, après 30 ans de recherches, nous ne disposons pas d'un vaccin capable de prévenir l'infection ni de contrôler la progression de la maladie.

L'objectif de ce projet est d'évaluer la pertinence de nouveaux candidats vaccins composés de nano-gouttelettes synthétiques lipidiques pour délivrer des antigènes VIH de nature peptidique, polypeptidique ou protéique. Notre hypothèse est que ces nouvelles formulations permettront d'améliorer l'intensité et la qualité de la réponse immunitaire induite par les antigènes. Nous aurons recours aux primates non humains (PNH) pour évaluer l'innocuité et l'immunogénicité du meilleur candidat vaccin après une sélection stricte réalisée in vitro et chez le rongeur. En effet, l'étude de la mise en place d'une réponse immune nécessite aujourd'hui d'utiliser un organisme vivant entier et les PNH sont le seul modèle dont le système immunitaire est suffisamment proche de celui de l'homme pour que les réponses vaccinales soient semblables à celles observées chez l'homme. De plus le PNH est le seul modèle reconnu à l'heure actuelle de l'infection par le VIH.

Le projet prévoit au maximum 12 PNH nés et élevés dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : immunisations et prélèvements de sang, de moelle osseuse, de fluides muqueux sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés par paires en hébergements

individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

2555- Nous développons actuellement des vaccins vivants contre les maladies virales animales basés sur l'inoculation de virus qualifiés de DISC (disabled infectious single cycle) produits en laboratoire. Ces virus vaccinaux infectent les cellules d'une façon similaire aux virus "sauvages" (c'est à dire les virus non modifiés par l'Homme) et leur font produire une grande quantité de protéines virales qui déclenchent la réponse immunitaire de l'hôte mais ils sont incapables de se répliquer dans les organismes auxquels ils ont été administrés et demeurent confinés aux quelques cellules initialement infectées.

L'utilisation de notre type de virus issu de la génétique inverse, c'est à dire en construisant un nouveau virus à partir du génome du virus sauvage tout en le rendant incapable de se multiplier, présente un certain nombre d'avantages sur les méthodes vaccinales traditionnelles qui consistent soit à administrer des antigènes vaccinaux inertes (longs à produire), soit à administrer des virus sauvages tués (dangereux à produire) soit à administrer des virus sauvages atténués mais réplicatifs (risque difficile à évaluer de réassortiment avec des virus sauvages).

Surtout, à partir du moment où un virus a été identifié et que son génome est décodé, le délai global de production des premiers virus vaccinaux au laboratoire est extrêmement court (de quelques semaines à quelques mois).

La peste équine est une maladie des équidés endémique en Afrique due à un orbivirus (AHSV) et transmise par des insectes piqueurs du genre Culicoides. AHSV a été à l'origine de foyers dans la péninsule ibérique à la fin des années 1980. La mortalité des chevaux peut atteindre 90% dans les foyers épidémiques. Il existe un vaccin vivant atténué par passages successifs sur des cultures cellulaires qui confère une protection partielle mais qui, parce que vivant, est strictement interdit dans les pays indemnes comme ceux de l'UE.

Dans ce projet nous envisageons d'effectuer un challenge vaccinal contre la peste équine sur des poneys et nous espérons démontrer l'efficacité contre le sérotype 4 de AHSV et l'absence totale de réplication virale de nos virus vaccinaux issus de la génétique inverse.

Pour ceci nous envisageons d'utiliser 10 poneys. 2 serviront de contrôle d'efficacité du virus infectieux, 4 seront vaccinés à J0 avec un virus AHSV4-DISC, 4 seront vaccinés avec un cocktail de virus DISC (sérotypes 1, 4, 6 et 8). 21 jours plus tard les animaux reçoivent une vaccination de rappel et au jour 42 le challenge vaccinal commence (inoculation d'une dose infectieuse de AHSV4 sauvage)..

Pour les animaux non vaccinés, les signes cliniques devraient se manifester à partir d'une dizaine de jours après l'infection virale. La protection des animaux vaccinés devrait leur permettre de ne pas présenter de signes cliniques.

Pour ce genre d'études, le recours à l'animal de l'espèce cible du virus est une étape indispensable de validation même si dans le cas présent, le virus vaccinal a déjà démontré son efficacité sur des souris. Nous utilisons un nombre aussi réduit que possible d'animaux et nous minimisons l'effectif des animaux du lot témoin qui sont ceux pour lesquels nous attendons des manifestations cliniques importantes. Lorsque l'évolution de la maladie indiquera de manière claire qu'un animal est atteint d'une forme grave (5 jours de fièvre supérieure à 40 °C ou apparition de signes respiratoires), l'animal en question sera euthanasié.

2556- Le cancer du sein est un problème majeur de santé publique, responsable de près de 12 000 décès chaque année en France. La mort des patientes est due à la généralisation du cancer, se traduisant par la formation de métastases dans les os, le foie, les poumons et le cerveau. En effet, au cours de la progression tumorale, les cellules cancéreuses acquièrent des capacités de prolifération et de survie accrue, mais aussi des capacités migratoires leur permettant de disséminer dans l'organisme via la circulation.

La transition épithélio-mésenchymateuse, ou EMT, est un mécanisme par lequel les cellules tumorales épithéliales perdent leurs caractéristiques d'adhérence pour acquérir des propriétés migratoires. De nombreux travaux de recherche ont permis de mettre en évidence le rôle central de cet EMT dans la formation des métastases. De plus, d'autres résultats montrent que le rôle de l'EMT est plus large, puisque ce phénomène permet également aux cellules cancéreuses de contourner les mécanismes cellulaires s'opposant normalement à la transformation cancéreuse ainsi que d'acquérir des capacités d'auto-renouvellement et de résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie.

Il apparaît aujourd'hui que l'EMT permettrait également aux cellules cancéreuses d'échapper au système immunitaire, une puissante barrière anti-tumorale. Le cancer comporte en effet une phase non clinique de dormance, de durée variable, pendant laquelle le système immunitaire parvient à contenir la tumeur. L'apparition clinique du cancer correspond à l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire.

Notre projet de recherche a pour objectif de démontrer, de manière novatrice, que l'EMT permet l'acquisition de mécanismes d'échappement au système immunitaire dans un modèle pertinent de cancer du sein.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Le ciblage thérapeutique des cellules tumorales en EMT capables de métastaser est un axe prioritaire de recherche en cancérologie. Les approches d'immunothérapie visant à rétablir la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire représentent également une piste majeure. En proposant de comprendre les mécanismes par lesquels les cellules en EMT échappent au système immunitaire, notre projet pourrait déboucher sur des approches d'immunothérapies innovantes.

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

Seul un modèle in vivo chez l'animal peut permettre d'étudier les interactions complexes entre les cellules tumorales et les différents types de cellules immunitaires et non-immunitaires présentes au sein du stroma tumoral.

Pour cela, nous avons mis en place in vitro des lignées tumorales capables ou non de faire l'EMT et exprimant un antigène tumoral connu et retrouvé chez les patientes. Nous proposons d'étudier in vivo les différents paramètres de la réponse immunitaire les souris, au cours du développement de ces tumeurs capables ou non de faire l'EMT.

Pour chacune des procédures expérimentales, le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et reproductibles. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par des personnels compétents permet de limiter au maximum toute souffrance animale.

Le nombre maximal de souris utilisées dans ce projet est de 710

2557- Définir le rôle des anticorps et de leurs récepteurs l'allergie aux arachides et l'immunothérapie par voie orale.

Bénéfices attendus du projet : Compréhension du rôle des anticorps et de leurs récepteurs dans le cadre d'allergies aux arachides et d'immunothérapies par voie orale. Identification et caractérisation des mécanismes cellulaires impliqués dans les réactions allergiques. Identification de cibles thérapeutiques potentielles. Espèce et nombre approximatif d'animaux utilisés : souris ; 1004 animaux sur 4 ans

Nombre de procédures et leur degré de sévérité : Ce projet comporte deux procédures de classe modérée.

Dommages prévisibles pour les animaux :

Ces protocoles ne semblent pas, a priori, induire de douleur aux animaux, au sens de l'absence de critères visibles de douleur/souffrance (comportement social, attitude corporelle, propreté de l'animal), sauf dans le cas de choc anaphylactiques, dont les dommages sont à évaluer et à l'évaluation de laquelle nous contribuerons.

Pour que notre projet soit un modèle préclinique pertinent et avec le minimum d'inconfort/de souffrance pour les souris de laboratoire, nous nous sommes imposés deux contraintes: i) établissement de modèles permettant de cibler les phénotypes les plus précoces possibles et ii) mise en œuvre d'analyses in vivo avec des fenêtres temporelles les plus courtes possibles.

Justification du recours à l'animal : Se déployant dans des tissus distincts dont les fonctions, la structure et la vascularisation sont uniques, les pathologies et les thérapies objets d'investigations, ne peuvent pas être remplacées par des modèles in vitro: nos procédures expérimentales ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information biologiquement pertinente.

Moyens de s'assurer de l'utilisation du nombre minimum d'animaux : Le recours à des lignées consanguines de souris permet entre autres de réduire le nombre d'animaux par groupe expérimental, et de ne pas prolonger les explorations dès lors que sont initiées et mesurables les conséquences biologiques des interactions entre les anticorps et leurs récepteurs (FcR).

Justifier le choix de l'espèce et du modèle animal.

L'espèce utilisée est la souris de laboratoire. Avant la manipulation qui consiste à « humaniser » les souris de laboratoire, il a été établi que sont communes à ces deux mammifères de nombreuses propriétés des populations de biomolécules et de cellules du système immunitaire inné et du système immunitaire adaptatif. En conséquence, les résultats expérimentaux sont le plus fréquemment transférables aux humains. De plus, il existe un grand nombre de lignées de souris mutantes, knockout et transgéniques, qui permettent des études mécanistiques approfondies. L'utilisation de souris 'humanisées' exprimant les récepteurs humains aux anticorps à la place des récepteurs murins permettra d'assurer que nos résultats expérimentaux sont transférables aux humains.

Mesure prises pour minimiser les atteintes au bien-être des animaux.

Il n'y a pas de douleur ni d'anxiété évidente dans la plupart de nos protocoles (sauf anaphylaxie, à évaluer et à l'évaluation de laquelle nous contribuerons), de par leur durée très courte probablement, ni de dommages durables dans les conditions de la procédure expérimentale puisque la mise à mort survient très tôt après l'initiation de l'expérimentation.

2558- Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est responsable d'une pandémie touchant 35 millions de personnes qui continue de s'étendre avec plus de 2 millions de nouvelles infections chaque année. Un vaccin préventif serait le moyen le plus efficace de diminuer la propagation du virus et d'éliminer la pandémie tandis qu'un vaccin thérapeutique aiderait à contrôler l'évolution de la maladie et à développer des stratégies d'éradication du virus chez les personnes infectées. Toutefois, après 30 ans de recherches, nous ne disposons pas d'un vaccin capable de prévenir l'infection ni de contrôler la progression de la maladie.

L'objectif de ce projet est d'évaluer la pertinence de nouveaux candidats vaccins composés de nano-gouttelettes synthétiques lipidiques pour délivrer des antigènes VIH de nature peptidique, polypeptidique ou protéique. Notre hypothèse est que ces nouvelles formulations permettront d'améliorer l'intensité et la qualité de la réponse immunitaire induite par les antigènes. Nous aurons recours aux primates non humains (PNH) pour évaluer l'innocuité et l'immunogénicité du meilleur candidat vaccin après une sélection stricte réalisée in vitro et chez le rongeur. En effet, l'étude de la mise en place d'une réponse immune nécessite aujourd'hui d'utiliser un organisme vivant entier et les PNH sont le seul modèle dont le système immunitaire est suffisamment proche de celui de l'homme pour que les réponses vaccinales soient semblables à celles observées chez l'homme. De plus le PNH est le seul modèle reconnu à l'heure actuelle de l'infection par le VIH.

Le projet prévoit au maximum 12 PNH nés et élevés dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : immunisations et prélèvements de sang, de moelle osseuse, de fluides

muqueux sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés par paires en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

2559- La recherche et le développement de nouveaux médicaments impliquent plusieurs étapes, depuis la découverte de molécules potentiellement thérapeutiques (« drug discovery ») jusqu'à la mise sur le marché d'un médicament. La première étape consiste en une sélection (« screening ») de molécules d'intérêt, qui devront ensuite être testées *in vitro* sur des cultures cellulaires puis nécessairement *in vivo* chez des animaux vivants avant d'être testées en clinique chez l'Homme. Les tests *in vivo* visent à caractériser les effets et le comportement de molécules candidates après administration chez l'animal.

La cataracte est l'opacification partielle ou totale du cristallin, lentille convergente située à l'intérieur de l'œil. Cette opacification est responsable d'une baisse progressive de la vue, jusqu'à une cécité. La cataracte est la première cause de cécité dans les pays en voie de développement : elle explique près de 40 % des 37 millions d'aveugles dans le monde. Il s'agit donc d'un problème de santé publique majeur dans ces pays. Aux États-Unis, près de 20 millions d'adultes de plus de 40 ans en sont atteints.

Aujourd'hui, le seul traitement efficace de la cataracte est la chirurgie. L'intervention consiste à enlever le cristallin opaque, et le remplacer par un cristallin artificiel (implant intra-oculaire) qui prend place dans l'« enveloppe » du cristallin (appelée capsule) laissée partiellement en place pendant l'intervention (extraction extra-capsulaire). Cette intervention se fait classiquement sous anesthésie locale. L'intervention dure une dizaine de minutes, est indolore, et la vue revient très rapidement, sous réserve de la normalité des autres structures oculaires. Cependant, la chirurgie peut être difficile à généraliser à un grand nombre de patients dans les pays en voie de développement dans lesquels des millions de personnes sont atteintes, ce qui pose des problèmes d'organisation logistique de ces chirurgies à grande échelle. En conséquence, l'industrie pharmaceutique s'oriente dans la recherche de nouvelles thérapeutiques anti-cataracte non chirurgicales administrées par voies oculaires (collyre, injections intra-oculaires) principalement, mais aussi parentérales (injections intramusculaires ou sous cutanées) ou entérales (voie orale). Ces techniques d'administrations permettent le traitement des patients chez le médecin spécialisé ou directement par le patient lui même, ce qui augmente la couverture médicale des populations.

Il est donc important d'avoir un modèle prédictif de cataracte induite chez l'animal. Afin d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques, il est indispensable de tester ces molécules dans ce modèle pour plusieurs raisons :

Il n'existe pas de modèle *in vitro* de cataracte pouvant remplacer complètement l'œil en tant qu'organe vivant.

Il existe cependant des modèles *ex vivo* de cataracte (à partir de cristallins issus d'animaux présentant une cataracte spontanément ou induite) qui permettent d'effectuer un premier criblage d'efficacité de molécules, mais cette efficacité doit ensuite être confirmée chez l'animal.

L'efficacité ne pouvant être testée *in vitro*, des premières preuves d'efficacité *in vivo* doivent être apportées avant de passer au stade clinique de développement de ces molécules (tests cliniques chez l'homme)

La cataracte sera induite chimiquement par injection de selenite de sodium. La cataracte des animaux sera ensuite suivie par imagerie ophthalmique.

Ce projet s'effectuera chez le rat et le lapin. Sur une période de 5 ans, il est prévu d'utiliser 200 rats et 200 lapins pour l'évaluation de l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques.

La règle des 3Rs sera appliquée à ce projet selon les modalités suivantes :

- Remplacement des animaux d'expérience : l'utilisation des animaux ne se fera qu'en dernier recours après des tests préalables de criblage et d'efficacité *ex vivo*.
- Réduction des animaux : le design de l'étude étant un plan d'expérience contrôlé, le nombre d'animaux est réduit à son minimum pour chaque groupe.
- Raffinement : Evaluation régulière de points limites (poids, état d'hydratation, comportement de l'animal, état de l'œil, évaluation de la cataracte par imagerie), enrichissement du milieu dans les cages.

2560- Pour maintenir une homéostasie glucidique et énergétique, l'organisme est capable de produire du glucose par le foie, le rein, et l'intestin. L'induction de la production intestinale de glucose exerce un rôle bénéfique sur le métabolisme glucidique et énergétique car le glucose produit dans la veine porte envoie un signal nerveux au cerveau (" signal glucose portal "), qui se traduit par une induction de la satiété, une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une diminution de la production hépatique de glucose. Ce signal transite par les nerfs vagues et spinaux et active des noyaux du cerveau impliqués dans la régulation énergétique (hypothalamus) et dans la régulation du statut émotionnel (hypothalamus, amygdale et noyau accumbens). De plus, la production intestinale de glucose participe également à la régulation du statut émotionnel, car son absence se traduit par le développement de phénotypes anxiodépressifs légers chez la souris et une dérégulation de l'axe hypothalamique-hypophysaireadrénalien (HPA). Une dérégulation de l'axe HPA a été suggérée comme mécanisme commun pouvant expliquer le lien bidirectionnel existant entre diabète de type 2 et dépression.

L'objectif de ce projet est de démontrer qu'un protocole de stress chronique imprédictible modéré aggrave les phénotypes anxio-dépressifs chez la souris dépourvue de production intestinale de glucose et altère possiblement la réponse aux antidépresseurs. Cette étude doit être réalisée chez l'animal pour prendre en compte l'intégration du signal glucose portal par le cerveau et l'effet de l'antidépresseur.

Des souris non transgéniques et des souris transgéniques, dont la fonction de production de glucose par l'intestin a été invalidée, seront soumises à un stress chronique imprédictible modéré pendant 6 semaines et traitées ou non avec un antidépresseur. Le niveau d'anxiété et de stress sera mesuré ensuite par différents tests comportementaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et tout animal présentant un signe de souffrance (supérieur à l'état anxio-dépressif attendu) ou une perte de poids sera mis à mort immédiatement. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque groupe contiendra le nombre minimum de souris (12 souris par groupe) indispensable à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Un nombre total de 48 souris sera nécessaire pour cette étude réalisée sur une période de 6 mois maximum.

2561- Ce projet vise à établir une preuve de concept dans une thématique de vieillissement vasculaire. Nous avons dans un précédent projet construit un modèle de souris où nous avons créé la délétion au niveau de l'endothélium du vaisseau d'une protéine impliquée dans le stress oxydant et qui joue un rôle dans le métabolisme des glucides et lipides. Nous avons observé que cette délétion induisait une protection contre les conséquences vasculaires du vieillissement métabolique et artériel. Dans ce projet, nous proposons un traitement protecteur de la survenue de complications cardiovasculaires liées au vieillissement artériel et nous essaierons de protéger le réseau artériel de l'installation du vieillissement métabolique et artériel, en injectant des nanoparticules porteuses de ARN inhibiteurs ciblant cette protéine tous les 15 jours environ par voie intracardiaque sous guidage échographique. Les souris seront suivies de façon longitudinale grâce à l'échocardiographie doppler, tout au long de l'étude et ce dès le début du vieillissement métabolique et artériel induit par un régime. Ces souris seront leur propre témoin afin de réduire le nombre d'animaux. Des études sur la stabilité et de toxicité du liposome ont été effectuées in vitro sur cellules. Le ciblage de l'endothélium par le liposome porteur des ARN inhibiteurs et la demi-vie de ce dernier a ensuite été validé dans une étude préalable. Cette étude portera sur 80 souris et nécessite l'utilisation d'animaux vivants puisque l'étude des conséquences métaboliques du vieillissement et son retentissement sur le vaisseau et sa fonctionnalité, avec ou sans traitement, ne peut s'envisager que dans un organisme entier. Une échelle de suivi comportemental avec un score permettra une surveillance de l'animal et ce dans un souci de raffinement de l'étude. Cette preuve de concept permettra d'envisager une approche thérapeutique avec une application clinique visant à protéger les vaisseaux du vieillissement métabolique et donc de diminuer la survenue de complications cardiovasculaires liées à l'âge.

2562- Le dopage dans le milieu sportif représente un vrai problème de santé publique, les athlètes étant prêts à utiliser des produits pour améliorer leurs performances sans se soucier des effets secondaires. Le développement d'un marché noir via internet permet de se procurer des médicaments retirés du marché, ou toujours au stade du développement clinique, ou des copies produites par des laboratoires clandestins et soumet les sportifs à un risque sanitaire important. L'un des seuls moyens de dissuasion consiste à développer des méthodes d'identification des molécules à potentiels dopants pour mettre en évidence leur utilisation par les sportifs et limiter ainsi leur utilisation.

Parmi les substances interdites par l'agence mondiale anti-dopage (AMA) se trouvent les substituts d'hémoglobine, qui permettent un meilleur apport d'oxygène aux muscles. Les recherches récentes dans ce domaine ont montré les propriétés intéressantes de transport d'oxygène des hémoglobines géantes extracellulaires du ver arénicole. Leur utilisation médicale est en cours d'investigation mais leur innocuité chez l'homme n'a pas encore été testée. Elles pourraient toutefois déjà intéresser les athlètes en vue de dopage. Une première étape réalisée dans notre laboratoire a permis de développer une méthode d'identification de ces hémoglobines extracellulaires géantes dans du plasma in vitro.

L'objectif de ce projet est maintenant de valider une méthode de dépistage in vivo. Le produit (hémoglobine géante extracellulaire de ver arénicole purifiée) qui sera testé n'étant pas encore autorisé chez l'homme, son utilisation ne peut se faire actuellement que chez l'animal. Des premières analyses scientifiques ont été faites chez le rongeur et le produit ne montre pas d'effets secondaires ou toxiques aux doses efficaces. Le projet vise à vérifier la validité de la méthode de détection des hémoglobines géantes extracellulaires en prenant en compte les paramètres de circulation, métabolisation et élimination du composé ce qui n'est pas possible in vitro. Le projet sera réalisé sur 24 souris qui recevront différentes doses du produit et sur lesquelles des prélèvements sanguins seront réalisés jusqu'à 96h post-injection. Quatre groupes de 6 souris seront suffisants pour conclure sur l'efficacité et la reproductibilité de la méthode de détection d'hémoglobine extracellulaire chez un mammifère semblable à l'homme et sur la sensibilité de la méthode in vivo (dose détectable?, pendant combien de temps?). La méthode de détection, si elle fonctionne in vivo, pourra ainsi ensuite être réalisée sur du plasma provenant de sportifs et utilisée par les laboratoires anti-dopage. Les souris seront hébergées par 3 dans des conditions standard, et leurs cages seront enrichies. Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie. Les souris seront surveillées quotidiennement.

2563- L'obésité et la consommation chronique d'alcool constituent les premières causes d'hépatopathie (maladie du foie) en France et sont reconnues comme d'importants problèmes de santé publique. De plus, la proportion de patients obèses avec une consommation chronique d'alcool augmente dangereusement et pourrait développer plus rapidement des complications hépatiques sévères. Il est donc urgent de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ces atteintes hépatiques (inflammation) et dans leur évolution vers des maladies gravissimes du foie (cirrhose et cancer du foie) afin de proposer des cibles thérapeutiques.

Il a été montré que l'altération des dialogues entre l'intestin et le foie et entre le tissu adipeux et le foie sont une des causes de l'apparition et de l'évolution de ces maladies hépatiques.

Notre équipe de recherche s'intéresse à la protéine ostéopontine (OPN, cytokine, chimiokine) qui est exprimée dans les trois organes (tissu adipeux, intestin et foie) et dont des données de littérature montrent clairement le rôle dans la régulation de l'inflammation et de la fibrose (dont le dernier stade est la cirrhose). Des études chez des souris exprimant ou non

l'ostéopontine et soumises à des régimes alimentaires spécifiques (riches en graisses et/ou en alcool) permettront de mieux comprendre son rôle dans les dysfonctionnements entre tissu adipeux, intestin et foie connus pour favoriser le développement des maladies hépatiques. Nous nous concentrerons sur les rôles de l'OPN dans certains types cellulaires qui n'ont pas encore été étudiés dans ce contexte. Ces études proposées seront réalisées chez la souris car les approches sur cellules isolées ne permettent pas de mimer la physiopathologie de ces maladies retrouvées chez l'homme. Il est à noter que les souris déficientes pour l'OPN ne présentent aucun phénotype dommageable. De plus, ces études seront réalisées dans le souci d'utiliser un nombre minimum d'animaux (1230 animaux pour toutes les procédures) et leur bien être sera scrupuleusement pris en compte dans toutes les procédures.

2564- Des patients atteints de pathologies graves et rares telles que les déficits immunitaires primitifs ("bébé bulle") ou acquis et les hémophilies (déficiences en facteur de la coagulation), ainsi que les patients en soins intensifs, sont traités avec des médicaments purifiés à partir du plasma humain ou des protéines recombinantes. Comme tout médicament, ces produits (immunoglobulines polyvalentes, facteurs de coagulation et albumine) peuvent présenter certains effets adverses. Un de ces effets est l'excès de coagulation, voire une thrombose.

L'objectif de ce projet est d'évaluer *in vivo* dans un modèle de lagomorphe, l'activité thrombogène de médicaments. Cette évaluation s'effectue pour les produits en développement avant leurs mises sur le marché ou, pour les médicaments commercialisés, dans le cadre du traitement d'écarts de production susceptibles d'impacter la sécurité du lot. Les essais sont souvent réalisés dans un cadre réglementaire et les résultats participent à la décision de libérer un lot sur le marché. Aucune autre méthode de remplacement *in vitro* reconnue par les autorités n'existe actuellement.

Cette méthode consiste à administrer par voie intraveineuse le produit chez l'animal anesthésié et à observer la présence ou l'absence de thrombus au niveau des veines jugulaires (suivant un système de cotation) afin de déterminer une dose thrombogène.

Une méthode de ce type requiert 8 animaux. Ce nombre a été déterminé en analysant les données historiques obtenues au sein de notre laboratoire sur plus de 25 ans. Sur 3 ans, nous utiliserons 324 animaux nés et élevés dans des établissements agréés. Toute l'expérimentation est effectuée sous anesthésie générale afin d'éviter les souffrances de l'animal. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux permettent de garantir leur bien-être. Dans le cas où des effets indésirables interviendraient, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de procéder à une euthanasie.

2565- Le carcinome à cellule rénale (CCR) est le 13<sup>ème</sup> type de cancer en terme d'incidence dans le monde, avec 338 000 nouveaux cas diagnostiqués en 2012. L'âge moyen au diagnostic est de 62 ans avec un sex ratio de 2 hommes pour 1 femme. En France, le cancer du rein représente environ 3 % de l'ensemble des cancers de l'adulte, au 7<sup>ème</sup> rang des cancers, avec 11 573 nouveaux cas en 2012. Son incidence est en forte augmentation, de l'ordre de 3% / an. Avec 3 957 décès annuels, ce cancer se situe au 9<sup>ème</sup> rang des décès par cancer en France.

Le CCR est asymptomatique d'où un diagnostic souvent tardif et difficile. 30% des CCR sont métastatiques au moment du diagnostic, avec une survie à 5 ans de 10%. Le traitement de référence des cancers localisés est la néphrectomie. Le risque d'apparition de métastases après chirurgie a été évalué entre 30 et 40 %. Les formes métastatiques ont longtemps eu un mauvais pronostic en raison de l'absence d'efficacité des thérapies habituellement utilisées en oncologie. Le traitement de référence du CCR métastatique a longtemps été l'immunothérapie, efficace seulement chez 15% des patients, avec une survie à 5 ans d'à peine 20%. Les progrès de la biologie moléculaire ont permis de mieux appréhender les voies signalétiques impliquées dans la carcinogenèse du CCR et ont permis l'avènement des thérapies ciblées. Environ 30% des patients répondent à ces thérapies. Cependant, leur efficacité est limitée par des phénomènes de résistance dont les mécanismes restent aujourd'hui encore totalement inconnus. Divers mécanismes de résistance sont documentés mais ne sont pas ceux impliqués dans le CCR. La résistance induite du CCR comme sa résistance intrinsèque pourraient impliquer des voies de signalisation activées paradoxalement par les thérapies.

L'objectif de ce projet est d'étudier les voies de résistance aux thérapies dans le cancer du rein avec comme enjeu de retrouver une sensibilité au traitement. Ce projet sera découpé en trois axes :

AXE 1 : il s'agira d'une étude pilote destinée à mesurer la sensibilité aux chimiothérapies (Cisplatine / 5-FU / Vinblastine) et aux thérapies ciblées (Sunitinib / Sorafenib / Everolimus) sur un modèle *in vivo* (xénogreffes issues de lignées cellulaires) puis d'identifier les voies de signalisation spécifiques mises en jeu par les thérapies.

AXE 2 : Selon les voies/marqueurs identifiés à l'axe 1, nous réaliserons un traitement associant la thérapie et l'inhibiteur de la voie et nous étudierons comment cette association module l'effet des thérapies.

AXE 3 : Enfin, il s'agira de cribler une banque de modèles précliniques de CCR humain avec ces mêmes combinaisons, et donc d'être au plus près de la clinique. Le choix se portera sur 3 modèles résistants et 3 modèles sensibles préalablement identifiés. Pour les axes 2 et 3, priorité sera donnée à l'identification des mécanismes de résistance au Sunitinib.

D'un point de vue pratique, ce projet utilisera des souris immunodéficientes (Swiss nude mâles) âgées de 6 à 8 semaines qui seront xénogreffées en sous-cutané (dans la région interscapulaire) par des lignées cancéreuses de CCR (AXES 1 et 2) ou des échantillons tumoraux de CCR humain directement obtenus de patients (AXE 3). A la fin de chaque étude, les souris seront sacrifiées par dislocation cervicale après sédation à l'isoflurane et les tumeurs prélevées pour les analyses ultérieures.

Pour ce projet, la règle des 3R sera respectée de la façon suivante :

- Réduction: 550 souris seront utilisées sur les 5 ans de ce projet réparties de la façon suivante : 40, 120 et 390 souris respectivement pour les axes 1, 2 et 3. Ce nombre d'animaux est un nombre minimal pour la validation statistique des

différentes étapes de l'étude et tient compte du taux de prise de greffe de 90%. Un même diluent sera utilisé permettant aussi de réduire le nombre de groupes pour les études.

- Raffinement: Ce projet sera réalisé au sein d'une animalerie agréée et par conséquent les animaux seront manipulés par du personnel habilité et soucieux de leur bien-être. En l'occurrence, le raffinement sera assuré par un enrichissement des cages pour le confort des animaux. Les souris seront nourries ad libitum et hébergées en groupe; elles ne seront séparées qu'en cas de comportement agressif avec induction de plaies. Nous diminuerons la douleur et l'angoisse liées à l'acte chirurgical (xénogreffe en sous-cutané) en opérant sous anesthésie (isoflurane) et en appliquant une analgésie locale (lidocaïne) au moment du réveil. Pour finir, les animaux seront surveillés pendant toute la phase de réveil. Le développement tumoral en sous-cutané en lui-même n'est pas douloureux pour les animaux. Le suivi et la surveillance de nos souris montrent d'ailleurs un comportement normal dès le réveil avec prise alimentaire normale les jours suivants, sans perte de poids et sans modification de la température corporelle. Un traitement anti-inflammatoire semble de même inutile, et de toute façon, ne pourrait pas être utilisé dans ce protocole puisqu'il interférerait avec l'évolution même de la pathologie.

- Remplacement: Le cancer du rein se caractérise par une grande variabilité cytogénétique. La réalisation d'études fiables pour une validation préclinique d'un nouveau traitement in vivo passe donc par l'utilisation d'un panel étendu de modèles porteurs de tumeurs aux caractéristiques moléculaires variables et nécessite l'utilisation de modèles animaux reproduisant fidèlement les caractéristiques des tumeurs humaines. Par ailleurs, des tests de densité cellulaire, de prolifération et de mort cellulaire ont préalablement été réalisés in vitro et ont montré que les lignées de cancer du rein étaient sensibles aux thérapies. De ce fait, les modèles expérimentaux in vitro pourraient s'avérer artéfactuels et sont clairement inadaptés à ce projet. Par conséquent, aucune méthode de remplacement n'est envisageable.

Ce projet se base sur une approche originale qui repose sur des modèles précliniques issus de tumeurs humaines dont nous sommes seuls dépositaires. En cela, ce projet n'a donc aucunement été réalisé auparavant.

2566- La vitamine B12 est une vitamine essentielle pour l'activité cérébrale car elle permet la synthèse de neuromédiateurs. Elle est également indispensable pour la biosynthèse de la gaine de myéline qui protège les nerfs et optimise leur fonctionnement et intervient aussi dans la production des globules rouges.

La vitamine B12 est convertie dans sa forme active (méthylcobalamine) par la protéine Méthionine synthase (MTR), une enzyme qui permet la transformation d'homocystéine en méthionine. Une déficience en MTR aura 2 conséquences immédiates:

Une augmentation de l'homocystéine (un facteur de risque associé à des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives) et une diminution de la méthionine, indispensable aux processus de régulation de l'expression des gènes par méthylation, l'activation des hormones, la production de certains phospholipides, etc.

Nous souhaitons utiliser des modèles de souris transgéniques dépourvues de Méthionine synthase dans le but d'étudier les mécanismes physiopathologiques en lien avec une déficience en vitamine B12 (maladies génétiques, déséquilibres nutritionnels). Les animaux seront étudiés à plusieurs stades du développement embryo-fœtal, durant la croissance et dans des périodes de vieillissement. En particulier, l'étude portera sur les propriétés des cellules nerveuses issues de différentes régions du système nerveux central. D'autres organes seront étudiés selon le même schéma temporel : le foie, le cœur et l'intestin. Une étude comportementale sera menée dans les différents groupes d'animaux à l'aide de tests tels que le labyrinthe aquatique (test de mémorisation) ou l'échelle horizontale (test de coordination locomotrice) afin de corrélérer les données biochimiques aux troubles neurologiques qui pourraient découler de cette déficience.

Une étude métabolique et physiologique dans les différents organes cibles de ces animaux sera menée et la perspective à plus long terme, en fonction des résultats obtenus, sera d'étudier les aspects trans-générationnels et de soumettre ces souris à différents régimes nutritionnels, carencés ou supplémentés en vitamine B9 et B12.

Les conditions de stabulation, en accord avec la réglementation en vigueur, viseront l'optimisation du bien-être des animaux en accord avec la règle des 3 R.

1. Remplacement : Il n'existe aucune alternative d'approche in vitro car notre étude porte sur les développement embryo-fœtal, la croissance et le vieillissement de la souris transgénique déficiente pour le gène de la Méthionine synthase. Les organes d'intérêt sont le cerveau, le cœur, le foie et l'intestin.

2. Réduction : Ce protocole nécessite plusieurs groupes d'étude en fonction de l'organe cible (x4), de la méthode d'inactivation (x2) et du sexe de l'animal. Ainsi, 12 souris par sexe, par génotype, par organe cible, par méthode d'inactivation du gène et par tranche d'âge seront nécessaires pour atteindre un nombre suffisant d'animaux durant cette étude pour obtenir une puissance statistique satisfaisante, soit 1920 souris pour un projet qui va durer 5 ans.

3. Raffinement : Toutes les procédures expérimentales (régime spécial, injection d'hormones et tests neurocomportementaux) auront lieu dans l'animalerie, dans un environnement sécurisant pour l'animal. Les injections intra-péritonéales d'hormones se font sous anesthésie générale de l'animal. En fin de protocole les animaux seront mis à mort et des prélèvements seront effectués (sang, cerveau, foie, cœur, colon, moelle épinière et nerfs sciatiques) pour permettre des analyses biochimiques et histologiques.

2567- L'objectif de ce projet est de visualiser en imagerie TEP/TDMX le passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE) de 5 peptides d'intérêt radiomarqués chez la souris MRL/lpr, modèle murin du lupus. Il s'agit d'une maladie auto-immune complexe et au diagnostic difficile. Inflammatoire, chronique, c'est une affection qui touche majoritairement les femmes et dont les symptômes et leur gravité varient beaucoup d'une personne à l'autre. Les atteintes peuvent être dermatologiques, rhumatologiques, rénales, mais également cérébrales (chez au moins 75% des patients). Cette forme délicate de la maladie,

encore très mal connue, constitue le lupus neuropsychiatrique ou neurolupus. Des anomalies structurales au niveau cérébral sont observées chez les patients et pourraient être à l'origine des perturbations cognitives observées. Deux (P140 et 88-99 H4) des 5 peptides de l'étude ont déjà été testés dans ce modèle animal et l'un d'entre eux (P140) est en essai clinique avancé chez des patients lupiques. Les 3 derniers sont en cours de développement.

Nous désirons poursuivre ces recherches en complétant les études précédentes déjà réalisées sur ce modèle, en regardant si les 5 peptides peuvent passer la BHE par le biais de ruptures de l'intégrité de cette membrane et s'accumuler dans le cerveau à différents stades de la pathologie. Cette maladie étant évolutive, nous étudierons les effets des peptides à 2 âges différents des souris, à savoir 11 et 17 semaines. Nous tenterons de localiser cette accumulation grâce à l'utilisation de l'imagerie fonctionnelle nucléaire TEP couplée à l'imagerie anatomique TDMX.

Chaque peptide sera testé sur les souris MRL/lpr et leur contrôle MRL ++ ainsi que sur un groupe témoin de souris saines BALB/c à raison de 10 souris par bras et à 2 âges différents, ce qui fait un total de 300 souris sur 5 ans.

Afin de respecter au mieux la règle des 3R, nous allons:

-Réduire: Nous n'utiliserons que 10 animaux par bras, 10 étant le minimum pour pouvoir faire des études statistiques dans ce modèle qui présente une grande variabilité inter-individuelle. De plus, l'imagerie nous permet de suivre un même animal plusieurs fois, ce qui réduit le nombre d'animaux à inclure.

-Raffiner: Enrichir l'environnement des animaux avec des tubes en plastique, former des groupes sociaux (5 animaux par cages).

-Remplacement : nous sommes obligés d'utiliser des souris car l'objectif du travail est de visualiser les zones de ciblage et localisation cérébrales de peptides utilisés dans le traitement de cette pathologie.

Enfin, nous utiliserons un test statistique non paramétrique, le test de Mann et Whitney, adéquat pour les petits effectifs.

2568- L'insulinome est une tumeur neuroendocrine pancréatique qui est caractérisée par la production et la sécrétion inappropriée et non contrôlée d'insuline entraînant des accidents hypoglycémiques. Son incidence est extrêmement faible (un à deux par million d'habitants). C'est la plus fréquente des tumeurs endocrines du pancréas. Elle survient de façon identique dans les deux sexes et le diagnostic est le plus souvent porté vers l'âge de 50 ans. La tumeur est unique et bénigne dans plus de 90 % des cas; cependant elle peut exposer à des accidents hypoglycémiques graves.

Son diagnostic en imagerie médicale peut se révéler difficile car c'est le plus souvent une tumeur de petite taille (90% font moins de 2 cm et 30% moins de 1 cm), ce qui pose des problèmes de détection avec les moyens diagnostiques actuels.

Jusqu'à présent, on ne dispose pas d'outil d'imagerie moléculaire très performant dans la localisation des insulinomes. La scintigraphie et la tomographie par émission de positons (TEP) avec des analogues de la somatostatine marqués montrent une sensibilité modérée, principalement en raison d'une expression tumorale variable et souvent trop faible des récepteurs de la somatostatine. La TEP à la 18F-FDOPA a été proposée pour l'imagerie de l'insulinome chez l'adulte avec des résultats discordants. La principale limitation de cette technique est liée à l'absorption intense de ce marqueur par le pancréas et donc un rapport de fixation tumeur/tissu sain non optimal. L'administration de la carbidopa (CD), un inhibiteur compétitif de la dopadécarboxylase, administré avant un examen TEP réduit la fixation pancréatique et améliore donc le signal dans la tumeur. Malgré l'utilité clinique de cette association dans les explorations TEP des tumeurs neuro-endocrines, le mécanisme et la cinétique d'action de la carbidopa sur la fixation de la 18F-FDOPA sont partiellement connus et les effets sur les cellules tumorales restent controversés. Une meilleure évaluation des effets inhibiteurs de la carbidopa sur la tumeur permettrait de confirmer cet effet bénéfique. En conséquence, l'objectif principal de ce travail sera d'évaluer l'effet de la prémédication par CD sur la fixation tumorale de la 18F-FDOPA dans un modèle animal d'insulinome analysé in vivo par imagerie  $\mu$ TEP/ $\mu$ TDMX. L'imagerie TDMX (rayon X) est une image anatomique qui permet de mieux localiser la tumeur visualisée en imagerie TEP (fusion des 2 modalités d'images obtenues). Ainsi notre travail intègre une dimension translationnelle dont les résultats pourront directement influencer les pratiques cliniques actuelles concernant l'exploration fonctionnelle des insulinomes par TEP à la 18F-FDOPA chez l'adulte.

L'objectif secondaire est l'utilisation d'autres traceurs pour compléter cette étude ciblant le transporteur des acides aminés, le métabolisme du glucose, et la prolifération cellulaire.

Ces traceurs seront finalement tous testés chez le même animal lors d'une étude longitudinale dans un modèle murin d'insulinome chez la souris immunodéficiente. Le modèle utilisé est obtenu en injectant une suspension de cellules RIN-5F (cellules d'îlots de Langherans de rat) en sous cutané.

En fin de protocole, les tumeurs seront prélevées post mortem pour des études métabolomiques (étude des métabolites (sucres,acides amines..) présents dans les cellules et les tissus par Résonance Magnétique Nucléaire)

La règle des 3 R sera respectée. R : raffinement : les animaux seront placés à plusieurs par cages avec des éléments d'enrichissements afin d'améliorer leur bien être. Les examens d'imagerie et les injections sont réalisés sous anesthésie générale. R : réduction : le nombre d'animaux dans cette étude est de 20 ce qui est le minimum pour pouvoir réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus le test utilisé est le t-test de Student entre les 2 groupes FDOPA(carbidopa ou non). R remplacement : cette étude portant sur le suivi du développement tumoral par imagerie fonctionnelle in vivo elle ne peut être réalisée que chez l'animal vivant

2569- La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après l'étude multicentrique

STAR\*D, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement. En outre, les patients rétablis à la suite d'un premier épisode dépressif présentent un risque de récurrence dans les 6 mois évalué à 50% en cas d'arrêt du traitement et il a été montré qu'en l'absence de traitement 15% des patients succombent à la suite d'un suicide et qu'entre 60% et 80% des suicides (entre 10000 et 15000 par an en France) sont le fait d'individus fortement dépressifs. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements et la compréhension des mécanismes physiopathogéniques et étiopathologiques sous-jacents. Certains de ces mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant l'analyse d'échantillons cérébraux par exemple. Ces méthodologies ne peuvent être réalisées qu'au travers d'une approche préclinique.

Une restriction pour les recherches précliniques qui veulent étudier le mécanisme d'action des antidépresseurs (ADs) chez l'animal est qu'elles sont surtout réalisées chez des animaux normaux, qui ne sont pas dans un état « dépressif-like » (similaire à un état dépressif ou « depressed-like state »). Or les traitements aux antidépresseurs induisent très peu d'effets chez l'homme sain. Ces études ont été une première étape pour définir le spectre des actions possibles des ADs mais demeurent limitées pour déterminer les effets qui sont réellement nécessaires à l'action thérapeutique. C'est la raison pour laquelle nos travaux se basent sur l'utilisation du modèle du stress chronique léger imprédictible (SCI).

Le but de cette expérience est de comparer les altérations sanguines et cérébrales associées à la résistance à deux antidépresseurs de référence : la fluoxétine et l'escitalopram. Pour cette expérience, 72 souris réparties en 4 lots sont requises.

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

Raffinement : les stress appliqués aux animaux peuvent être qualifiés de léger à moyen, sans stress physique de type nociceptif. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanons plexiglass et cartons, tubes)..

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chronique chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire in vitro n'est disponible. Les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=12-24 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

2570- Les modèles animaux permettent l'étude des effets positifs et négatifs des drogues anticancéreuses à l'échelle de l'organisme. Ces études précliniques sur l'animal permettent la validation de thérapies plus efficaces pouvant être envisagées pour le traitement des patients humains atteints de pathologies cancéreuses. De nos jours, de nombreux patients en rechute après traitement par chimiothérapies conventionnelles développent des résistances à ces traitements. Dans le cadre de ce projet, nous visons à établir et stabiliser un panel large de différents cancers humains chez la souris afin de créer des modèles de résistance. Cela nous permettra de tester de nouvelles molécules innovantes potentiellement efficaces en cas de résistance aux traitements.

Retombées attendues : Mise au point de nouveaux traitements afin de pallier au phénomène de résistance dans les cancers du sang et d'autres types de cancer.

Type d'espèces et nombres d'animaux : cette étude sera réalisée sur souris immunodéprimée modèle Scid CD17 avec un effectif total prévu de 10 000 souris (2000/an sur 5 ans).

Prise en compte des 3 R :

a) remplacement : des études préliminaires ont montré que le développement de cellules résistantes aux chimiothérapies in vitro ne sont pas forcément résistantes quand elles sont injectées chez la souris et soumis au traitement. Cela nous oblige à réaliser dans l'ensemble le développement du modèle chez la souris

b) réduction : la mise au point du modèle sera faite sur le nombre minimal de souris nécessaire et la confirmation des résultats sera réalisée sur un nombre minimal d'animaux statistiquement significatif

c) raffinement : Afin de respecter le bien-être animal, les souris sont dans des cages avec un milieu enrichi avec du coton, des tunnels ou des roues.

Prise en compte de la souffrance de l'animal : toutes les précautions nécessaires seront prises pour détecter et minimiser la souffrance des animaux dans le cadre de ce projet.

2571- L'infarctus du myocarde est une des premières causes de décès dans le monde. Sa prise en charge consiste en la reperfusion des artères obstruées. Une reperfusion précoce permet de diminuer la taille de l'infarctus et augmente considérablement la survie des patients atteints. Cependant, cette phase de reperfusion est elle-même à l'origine de lésions délétères, dites lésions de reperfusion. Les stratégies de cardioprotection visent à limiter la formation de ces lésions additionnelles pour diminuer de façon encore plus importante la taille de l'infarctus.

Notre équipe s'intéresse particulièrement à l'utilisation de certains antithrombotiques au moment de la reperfusion. En effet, un des mécanismes mis en jeu dans la formation des lésions de reperfusion est l'activation de la coagulation. La formation de caillots est également en lien avec des phénomènes inflammatoires par le biais d'enzymes impliquées dans la cascade de la coagulation (sérines protéases), capables d'activer des récepteurs générant des effets pro-inflammatoires. Ces liens entre inflammation et coagulation jouent un rôle important dans la formation des lésions de reperfusion. Ainsi, l'inhibition des

sérines-protéases de la coagulation semble être une stratégie pertinente pour limiter les effets néfastes de la reperfusion. Le fondaparinux et le rivaroxaban sont deux molécules anticoagulantes, inhibant une sérine protéase de la coagulation, le facteur Xa. Le dabigatran est un inhibiteur direct de la thrombine.

Notre équipe a déjà montré que le fondaparinux possédait un effet cardioprotecteur dans l'ischémie-reperfusion myocardique chez le rat et que cet effet était en lien avec l'activation précoce d'une voie de survie cellulaire (la voie SAFE). Nous souhaitons confirmer l'effet cardioprotecteur du fondaparinux chez la souris, avec un modèle d'ischémie-reperfusion myocardique comportant une phase de reperfusion plus prolongée. A l'aide de ce même modèle nous souhaitons étudier si le rivaroxaban et le dabigatran possèdent également un effet cardioprotecteur et en préciser le mécanisme. Nous voulons également préciser le mécanisme à l'origine de l'effet cardioprotecteur des anticoagulants, en étudiant s'ils ont un effet anti-inflammatoire et/ou protecteur de l'endothélium.

L'expérimentation animale est indispensable pour étudier les lésions d'ischémie-reperfusion myocardique, du fait de l'importance de la circulation sanguine dans les différents mécanismes impliqués. Seules les expériences indispensables seront réalisées. Il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience. Les prélèvements d'organes seront optimisés afin de ne pas augmenter le nombre d'animaux nécessaires. Tous les animaux bénéficieront d'une analgésie et d'une anesthésie au cours des procédures chirurgicales, ainsi que d'une analgésie dans les suites opératoires.

Les animaux utilisés seront des souris C57BL/6, le nombre d'animaux requis pour ce projet est de 275.

2572- La cicatrisation cutanée est un phénomène complexe au cours duquel des événements dermiques et épidermiques sont étroitement impliqués. Elle n'est pas, comme on l'a longtemps cru, un simple processus linéaire au cours duquel des facteurs de croissance sont synthétisés pour activer la prolifération et la migration cellulaires. Il s'agit d'un processus complexe qui contribue à restaurer la qualité fonctionnelle de la peau dans un organisme sain.

Nous avons montré que des cellules (gamma/delta T) du système immunitaire inné peuvent aider dans la cicatrisation de la peau incluant la régénération de nouveaux follicules pileux après lésion. Ce lien inattendu entre le système immunitaire et la régénération du système pileux permet d'imaginer de nouveaux moyens de régénération cellulaire pour les grands brûlés, de lutte contre le vieillissement et contre le cancer ou contre les pertes des cheveux après chimiothérapie.

Dans la peau se trouvent des cellules immunitaires qui jouent un rôle de défense contre les infections, mais aussi de réparation lors de blessures accidentelles. Parmi celles-ci, les macrophages, cellules du système immunitaire inné, sont connus pour « ingérer » des pathogènes comme les bactéries, en les phagocytant avec production de cytokines et facteurs de croissance en faveur de la régénération des tissus.

A l'état normal la cicatrisation mène à une réparation fibrotique (cicatrice) sans nouveaux follicules pileux. Tenant compte de cette particularité, nous avons créé un nouveau modèle original dans lequel le processus de cicatrisation permet la régénération de peau non fibrotique incluant la genèse de nouveaux follicules pileux. Ce modèle sera utilisé pour approfondir les connaissances sur le système immunitaire dans les processus de réparation cellulaire de la peau, lors de la régénération des follicules pileux en présence d'une protéine impliquée dans ces processus : la protéine Wnt. Cette étude permettra d'accumuler des informations essentielles pour les études de fibrose dans la réparation d'organes.

2573- Les mécanismes de cicatrisation sont des événements complexes qu'il est impossible de reproduire complètement en laboratoire par des méthodes cellulaires ou informatiques ; les investigations in vivo sont donc nécessaires. C'est pourquoi, un modèle de régénération a été développé par lésion localisée du derme de la peau de l'animal, qui, après analyse de la cicatrisation (fibrose/régénération cellulaire) et des paramètres biochimiques permettra de déterminer les types de macrophages impliqués et leur rôle dans la cicatrisation.

Ce projet nécessite l'utilisation de plusieurs modèles de rongeurs, soit normaux (wild type), soit privés de macrophages (rongeurs transgéniques), tous issus de croisement de rongeurs hébergés dans des élevages agréés. Le caractère transgénique n'engendre aucun trouble particulier chez ces animaux. Ce projet utilise 1200 rongeurs sur 5 ans, nombre déterminé en fonction des différents protocoles et pour répondre aux exigences minimales d'un test statistique qui sera appliqué pour chaque expérience. Ainsi nous veillons à n'utiliser que le minimum nécessaire d'animaux pour assurer la validité des résultats. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie soient définis et validés par une équipe de vétérinaire, l'état de santé des animaux sera également surveillé tout au long de l'expérience. Le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe dans un milieu enrichi et l'application de critères d'arrêts en élevage et en expérimentation, permettra de garantir le bien-être des animaux.

2574- Les porcelets mâles sont actuellement castrés par voie chirurgicale pour éviter les odeurs sexuelles lors de la cuisson des viandes. Celles-ci sont essentiellement dues à l'androsténone et au scatol. La castration chirurgicale peut légalement être pratiquée par l'éleveur jusqu'à 7 jours d'âge mais les états membres de l'UE sont engagés pour une interdiction de la castration en 2018.

Il est donc urgent de proposer aux éleveurs des alternatives, parmi celles-ci, l'élevage de mâles entiers est envisagé mais il pose des questions de bien-être animal (comportement de montes, agressions en fin d'engraissement).

L'utilisation de semence sexée est évoquée, elle permettrait de ne faire naître que des femelles mais cette biotechnologie n'est pas encore disponible pour l'espèce porcine.

La sélection génétique d'animaux « moins odorants » est étudiée mais la diminution des niveaux d'androsténone est corrélée avec une diminution des capacités de reproduction.

Dans ce contexte, la vaccination anti GnRH, aussi appelée immuno castration est une alternative d'ores et déjà utilisable. Il s'agit de réaliser 2 injections d'un vaccin dirigé contre la GnRH à 87-90 jours et 115-118 jours d'âge chez le porcelet pour empêcher l'apparition de la puberté.

Ce vaccin neutralise les hormones de l'axe gonadotrope par des anticorps spécifiques. Ce vaccin entraîne la production d'anticorps anti GNRH qui se fixent sur l'hypophyse et bloquent la production des hormones FSH et LH. Il s'agit donc d'une inactivation réversible de l'axe corticotrope, l'apparition de la puberté et le développement testiculaire sont retardés.

Actuellement cette technique est peu utilisée en France. Malgré la mise au point de matériel sécurisé, le risque d'auto injection pour l'éleveur semble être un des freins au développement de cette technique.

L'objet de cette étude est de renseigner les effets d'une vaccination chez le mâle pubère, en utilisant le verrat adulte pubère comme modèle. Après une phase de caractérisation de la fonction de reproduction de 9 verrats, nous réaliserons une première injection anti GnRH et mesurerons les effets, puis nous réaliserons une seconde injection 4 semaines après et mesurerons les effets pendant 4 mois. Les travaux de ce type sur le verrat adulte sont peu nombreux et réalisés sur des périodes trop courtes pour apprécier la récupération de toutes les fonctionnalités (libido, qualité de semence, fertilité). Nous mesurerons les effets de la castration chimique sur la libido (testostérone), le développement testiculaire et la spermatogenèse et évalueront leur réversibilité.

Neuf verrats matures (14 mois) seront utilisés pour cette expérimentation, toutes les semaines, leur semence sera collectée conformément à la pratique d'élevage courante en centre d'inséminations artificielles. Des prélèvements sanguins seront réalisés toutes les 2 semaines, afin d'établir des profils hormonaux et documenter notamment la cinétique de la testostérone. L'expérimentation sera menée pendant 6 mois, 1 mois d'observation (période contrôle), 1 mois entre les 2 injections vaccinales (prescription d'utilisation du produit) et 4 mois après (afin d'évaluer la réversibilité)

Notre étude prend en compte la règle des 3 R, en réduisant les animaux utilisés en expérimentation animale puisque nous allons réutiliser des porcs déjà inclus dans un protocole validé par le comité d'éthique, impropres à la consommation humaine et destinés à l'euthanasie. Les conditions d'élevage seront raffinées avec un élevage sur paille permettant l'activité de fouissage tel que préconisé par l'EFSA (European Food Safety Authority). L'utilisation animale ne peut être remplacée, pour évaluer les effets du vaccin sur la libido et la production spermatique.

2575- La nécessaire réduction de l'utilisation des antibiotiques en production avicole est un enjeu majeur dans la lutte contre l'apparition de résistances à ces molécules et pour la préservation de leur efficacité. Ainsi, renforcer la santé des animaux est un axe de travail pertinent dans la lutte contre l'apparition de maladies afin de contribuer à l'amélioration des conditions d'élevage des volailles et de leur bien-être.

Les premiers jours de vie des volailles sont cruciaux pour la mise en place de leur système immunitaire. Les anticorps maternels protègent les poussins pendant quelques jours mais ils doivent rapidement développer leurs propres mécanismes de défense. De nombreux facteurs peuvent retarder ou limiter le développement du système immunitaire des poussins comme, par exemple, la durée de stockage des oeufs avant incubation ou, en élevage, une mauvaise maîtrise des températures. Dans des conditions de production, un stockage long est parfois nécessaire lorsque le marché cible est fortement saisonné. Les poussins sont alors plus fragiles et susceptibles de ne pas pouvoir se défendre efficacement contre une contamination précoce ou un stress en élevage. Les probiotiques, qui sont constitués de bactéries ou levures bénéfiques pour la santé, pourraient être de bons candidats au renforcement du système immunitaire du poussin. L'objectif de cet essai est de mesurer l'intérêt comparé de deux probiotiques (un probiotique test et un probiotique du commerce) dans l'amélioration de la santé des volailles.

L'étude est menée sur 1440 poussins à croissance rapide répartis dans 36 parquets de 40 animaux chacun. Le protocole utilisé pour la validation des probiotiques implique la comparaison des résultats zootechniques des volailles élevées dans des conditions proches de celle d'un élevage classique, au sol sur litière avec un accès illimité à l'eau et l'aliment. Un léger stress thermique servira d'élément déclencheur de la réponse immunitaire. Durant la période une attention particulière sera portée au comportement des animaux afin de prévenir toute angoisse, souffrance ou douleur excessive.

2576- Malgré les progrès considérables des traitements des hépatites B chroniques, ils agissent en inhibant le développement du virus, sans l'éliminer de l'organisme. Tout arrêt du traitement relance l'activité virale et l'évolution de la maladie. Ainsi, malgré l'existence d'un vaccin efficace, l'infection chronique par le virus de l'hépatite B (VHB) demeure un problème de santé publique mondial avec 400 millions de porteurs chroniques dont 50% décéderont prématurément d'une cirrhose ou d'un cancer du foie.

Il existe donc un besoin urgent de développer des options thérapeutiques alternatives pour les porteurs chroniques du virus de l'hépatite B (VHB). Il est particulièrement important d'avoir accès à un modèle animal, immunologiquement proche de l'Homme pour lequel les processus d'infection par ce virus sont possibles, puisque les mécanismes en jeu dans l'atteinte chronique due au VHB sont complexes et multifactoriels. Les modèles murins ne peuvent pas être utilisés car résistants à l'infection. En revanche nous avons récemment mis en évidence des infections chroniques naturelle par un variant VHB chez le primate non humain.

L'objectif aval de ce projet est d'évaluer une nouvelle cible thérapeutique de l'infection chronique à VHB. Pour cela, nous proposons de faire exprimer in vivo dans les foies des animaux un récepteur cellulaire humain du VHB en vue de l'établissement d'un nouveau modèle animal, permettant d'évaluer des traitements de la phase chronique de l'hépatite B.

De manière à réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire, l'étude est réalisée en deux étapes sur des animaux issus d'élevages reconnus, avec une étude pilote comportant 4 animaux et une seconde étape d'évaluation de la cible thérapeutique

faisant appel à 18 animaux, tous provenant d'élevages agréés. Nous veillerons à l'état de santé et au bien être des animaux tout au long de l'expérimentation. Les évaluations cliniques régulières nous permettront d'évaluer notre stratégie. Des critères d'arrêts sont définis antérieurement aux essais afin de pouvoir mettre en œuvre des traitements ou interrompre l'essai après avis du vétérinaire en charge de l'installation.

2577- Le cancer colorectal représente la deuxième cause de mortalité par cancer en France. Nous sommes en train de montrer que les phases très précoces du développement tumoral suite à la perte du gène suppresseur de tumeurs Apc sont accompagnées par des modifications importantes dans les mécanismes qui contrôlent l'expression des gènes : les mécanismes épigénétiques. Afin de confirmer l'importance de ces résultats dans le cadre de la pathologie, nous utiliserons un modèle de allogreffes chez la souris immunodéprimée qui consiste à injecter des cellules tumorales dans le flanc des souris et à suivre la formation et l'évolution tumorale suite à l'inhibition des modifications épigénétiques dans ces cellules. L'utilisation de souris immunodéprimées nous permettra de comparer nos résultats avec les profils déjà obtenus dans d'autres études par injection de cellules tumorales humaines.

La croissance tumorale sera suivie de manière non invasive tout le long de la procédure. Le suivi permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les protocoles expérimentaux puisqu'il n'y a pas de sacrifices à chaque temps de suivi. D'autre part, l'emploi d'un modèle d'allogreffes permettra d'éviter l'utilisation de modèles génétiques complexes obtenus à travers plusieurs séries de croisements, ce qui contribuera à la réduction du nombre d'animaux utilisés. Nous nous engageons à respecter la fragilité de ces animaux qui seront hébergés dans une structure avec un bilan sanitaire compatible avec leur condition (A2, EOPS). Les animaux feront objet d'une surveillance régulière pendant toute la durée de l'étude et leur milieu sera enrichi à l'aide de litière mélangée à des copeaux, ainsi que de briques de peuplier.

Pour l'ensemble de ce projet, nous avons prévu un nombre de 85 souris sur une durée de 3 ans.

2578- La tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (CPVT) est une maladie cardiaque génétique sévère se manifestant souvent durant l'enfance ou l'adolescence, caractérisée par des arythmies induites par le stress ou l'exercice physique se manifestant par une syncope ou la mort subite. Bien que la maladie ne soit pas incapacitante sur le plan physique, les patients atteints de CPVT présentent un taux de mortalité très élevé à l'âge de 35 ans. Le dépistage et le diagnostic précoce du CPVT est donc capital. Les traitements actuels limités n'offrent qu'une protection limitée, d'où la nécessité de nouvelles études.

La pathologie est due à un dysfonctionnement du cycle du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire des myocytes cardiaques. Deux gènes responsables de la CPVT ont été découverts à ce jour : le gène du récepteur cardiaque de la ryanodine (RyR2) en cause dans 55% à 65% des cas environ, et le gène de la calséquestrine (CASQ2) beaucoup moins souvent en cause, dans 2% des cas environ.

L'objectif central du programme de recherche consiste à élucider les mécanismes sous-jacents des arythmies fatales qui se produisent dans les patients atteints du CPVT dans le but de développer des nouvelles thérapies efficaces pour la prise en charge de cette pathologie. Les arythmies typiques du CPVT sont le produit des phénomènes électromécaniques complexes, qui émergent au niveau de l'organe. L'étude des bases pathophysiologiques du CPVT repose sur une approche de physiologie intégrée qui ne peut pas être atteinte par une étude *in vitro*. Nous avons donc généré un modèle de souris transgéniques présentant une mutation du RyR2 identifiée chez des patients CPVT dont la validation du phénotype CPVT nécessite une analyse de l'Electrocardiogramme par télémétrie.

Ce modèle animal ne peut être remplacé par un modèle *in vitro* ne présentant pas l'environnement cellulaire adéquate et complexe, ni sur lignées de cellules cardiaques adultes, ces cellules ne conservant pas un phénotype stable et ne survivant pas au delà de 48h de mise en culture primaire. Néanmoins, nous réduisons au maximum le nombre d'animaux utilisés à 60 dans la limite statistique raisonnable d'une étude scientifique. Notre stratégie conçue pour respecter le principe des 3R, permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. De plus, les animaux sont sacrifiés en fin d'expérimentation et les tissus/cellules prélevés sont utilisés par plusieurs expérimentateurs pour différentes études. Les procédures utilisées se font dans le cadre adapté d'un hébergement agréé, respectent au maximum le bien-être des animaux (de l'enrichissement étant ajouté dans les cages), en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour éviter tout stress.

2579- Chez certaines personnes, il semblerait que les vaccins en injection intra musculaire profonde, à base d'aluminium, pourraient poser des problèmes de réponse auto-immune et de maladie musculaire : par exemple la myopathie à macrophage. Nous souhaiterions tester un autre type d'adjuvant qui pourrait remplacer l'aluminium de la vaccination ; ce sont des nano-diamants (NDs) qui serviraient de vecteurs de présentation de l'antigène.

Les nano-particules peuvent être décorées de ligands (antigène), qui seront capables de faire exprimer des anticorps de manière sélective : on parle alors de ciblage actif, le système nanoparticulaire est dit fonctionnalisable à façon et ne présente pas de toxicité sur les cellules.

L'objectif de ce projet est de vérifier que l'utilisation des nano-particules fonctionnalisées par un antigène permet de réaliser une vaccination déclenchant une réponse immunitaire efficace sans l'ajout d'autres adjuvants. Ceci permettrait le développement d'une nouvelle génération de vaccins.

Ce projet étant destiné à tester un nouveau type de vecteur il n'est pas possible de remplacer le modèle animal par un modèle cellulaire ou informatique. Le nombre d'animaux a été déterminé grâce à un test statistique qui nous a permis de le réduire au minimum nécessaire de 108 animaux, tous provenant d'élevages autorisés.

Les vaccinations seront réalisées sur un modèle rongeur par une injection sous cutanée et intra musculaire suivies de prélèvements sanguins réguliers qui nous permettront d'analyser les anticorps dirigés contre les antigènes utilisés. Les animaux seront hébergés en groupe pour garantir leur bien-être et seront surveillés tout au long de l'expérience. Aucune souffrance n'est attendue suite à la vaccination, toutefois, des traitements appropriés ou des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus.

2580- Les uvéites sont des inflammations intraoculaires, souvent d'origine auto-immune, pouvant représenter une réelle menace pour la vision des patients. Dans les pays occidentaux, l'incidence des uvéites serait de 17 à 52 cas pour 100 000 habitant par an. Chaque année, environ 17% des patients atteints d'uvéites actives présente une diminution ou une perte de l'acuité visuelle. Les formes sévères d'uvéite antérieure et postérieure nécessitent souvent des doses élevées de corticoïdes pouvant entraîner des effets secondaires. Lorsque ces traitements sont inefficaces ou mal tolérés ils peuvent être remplacés par des immunosuppresseurs. Cependant, les uvéites ne guérissent pas définitivement et les symptômes reviennent périodiquement après arrêt des traitements. Le praticien se retrouve donc très limité en ce qui concerne le traitement et la prévention de récurrence. L'objectif de ce projet est de mettre en place un modèle in vivo d'uvéite chronique induite par l'antigène *Mycobacterium Tuberculosis* inactivé (H37RA) chez le lapin afin d'évaluer de nouveaux traitements dans la prévention de récurrence. Il existe peu de modèles in vitro représentant les aspects auto-immuns et inflammatoires. Six études successives sont prévues pour évaluer différents paramètres (présence d'une réponse inflammatoire, types d'adjuvants, effet souches, potentiel à induire une chronicité). Ce modèle in vivo sera utilisé pour évaluer l'efficacité d'un immunosuppresseur, la cyclosporine A, utilisée dans le traitement des uvéites postérieures. L'ensemble du projet nécessite l'utilisation de 1961 lapins (161 lapins sur une durée de 2 ans pour la mise en place du modèle et 1800 pour valider déterminer les efficacités des traitements). Des techniques d'imagerie non-invasive seront utilisées pour suivre l'apparition de l'inflammation. Une analgésie se fera en pré- et post-induction suivie d'une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude (6 semaines). Un certain nombre de points critiques seront surveillés et en cas de douleur observée, la mise à mort sera réalisée.

2581- Le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) est une affection virale caractérisée par des problèmes de reproduction chez les truies et des troubles respiratoires chez les animaux en croissance. Cette maladie, apparue en Europe de l'Ouest au début des années 90, présente aujourd'hui une prévalence très élevée dans certaines régions (plus de 60% en Bretagne). Cette infection conduit à des pertes économiques considérables ainsi qu'à une utilisation importante d'antibiotiques en élevage en raison des complications bactériennes secondaires.

Parmi les mesures de lutte contre le virus du SDRP (SDRPv), la vaccination est une des plus souvent mise en œuvre sur le terrain. Les vaccins les plus utilisés sont les vaccins vivants atténués (modified live vaccine : MLV) qui ont démontré leur efficacité clinique tant vis-à-vis des problèmes de reproduction que des troubles respiratoires induits. Nous avons par ailleurs montré récemment que ces vaccins étaient également capables de diminuer très significativement la transmission inter-porc du virus en condition expérimentale chez des porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS). Sur le terrain, la difficulté à contrôler la transmission virale à l'aide de ces mêmes vaccins MLV suggère que certains facteurs pourraient diminuer l'efficacité théorique mise en évidence en conditions expérimentales. Une des hypothèses est que les anticorps d'origine maternelle (AOM), présents chez une proportion importante de porcelets sur le terrain, mais absents en conditions expérimentales, pourraient diminuer l'efficacité vaccinale des vaccins MLV au sein des élevages infectés.

Dans une première étude de terrain nous avons montré que les AOM spécifiques du SDRPv pouvaient inhiber la réponse immune post-vaccinale chez les porcelets probablement en bloquant la réplication du virus vaccinal. Cependant nous n'avons pas pu établir pour le moment si cette absence de réponse immunitaire induisait une diminution de l'efficacité vaccinale après mise en contact avec le virus du SDRP.

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'impact des AOM sur l'efficacité de la vaccination SDRP chez les porcelets suite à une mise en contact avec le virus. Cette efficacité vaccinale sera évaluée à la fois en termes de paramètres cliniques et virologiques, mais aussi en termes de transmission virale.

Ce projet comporte 1 procédure répétée 2 fois incluant un total de 84 porcelets. Nous tiendrons compte des exigences des 3R en incluant un nombre nécessaire et suffisant d'animaux pour obtenir des résultats statistiquement significatifs et en définissant des points critiques précis pour l'arrêt de la procédure. Etant donné que l'infection par le virus du SDRP est spécifique aux suidés, il n'y a pas de possibilité de remplacement du modèle porc pour cette étude. Deux groupes de porcelets avec ou sans AOM seront vaccinés puis la moitié des animaux de chacun des groupes sera challengé un mois plus tard. Un suivi clinique et virologique précis sera réalisé sur tous les animaux. Les données virologiques seront utilisées pour estimer les paramètres de transmission dans les groupes vaccinés avec ou sans AOM par modélisation mathématique.

Les connaissances générées dans le cadre de ce projet pourront permettre d'optimiser les protocoles de vaccination contre le SDRP sur le terrain et ainsi d'obtenir un contrôle plus rapide et plus efficace de cette infection en élevage par les vaccins.

2582- Notre projet a pour but de mieux comprendre le rôle des peptides antimicrobiens dans le développement du diabète de type 1 (DT1) dans un modèle murin de diabète autoimmun. Pour cela, nous évaluerons différents paramètres immunitaires suite à l'injection de peptides antimicrobiens dans ces souris.

Parmi la littérature dans le domaine de l'auto-immunité, le rôle des peptides antimicrobiens (AMP) a récemment été décrit. Les AMPs constituent un groupe de petits peptides exprimé principalement sur les épithélia par les cellules immunitaires et non-immunitaires pour la défense contre les microorganismes pathogènes.

Des études récentes révèlent que les AMPs régulent également de nombreuses fonctions physiologiques et par conséquent, la production dérégulée de certains AMPs a été associée à diverses maladies auto-inflammatoires ou auto-immunes (arthrite rhumatoïde, lupus...).

La souris de souche NOD (non-obese diabetic) est le meilleur modèle animal permettant d'étudier le développement du diabète autoimmun et la réponse immunitaire diabétogène.

Quatre traitements (injection intrapéritonéale) par différents AMPs seront appliqués à des souris d'une souche susceptible développant spontanément un diabète autoimmun (souche NOD). Ainsi l'effet des AMPs sur le système immunitaire sera évalué à court et à moyen terme et à long-terme sur le développement du diabète. Deux autres souches de souris "contrôle" (non-susceptible pour le diabète auto-immun) seront étudiées en parallèle (souche BALB/c et C57BL/6).

L'effet des peptides sera évalué sur le système immunitaire innée 3 jours après injection, sur le système adaptatif 10 jours après injection et ce dans le pancréas, les ganglions drainants et la rate de chaque animal. L'effet à long-terme sur le développement du diabète sera évalué par un suivi hebdomadaire de la glycémie durant 6 mois.

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement robustes : certains paramètres expérimentaux, tels que le choix des peptides testés, ont déjà été déterminés par des expériences in vitro permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés. Cette étude, prévue sur 5 ans, nécessitera au total 2400 souris.

Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. Les molécules utilisées étant naturellement produites dans l'organisme aucune toxicité de ces molécules n'a été décrite. L'état général de l'animal, la perte de poids, l'apparence et le comportement de l'animal seront suivis quotidiennement après les traitements. Concernant les incidences de diabète, les animaux devenant diabétiques seront euthanasiés après 2 tests positifs de leur glycémie (glycémie > 200mg/dl) réalisés à deux jours d'intervalle. L'expérimentation sera ainsi interrompue avant le développement de complications métaboliques aiguës pouvant causer une douleur à l'animal.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mettre à jour de nouveaux mécanismes de régulation du développement du diabète de type 1 et à long-terme ce projet permettra d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre cette maladie basées sur l'utilisation des peptides antimicrobiens.

2583- La trisomie 21 (T21), aussi appelé Syndrome de Down (DS), est due à la présence d'un chromosome 21 surnuméraire. Elle touche 1 nouveau-né pour 2000 naissances et représente environ un tiers des déficiences intellectuelles chez les enfants d'âge scolaire. C'est la forme la plus fréquente de retard mental, qui est également associée à un large panel de dysmorphologies. Arriver à déplacer de quelques dizaines de points le quotient intellectuel des patients T21 leur permettrait d'avoir une vie plus autonome et socialement intégrée et constituerait un progrès très important pour la qualité de vie des patients et de leur entourage. La finalité de la recherche sur la T21 est donc de parvenir à mettre au point un traitement améliorant, puis normalisant, les fonctions intellectuelles des malades.

La société propose des molécules ayant la propriété d'améliorer les capacités cognitives qui sont altérées dans cette pathologie.

Durant ce projet, il s'agira donc de déterminer la molécule parmi 8 candidats molécules qui se révélera la plus efficace en termes de restauration des fonctions intellectuelles. Les molécules seront testées chez la souris, animal pour lequel il existe un modèle de trisomie 21. Le remplacement de l'animal par des techniques in vitro est impossible car l'évaluation des performances intellectuelles et du comportement ne peut se faire que sur un organisme entier.

Ainsi, ces composés seront administrés à des souris contrôles pour s'assurer de leur effet non toxique puis à des modèles murins de la trisomie 21, qui feront l'objet de différents tests comportementaux afin de détecter ou non une amélioration de leur performance intellectuelle.

Afin d'obtenir des résultats significatifs, un minimum de 60 souris par composé à tester est requis. L'effectif est optimisé afin d'éviter toute duplication expérimentale et respecte ainsi la « réduction » de la règle des 3R. Ainsi, nous devrions utiliser un maximum de 5055 souris environ sur 3 ans.

Les souris bénéficieront d'un suivi quotidien à partir du début de leur traitement jusqu'à la fin de l'expérience. Et dans le cas où les animaux présenteraient des signes de souffrance, un vétérinaire disponible sur le site interviendra pour assurer leur bien-être. Ainsi la règle du raffinement est appliquée tout le long du projet

2584- La trisomie 21 (T21), aussi appelé Syndrome de Down (DS), est due à la présence d'un chromosome 21 surnuméraire. Elle touche 1 nouveau-né pour 2000 naissances et représente environ un tiers des déficiences intellectuelles chez les enfants d'âge scolaire. C'est la forme la plus fréquente de retard mental, qui est également associée à un large panel de dysmorphologies. Arriver à déplacer de quelques dizaines de points le quotient intellectuel des patients T21 leur permettrait d'avoir une vie plus autonome et socialement intégrée et constituerait un progrès très important pour la qualité de vie des patients et de leur entourage. La finalité de la recherche sur la T21 est donc de parvenir à mettre au point un traitement améliorant, puis normalisant, les fonctions intellectuelles des malades.

Une société avec laquelle nous collaborons propose des molécules ayant la propriété d'améliorer les capacités cognitives qui sont altérées dans cette pathologie.

Durant ce projet, il s'agira donc de déterminer la molécule parmi 8 candidats molécules qui se révélera la plus efficace en termes de restauration des fonctions intellectuelles. Les molécules seront testées chez la souris, animal pour lequel il existe un modèle de trisomie 21. Le remplacement de l'animal par des techniques in vitro est impossible car l'évaluation des performances intellectuelles et du comportement ne peut se faire que sur un organisme entier.

Ainsi, ces composés seront administrés à des souris contrôles pour s'assurer de leur effet non toxique puis à des modèles murins de la trisomie 21, qui feront l'objet de différents tests comportementaux afin de détecter ou non une amélioration de leur performance intellectuelle.

Afin d'obtenir des résultats significatifs, un minimum de 60 souris par composé à tester est requis. L'effectif est optimisé afin d'éviter toute duplication expérimentale et respecte ainsi la « réduction » de la règle des 3R. Ainsi, nous devrions utiliser un maximum de 5055 souris environ sur 3 ans.

Les souris bénéficieront d'un suivi quotidien à partir du début de leur traitement jusqu'à la fin de l'expérience. Et dans le cas où les animaux présenteraient des signes de souffrance, un vétérinaire disponible sur le site interviendra pour assurer leur bien-être. Ainsi la règle du raffinement est appliquée tout le long du projet.

2585- Les vecteurs viraux dérivés de l'adeno-associated virus (AAV) sont des vecteurs de choix pour le transfert de gène à long terme dans différents tissus après une seule administration in vivo.

Cependant, l'application de ces protocoles de transfert in vivo à l'aide de ces vecteurs depuis le rongeur jusqu'aux modèles de grands animaux, et plus récemment chez l'homme, a révélé la survenue de réponses immunes humorales et/ou cellulaires dirigées contre la capsid virale. Ces réponses immunes sont responsables de la perte d'expression du gène d'intérêt. De plus, l'administration (ou ré-administration) du vecteur est rendue totalement inefficace par l'immunité préexistante ou induite contre la capsid. Le contrôle de cette immunotoxicité est un défi majeur pour le succès clinique de la thérapie génique.

Notre projet a pour but d'acquérir les connaissances manquantes, plus approfondies sur les interactions entre le vecteur AAV et le système immunitaire. En particulier, il repose sur le développement de stratégies innovantes visant à limiter la réponse immune cellulaire pour permettre un transfert de gène plus sûr et une meilleure efficacité à court et long terme.

Pour atteindre cet objectif, nous devons, dans un premier temps, générer dans un organisme entier immunocompétent des cellules du système immunitaire capables de reconnaître la capsid du vecteur et de détruire les cellules ciblées par ce vecteur dans un hôte immunodéficient dépourvu d'autres cellules immunitaires. Dans un deuxième temps, nous évaluerons l'efficacité de différentes stratégies à réduire la capacité destructrice de ces cellules immunes, en mesurant, entre autre, la persistance du transfert de gène suite à l'administration d'un vecteur rAAV.

Pour ce faire, nous devons utiliser des souris pour plusieurs raisons : elles développent une immunité contre le vecteur viral, et les manipulations de cette immunité apportent des réponses applicables chez l'Homme, mais aussi les outils d'études ont été optimisés chez la souris; ce qui permet d'avoir une base solide de travail tout en réduisant le nombre d'animaux à ce qui est nécessaire au projet. De plus, dans le respect de la règle des 3R, des études in vitro précéderont les études in vivo, le nombre d'animaux sera optimisé et réduit au minimum statistiquement relevant et les expériences optimisées au mieux pour exploiter le maximum de paramètres.

Par ailleurs, chaque animale présentera un tableau de suivi afin de s'assurer de l'absence de souffrance de nos souris. Toute modification du comportement général de l'animal sera détectée et la cellule du bien-être animal de l'établissement en sera informée. Des soins adéquats seront donnés en cas de nécessité. Nous nous attacherons également, dans un souci d'application de ces principes, à faire en sorte d'optimiser l'utilisation combinée d'analgésiques et d'anesthésiques lors des différents prélèvements (sang et tissus). Enfin nous optimiserons l'utilisation des animaux entre procédures chaque fois où cela s'avère possible.

Ainsi, nous prévoyons d'utiliser 3792 animaux dans cette étude au lieu des 5732 qui auraient été nécessaires sans ces mesures de réduction, remplacement et raffinement, d'où une baisse de plus de 33%.

2586- Les vers parasites des intestins impactent significativement la santé animale puisqu'ils sont responsables de symptômes cliniques de type perte de poids, anémie, diarrhée voire la mort des animaux les plus atteints. Ces parasites sont responsables de pertes économiques importantes dans de nombreuses espèces de rente, notamment parce que chaque année, des milliards d'euros sont dépensés pour les contrôler. L'utilisation massive de vermifuges a conduit à l'apparition de vers résistants aux traitements et rend actuellement le contrôle de ce parasite relativement limité. La mise au point de nouvelles méthodes de contrôles devient alors un besoin urgent pour les différentes filières de productions animales. Pour cela, nous développons des projets de recherche qui visent à mieux comprendre la biologie du parasite ainsi que les mécanismes impliqués dans l'apparition de vers résistants. Parmi les espèces touchées, le porc est infesté par *Oesophagostomum dentatum*. Ce ver est ingéré sur la pâture et se loge au niveau du gros intestin pour effectuer son cycle de développement. Il faut 20 à 45 jours pour que les parasites atteignent le stade adulte et se reproduisent. Ils excrètent alors des œufs via les matières fécales de l'animal. Pour travailler sur ce modèle et décrypter la biologie du parasite ainsi que pour réaliser les analyses moléculaires, nous devons multiplier ce parasite sur des porcelets âgés de 3 mois pour obtenir des larves. Une suspension de parasites sera inoculée par voie orale aux porcelets et les vers seront récupérés après collectes des fèces des animaux dans des bacs disposés sous la cage.

Remplacement: ce ver est un parasite obligatoire et nous ne pouvons pas le multiplier en système artificiel sans faire intervenir l'hôte (pas de remplacement possible).

Réduction: nous utilisons un minimum d'animaux et cultivons une grande quantité de matières fécales pour obtenir le matériel biologique en quantité suffisante pour nos analyses.

Raffinement: Les animaux seront maintenus dans des cages par deux pendant 3 mois et auront dans cet environnement des ballons, des chaînes suspendues ou des boules de pétanque comme enrichissement de milieu. En fin de protocole, les animaux ne présentant pas des signes cliniques seront mis à mort et les carcasses seront commercialisées.

Il s'agit dans ce projet, d'utiliser un maximum de 20 porcelets sur 5 ans pour multiplier 2 isolats de parasites.

2587- Le présent projet a pour cadre l'évaluation pharmacologique comportementale d'un candidat médicament. Il s'agit d'un projet générique, constitué d'un ensemble de procédures expérimentales de pharmacologie réalisées chez le rat et/ou la souris, par administration unique ou répétée (jusqu'à 2 semaines), par voie orale, intraveineuse, sous-cutanée, intrapéritonéale ou intra-musculaire.

Ces modèles sont sélectionnés pour leurs valeurs informatives et leurs pertinences largement décrites dans la littérature scientifique. Ils permettent de mettre en évidence des effets comportementaux et pro-cognitifs qui pourront être utilisés en thérapeutique humaine.

Pour chaque procédure expérimentale, les objectifs, les moyens expérimentaux mis en œuvre (s'appuyant sur nos modes opératoires standard), les conditions d'hébergements et d'utilisation des animaux et le nombre de lots sont définis pour répondre aux exigences réglementaires. Un plan d'étude est rédigé pour chaque utilisation d'une procédure expérimentale dans le cadre d'évaluation d'un candidat médicament. Il précise les éléments spécifiques comme le calendrier, les conditions de traitement (voie, dose, fréquence) et d'examen, les gestes techniques. Les effectifs prévus correspondent à ceux habituellement acceptés par la communauté scientifique pour ce type d'étude et permettent de garantir l'exécution du plan d'étude et d'assurer un nombre d'animaux suffisant pour conclure de façon scientifiquement pertinente.

On prévoit:

- 1 à 12 répétitions par an de la procédure 1 soit de 60 à 3600 rats adultes et de 60 à 3600 juvéniles,
  - 1 à 5 répétitions par an de la procédure 2 par an soit de 50 à 1250 rats adultes,
  - 1 à 5 répétitions par an de la procédure 3 soit de 15 à 375 rats adultes,
  - 1 à 12 répétitions par an de la procédure 4 soit de 30 à 1800 rats ou souris adultes,
- soit au maximum 10625 animaux pour la durée totale du projet (5 ans).

Dans le but de minimiser la souffrance, la détresse et l'inconfort des animaux engagés dans ces procédures, des points limites permettant de statuer rapidement sur la conduite à tenir vis-à-vis de l'animal ont été définis en interne. Une grille d'évaluation a été élaborée conjointement par la structure du bien-être animal, le comité d'éthique animal et les expérimentateurs et sera régulièrement revue.

Chaque procédure expérimentale sera abordée en 2 phases:

- phase 1: développement et validation de la procédure grâce à des molécules de référence décrites dans la littérature
- phase 2: application de la procédure à l'évaluation de nos molécules candidats médicament

Un petit nombre d'animaux supplémentaires étant prévu pour remplacer ceux dont le statut sanitaire ne serait pas conforme aux critères d'inclusion, ils pourront à la fin de la procédure expérimentale, être inclus dans une procédure d'entraînement ou de formation du personnel également décrite dans ce projet ou dans notre projet relatif à la formation (Acquisition et validation des compétences des personnels appliquant des procédures expérimentales chez le rongeur (rat et souris)

Enfin, chaque fois que cela est possible, les animaux euthanasiés seront également utilisés pour produire des matrices biologiques indispensables aux activités de bioanalyse.

2588- Dans le cerveau des animaux vertébrés, les groupes de neurones qui fabriquent et libèrent la dopamine, un transmetteur chimique (neurotransmetteur), contrôlent et modulent de nombreuses fonctions comme la programmation des mouvements, la motivation, les émotions et des comportements de survie comme la température corporelle, la prise alimentaire et la reproduction.

Les travaux de l'équipe cherchent à comprendre comment sont organisés les groupes de neurones à dopamine, comment ils se mettent en place chez l'embryon, et comment ils s'adaptent aux changements de l'environnement, aux modes de vie, pour assurer leurs nombreuses fonctions. Les perturbations de ces mécanismes contribuent à de graves maladies chez l'homme, comme la Maladie de Parkinson, la schizophrénie, la dépendance aux drogues ou les déficits d'attention avec hyperactivité.

Le développement et la plasticité des systèmes de neurotransmission comme les systèmes à dopamine doivent être étudiés chez l'animal entier, parce qu'ils sont contrôlés et dépendent de nombreux facteurs, à la fois endogènes et environnementaux. Le principal modèle animal utilisé pour nos projets est un poisson téléostéen, le *Danio rerio* ou poisson-zèbre, qu'il faut pouvoir comparer avec précision aux autres espèces dont l'homme.

Dans ce but, le projet combine différentes méthodes, depuis l'analyse morphologique du développement, la modification des gènes et des facteurs qui affectent le développement des neurones à dopamine, leurs caractéristiques physiologiques, électriques et biochimiques, et les répertoires comportementaux régulés par la dopamine. Les objectifs du projet sont: 1) d'identifier les principaux gènes et facteurs physiologiques dont dépend la mise en place des systèmes dopaminergiques durant le développement et 2) de comprendre comment ces systèmes se sont modifiés dans les principaux groupes d'animaux vertébrés pour adapter le mode de vie de ces animaux à leur environnement (reproduction, locomotion et cognition). La réalisation du projet nécessite l'utilisation de 839 poissons sur 5 ans. Nous nous efforcerons de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés pour chacune des procédures. Pour cela nous limiterons précisément le nombre d'animaux utilisés aux besoins statistiques de nos analyses et nous privilégierons des tests statistiques non-paramétriques (Mann Whitney U test, test de Kruskal Wallis, test de Wilcoxon). Egalement, chaque fois que cela sera possible, les animaux utilisés pour les procédures non-invasives (imagerie in-vivo, tests de comportements) seront inclus dans les lots d'animaux pour les procédures d'analyses histologiques, après fixation des tissus.

Dans le but de réduire la douleur et la souffrance des animaux, toutes les procédures pratiquées in vivo seront réalisées sous anesthésie à la tricaine (0.02%).

2589- L'intestin des mammifères héberge de très nombreuses bactéries et des études menées récemment ont montré que ces microorganismes jouent un rôle important dans la santé (obésité, diabète, inflammation, etc.). Ces bactéries intestinales (le microbiote) utilisent les résidus non digérés de notre alimentation. La quantité et la qualité de ces résidus dépend de notre alimentation et influence l'équilibre du microbiote. Ainsi, la nutrition peut donc être considérée comme un moyen d'agir sur la santé notamment par l'intermédiaire du microbiote. Le traitement technologique (par exemple, la température de cuisson des aliments) peut rendre les aliments plus ou moins digestibles et ainsi influencer la quantité de résidus disponibles pour le microbiote.

Dans ce contexte, notre objectif est de déterminer s'il est possible d'influencer l'équilibre du microbiote en modifiant le traitement technologique des aliments. Nous souhaitons également étudier les conséquences de ces modifications du microbiote sur la santé. Les résultats de ce travail pourront être utilisés pour proposer des traitements technologiques des aliments appropriés au maintien de la santé humaine en améliorant leur digestibilité.

Nous formulons donc l'hypothèse que le traitement technologique des aliments pourrait agir sur la santé en raison d'une modification de la digestibilité qui influencerait l'équilibre du microbiote. Afin de vérifier cette hypothèse, nous proposons, lors de la première phase de notre étude, d'alimenter des rats pendant 3 semaines avec un aliment modèle ayant subi un traitement technologique le rendant soit très digestible, soit peu digestible (mesuré in vitro) et de caractériser son effet sur la composition et l'activité du microbiote intestinal ainsi que sur la santé des animaux (16 rats). Dans la seconde phase, nous effectuerons une étude cinétique de différents paramètres tels que la digestibilité des protéines, la composition et l'activité métabolique du microbiote intestinal après un repas contenant l'aliment modèle (40 animaux). Ces deux parties de l'étude seront menées soit avec une protéine animale (protéine de lait), soit avec une protéine végétale (gluten). Nous utiliserons un total de 112 rats : 56 pour chacune des protéines testées (28 pour la forme digestible et 28 pour la forme peu digestible). Les protéines animales et végétales n'ont ni la même digestibilité ni la même composition en acides aminés. Pour ces raisons, les effets des traitements technologiques des aliments pourraient être différents en fonction de la source protéique (animale ou végétale). Les résultats obtenus pourraient permettre d'optimiser le traitement technologique des aliments afin d'améliorer la digestion des protéines. Des applications dans le domaine de la santé humaine pourraient émerger de cette étude, notamment dans le cadre de la maladie cœliaque dont les symptômes sont en partie liés à une digestion incomplète du gluten.

Ces expériences seront menées dans le respect du bien-être animal. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum exigé pour l'analyse statistique des paramètres mesurés et nous avons veillé à nous limiter aux seules expériences considérées comme indispensables. Les conditions d'hébergement (cages plexiglass conformes aux nouvelles normes) seront améliorées par enrichissement du milieu (tunnel) et les procédures stressantes pour les animaux seront limitées au maximum. Les animaux utilisés seront des rats Wistar Rcc Han spécialement élevés pour l'expérimentation animale. Il n'existe pas de modèle in vitro ou de simulation informatique suffisamment élaboré pour étudier à la fois la digestion, le microbiote intestinal et la santé animale ainsi que les interactions complexes entre ces différents éléments, le recours à l'animal est donc indispensable.

Les résultats de ce projet de recherche pourraient permettre de développer de nouveaux traitements technologiques des aliments appropriés pour le maintien de la santé. Ce projet nous permettra également de valider l'utilisation de méthodes in vitro pour évaluer la digestibilité des aliments et ainsi proposer une alternative à l'expérimentation animale.

2590- La moelle épinière conduit les informations motrices venant du cerveau vers les muscles ainsi que les informations sensibles venant des récepteurs sensoriels et se dirigeant vers le cortex cérébral. Cet axe anatomique de passage des influx nerveux est contenu dans un canal osseux formé par les vertèbres. Lors de traumatismes à haute énergie (accidents de la route, accidents de travail, chutes de lieux élevés...), la colonne vertébrale peut se disloquer et provoquer une lésion de la moelle qu'elle entoure. Outre le choc reçu par la moelle qui détruit mécaniquement une partie du tissu nerveux, on sait que d'autres phénomènes surviennent rapidement et aggravent les lésions de départ. Ainsi, les traumatismes du rachis (colonne vertébrale) constituent une pathologie dévastatrice, dont l'incidence annuelle varie entre 10,4 et 83 cas par million d'habitants, et qui aboutit à une perte des fonctions motrice, sensitive et sphinctérienne. Les accidents de la voie publique représentent environ la moitié des traumatismes rachidiens suivis des chutes et des traumatismes sportifs. Dix à 15 % des traumatisés du rachis s'accompagnent d'un déficit neurologique radiculaire ou médullaire. A ce jour, il n'existe AUCUN traitement reconnu permettant de traiter les traumatismes médullaires chez l'homme.

Il est donc primordial de maîtriser un ou plusieurs modèles de traumatisme médullaire pour en étudier les conséquences physiologiques et neurophysiologiques, et pouvoir travailler sur des traitements susceptibles de limiter ses effets.

Le plus souvent, les études sur le traumatisme médullaire sont réalisées sur des modèles animaux dans lesquels le traumatisme est induit par contusion (lâcher de poids), compression, administrations de neurotoxines, ischémie induite par un processus photochimique, section, ou broyage de la moelle. Afin de nous rapprocher au mieux des traumatismes à haute énergie, nous avons choisi de réaliser nos premières études sur un modèle de contusion chez le rat. Cependant, la variabilité du modèle, liée à la composante dynamique de l'impact, peut masquer les effets d'un traitement. En effet, si l'effet d'un traitement est estimé à partir de la mesure d'un paramètre dont les variations attendues sont faibles (par exemples, taille de l'hématome intra parenchymateux, œdème, avant et après traitement), cette petite variation risque d'être masquée par la variabilité de l'impact. Il faut garder à l'esprit que la préservation de toutes petites zones médullaires peut avoir un grand bénéfice sur la qualité de vie du patient. Ainsi, il a été estimé qu'il suffisait de préserver 10% de la substance blanche des voies motrices myélinisées pour conserver une capacité à la marche. C'est pourquoi nous projetons de mettre au point un modèle de compression chez le rat, qui nous éloigne un peu de la réalité d'un accident à haute énergie (exemple de l'accident de

voiture), mais permettra de s'affranchir de la variabilité de l'impact, et ainsi, de détecter des petites variations dans les paramètres mesurés.

La mise au point de ce modèle sera réalisée sur 45 rats Wistar, en deux étapes:

- la première étape consistera à déterminer le poids du dispositif à placer sur la moelle pendant 1 minute pour obtenir une lésion comparable à celle que nous obtenions avec le modèle par contusion. Nous testerons des dispositifs de 5, 10, 20, 30, 40 et 50g. La durée de compression et les poids testés ont été choisis après étude de la littérature. Pour évaluer la lésion, le taux d'hémoglobine et le volume de l'œdème dans la moelle seront quantifiés par spectrophotométrie dans l'heure suivant le traumatisme. Cette première étape sera réalisée sur des groupes d'animaux comportant de 1 à 7 rats maximum (un groupe par poids testé).

- la deuxième étape aura pour objectif de comparer la variabilité des mesures en spectrophotométrie obtenue avec ce nouveau modèle utilisant le poids déterminé lors de la première étape, à celle obtenue lors de notre étude précédente utilisant le modèle par contusion. Pour cette étape, nous utiliserons un groupe de 10 rats. Ce nombre est proche de celui utilisé dans l'étude précédente et permet d'être dans les mêmes conditions statistiques.

La complexité des processus impliqués dans le traumatisme médullaire ne permet pas de s'affranchir des expériences in vivo. Cependant, nous avons délibérément choisi de ne pas refaire le groupe de rats subissant le traumatisme par contusion afin de réduire au maximum le nombre d'animaux (n=15-45) pour ce projet. Il s'agit de la mise au point d'un nouveau modèle dans le laboratoire et non pas d'une étude comparant différents traitements qui nécessite la randomisation des animaux dans les groupes à comparer. Ce nouveau modèle est basé sur la même préparation chirurgicale que celle employée dans une procédure validée précédemment par le comité d'éthique. Avant l'expérimentation, le cycle nyctéméral des animaux est respecté. Ils ont un accès libre à l'eau et à la nourriture. L'ensemble de la procédure expérimentale sera réalisé sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane associée à un analgésique puissant, la buprénorphine, pour limiter au maximum l'inconfort de l'animal. La mise à mort est réalisée par surdose d'anesthésie gazeuse, suivie d'une exsanguination nécessaire pour les mesures en spectrophotométrie.

2591- L'infarctus du myocarde, appelé couramment crise cardiaque, est une destruction d'une partie du cœur due à un manque de sang et d'oxygène (ischémie). Cela se produit lorsqu'une artère coronaire (vaisseau sanguin apportant le sang et l'oxygène au cœur) s'obstrue. Les lésions forment une zone tissulaire morte dite « infarctée » qui ne permet plus une bonne contraction du cœur. Il faut savoir qu'il y a environ 120000 infarctus du myocarde en France tous les ans avec un taux de mortalité autour de 25%. L'angioplastie, technique percutanée permettant de déboucher l'artère coronaire, a contribué à améliorer ce taux, mais les conséquences à long terme restent potentiellement néfastes. C'est pourquoi, il est impératif de trouver des traitements pharmacologiques qui pourraient se surajouter. Notre projet a donc pour but de tester de nouvelles substances pouvant protéger le cœur en diminuant la taille de la zone infarctée, et ainsi améliorer la qualité de vie des personnes ayant eu une crise cardiaque.

Actuellement, de par leur caractère préclinique, et en complément des études faites sur des cellules ou des tissus, les modèles animaux sont une étape indispensable pour tester de nouvelles substances pharmacologiques permettant de réduire les conséquences de l'infarctus du myocarde. Notre projet prévoit d'utiliser au maximum 200 porcs sur 5 ans. La fréquence cardiaque, la taille du cœur, l'anatomie coronaire, l'innervation, la circulation collatérale native du porc sont très proches de celles de l'Homme. Le plan général du projet est d'anesthésier les animaux, de pratiquer une chirurgie afin de simuler un infarctus du myocarde en fermant transitoirement une coronaire, d'administrer la substance (ou le placebo) et ensuite d'analyser le myocarde afin d'évaluer l'efficacité de la substance testée.

Seule l'utilisation d'animaux permet d'atteindre l'objectif du projet, qui vient en complément des autres méthodes alternatives et doit rester proche de la réalité clinique humaine pour rester scientifiquement valable. Nous prévoyons d'utiliser le minimum d'animaux pour chaque substance testées, en contrôlant leur nombre par des méthodes statistiques. L'anesthésie et l'analgésie seront adaptées afin de n'induire aucune souffrance inutile, et des vétérinaires contrôleront régulièrement l'état de santé des animaux. Ils seront hébergés selon les normes en cours, et nous veillerons à la bonne qualité des soins et à leur bien-être pendant toute l'expérimentation.

2592- L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, c'est à dire l'occlusion d'un vaisseau cérébral par un caillot sanguin, est la 2ème cause de mortalité dans le monde, la 1ère cause de morbidité et la 2ème cause de démence des pays industrialisés: 120 000 personnes en sont victimes chaque année en France. Le rtPA ou activateur tissulaire du plasminogène et la thrombectomie, permettant de détruire le caillot sanguin ne peuvent être administrés respectivement que lors des 4.5 et 8 premières heures de survenue de l'AVC, ce qui limite considérablement leur utilisation. De plus, des phénomènes inflammatoires se mettent en place et se poursuivent pendant plusieurs semaines.

Le diabète est un facteur de risque des AVC, qui sont alors plus sévères d'emblée, avec un handicap résiduel et une proportion de démence, qui complique les AVC à long terme, plus importants. Ceci est d'autant plus alarmant qu'il est prévu une pandémie d'ici 2030. La thérapie cellulaire dans l'AVC est une stratégie intéressante et bien adaptée à la lutte contre les phénomènes délétères à long terme, puisqu'elle peut être administrée bien après la phase aiguë, favorise les mécanismes endogènes de réparation cérébrale que sont l'angiogenèse et la neurogenèse et a des propriétés de modulation de l'inflammation. Les cellules mononucléées (CMN) du sang périphérique sont des cellules à un seul noyau et comprennent tous les globules blancs excepté les granulocytes, mais aussi les progéniteurs vasculaires circulants. Elles ont l'avantage d'être facilement et rapidement isolées, chez le patient diabétique et, lorsqu'elles sont stimulées par l'éphrine-B2 (CMN+) in vitro, et administrées par voie intraveineuse chez des souris sans facteur de risque vasculaire, elles sont capables de promouvoir ces

processus de réparation et de réduire le volume de l'infarctus cérébral. Aucune étude n'a été menée chez des animaux diabétiques à notre connaissance et aucune étude n'a évalué l'impact de ces cellules sur l'altération de la mémoire et de l'apprentissage de ces animaux à long terme.

Les objectifs du projet sont 1) de valider un modèle de démence vasculaire (post-AVC) en mettant en place une batterie de tests comportementaux, 2) d'étudier les effets de l'administration des CMN et des CMN+ en terme de réduction du volume de l'infarctus cérébral et d'amélioration du déficit neurologique dans les 1ers jours ; 3) d'étudier les effets de l'administration des CMN et des CMN+ en terme d'amélioration des tests de mémoire et d'apprentissage à long terme et 4) d'en étudier les mécanismes : régulation de la réponse inflammatoire post-ischémique par ces cellules et modification du réseau neuronal sur le plan électrophysiologique.

Les différents axes du projet impliquent 466 souris pour l'ensemble des procédures expérimentales pour une période de 5 ans.

Les groupes ont été conçus de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Après la mise à mort des animaux, le sang et les tissus (cerveau, rate, moelle osseuse et foie) qui participent à l'inflammation systémique sont prélevés et stockés pour les analyses biochimiques et histologiques. Un soin particulier sera apporté au traitement contre la douleur avant et après les procédures chirurgicales et l'animal sera surveillé jusqu'à la fin de l'étude. Une analgésie par buprénorphine (0.1mg/kg en sous-cutané) sera réalisée 30 minutes avant le début de la procédure chirurgicale et renouvelée /12h pendant 48h. La souris est surveillée en couveuse puis remise en cage (5 souris par cage). Au cas où les douleurs persisteraient malgré les procédures entreprises, l'animal sera mis à mort.

La demande de ce projet d'expérimentation animale est justifiée par le fait qu'aucune approche in vitro ne permet de rendre compte des processus de mémoire et d'apprentissage, ni de la complexité des interactions entre les organes lymphoïdes et le cerveau après ischémie cérébrale au cours du temps. Ce modèle d'AVC n'est pas remplaçable.

2593- La carcinose péritonéale représente une maladie métastatique difficile à contrôler.

Divers traitements ont montré une certaine influence sur les carcinoses péritonéales mais de nombreuses questions cliniques restent irrésolues.

Notre unité a choisi de développer la recherche sur cette maladie, quelle que soit son origine : extension d'un cancer de l'ovaire, de l'estomac, du côlon, de l'appendice ou primitive du péritoine.

Pour tester un traitement, une modification du microenvironnement ou des gestes chirurgicaux associés, seuls les modèles in vivo sont pertinents.

A chaque expérience, nous utiliserons un groupe contrôle pour 2 groupes testés, un groupe testé correspondant à un type de traitement, une stratégie chirurgicale ou autre. Cela permettra de diminuer le nombre d'animaux. Nous pouvons également être amenés à utiliser un troisième groupe dans le cas d'une association entre 2 médicaments ou gestes chirurgicaux associés.

Les points limites sont les suivants: perte de poids >20%, modification du comportement et de l'apparence physique. Ces points seront surveillés deux fois par semaine pour permettre de limiter la douleur de l'animal à son minimum. Aussi, afin de limiter la souffrance des animaux, ils auront une injection d'analgésique en préopératoire qui sera renouvelée toutes les 24 heures pendant les 48 heures post-opératoires.

Nous envisageons d'utiliser au maximum 398 souris pendant la durée du projet.

Pour reproduire la maladie nous voulons créer dans un premier temps un modèle de carcinose péritonéale plus ou moins limitée en fonction de ce que l'on veut étudier. Pour cela, nous injecterons entre 10 000 et 10 000 000 de cellules humaines de cancer ovarien, gastrique ou colique dans la cavité péritonéale des souris immuno-déficientes nues (système immunitaire affaibli) ou des cellules murines de cancer ovarien, gastrique ou colique dans la cavité péritonéale de souris immuno-compétentes balb/c (système immunitaire normal).

Pour cette première partie, 100 animaux au maximum seront nécessaires au cours des 5 années du projet, sachant qu'on n'aura pas besoin de refaire cette expérience à chaque fois.

La deuxième partie de l'étude consistera à évaluer l'effet de différents types de traitement et modification du microenvironnement selon des modèles expérimentaux déjà connus par le laboratoire.

Pour cette deuxième partie, 298 animaux seront nécessaires au cours des 5 années du projet.

Seront réalisées l'analyse de la croissance tumorale et l'évaluation du score de carcinose péritonéale par bioluminescence (cellules marquées avec le gène de la luciférase). L'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux) sera analysée en échographie doppler des artères à destination digestive (artère mésentérique supérieure et tronc coeliaque).

Les points limites sont les suivants : perte de poids >20%, comportement anormal (yeux fermés, dos voûté, isolement), apparence physique anormale (automutilation, plaies), gêne pour se déplacer. Nous effectuerons une visite les 2 jours suivants les procédures. Ensuite, ces points seront surveillés 2 fois par semaine et consignés dans un cahier de suivi par l'expérimentateur pour permettre de limiter au minimum la douleur de l'animal. Afin de limiter la souffrance des animaux, ils auront une injection d'analgésique en préopératoire qui sera renouvelée toutes les 24 heures pendant les 48 heures post-opératoires. Aussi, les souris disposeront de fibres de peupliers leur permettant de construire un nid et ainsi améliorer leur condition d'hébergement. En cas d'atteinte des points limites, ils seront mis à mort considérant qu'il s'agit d'une complication post-opératoire ou de l'évolution de la maladie.

2594- La borréliose de Lyme est une infection animale transmise à l'Homme par piqûre de tiques. Les agents responsables de cette infection sont des spirochètes du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato, transmises à l'hôte au cours du repas sanguin de l'arthropode. Dans la plupart des cas cette transmission induit au point de piqûre, une inflammation cutanée :

l'érythème migrant. Après dissémination, les manifestations cliniques peuvent être de nature neurologique, articulaire ou dermatologique. Il a été montré que la salive de la tique augmente la virulence des spirochètes inoculés. La modulation de l'immunité innée par la salive de la tique semble constituer une stratégie utilisée par la bactérie afin d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte vertébré.

Le but de cette étude est d'analyser l'inflammation cutanée initiale au point d'inoculation des bactéries, notamment le rôle de l'interleukine 1 dans le développement de l'infection. Pour cela, nous avons établi différents modèles expérimentaux d'infection chez des souris C57BL6 âgées de 3-4 semaines et des souris IL-1 KO, utilisant l'inoculation des bactéries *Borrelia burgdorferi* à la seringue ou via des tiques infectées.

Les organes (peau au point d'inoculation, oreille, vessie, cœur, articulation) sont prélevés pour s'assurer de l'infection chez la souris et de la dissémination de la bactérie vers les différents organes cibles. Par RT-PCR quantitative en temps réel, nous analysons la cinétique d'expression de certains gènes de l'immunité innée au point d'inoculation, c'est à dire dans la peau.

Le but est de détecter des marqueurs de l'inflammation cutanée induits au cours de l'infection et arriver ainsi à une meilleure compréhension de la transmission précoce et de la physiopathologie de la maladie de Lyme. Cette étude nous permet aussi de mesurer l'effet immunosuppresseur de la salive de tique et souligne le rôle essentiel de la tique dans la transmission précoce de la maladie et cela sera d'autant plus visible que nous étudions en parallèle le type sauvage de la souris et le type IL-1 KO. L'IL-1 est une cytokine pro-inflammatoire très importante dans tous les processus inflammatoires au cours de l'immunité innée.

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

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

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

Les animaux qui sont infectés via les tiques ne peuvent pas être hébergés en groupe ils seront donc hébergés seuls mais leur cage sera très proche de celle de ses congénères afin que la souris puisse ressentir la présence des autres par l'odorat et par la vue.

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

Le nombre de souris utilisées au cours de cette étude est de 140 pour la souche de souris C57BL6 sur 5 ans.

Le nombre de souris utilisées au cours de cette étude est de 280 pour la souche de souris C57BL6 IL-1 KO sur 5 ans.

Plusieurs espèces de *Borrelia* sont testées (*B. burgdorferi* ss N40 et *B. afzelii*). Pour ces souches de *B. burgdorferi* ss et une de *B. afzelii*, ces deux espèces de bactéries sont inoculées soit à la seringue, soit via des tiques infectées (140 souris pour chaque espèce).

Pour avoir des tiques infectées il nous faut utiliser 4 souris soit pour les deux souches 8 souris.

Nous utiliserons pour ce projet 428 souris.

2595- Un isolateur d'élevage est une enceinte fermée dans laquelle 14 porcelets nouveau-nés sont élevés durant 14 jours au maximum. Ces animaux sont issus de truies ayant mis bas naturellement ou par césarienne. Cette technique de production originale permet la production d'animaux indemnes des contaminants spécifiques des porcs (EOPS) qui peuvent être utilisés dans le cadre d'opérations d'assainissement sanitaire des élevages et/ou des schémas de sélection et de multiplication. Cette technique permet également la production de porcelets pouvant être utilisés à des fins expérimentales : les études portant sur l'installation des flores digestives, la production d'organes et de sang, etc.

Au cours des 14 jours d'élevage, les porcelets sont élevés dans un milieu confiné et n'ont aucun contact direct avec le milieu extérieur. L'air est filtré et la manipulation des porcelets par les techniciens est permise au travers de gants. L'absence de contact avec la mère peut générer un stress préjudiciable aux jeunes animaux. C'est pourquoi, durant la phase d'élevage, ces animaux font l'objet d'une attention de tous les instants. Ils sont élevés en groupes stables dans des conditions de confort jugées optimales : plaques de couchage, lampes chauffantes offrant des conditions thermiques satisfaisantes, objets manipulables, tétines type « sucette » délivrant du lait toutes les deux heures, accompagnement lors des prises alimentaires, accès à de l'eau fraîche à discrétion, lumière naturelle et veilleuse la nuit, fond sonore musical, etc.

Les porcelets sont élevés sur un sol composé majoritairement d'une grille ajourée pour faciliter l'évacuation des urines et des fèces. Ils sont alimentés toutes les deux heures, de 7 h 30 à 21 h 30, à l'aide d'un mélange de poudre de lait et d'eau. Le suivi des animaux peut se prolonger dans la nuit ou débiter plus tôt le matin selon les besoins.

Cette demande d'autorisation de projet concerne la production de 420 animaux en isolateur sur 5 années. A cela, il faut ajouter 30 truies en gestation permettant la production de ces porcelets, soit un besoin total de 450 animaux.

2596- La mise en place d'une immunité anti-tumorale efficace est entravée par de nombreux facteurs. En particulier, certaines enzymes dites « immunosuppressives » sont associées à un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer quand elles sont exprimées par les cellules tumorales et/ou par les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs. Notre équipe s'intéresse aux effets de l'une de ces enzymes dont le rôle est très controversé. Principalement étudiée dans des modèles de

tumeurs transplantées, elle peut en effet soit favoriser ou contrôler le développement tumoral. Nous émettons l'hypothèse que son rôle puisse être différent selon le stade précoce ou tardif de la pathologie. Notre projet consiste donc à étudier son rôle tout au long de la carcinogénèse dans un modèle expérimental murin de tumeur spontanée métastatique que nous exploitons depuis plus de 10 ans. Notre collaboration avec un service clinique a permis de vérifier la pertinence de ce modèle, très proche de la pathologie humaine. Ce modèle permet d'étudier *in vivo* les premières interactions entre les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement tumoral, étude qui pour des raisons éthiques évidentes, est impossible à réaliser chez l'homme.

Récemment, nous avons identifié une nouvelle cellule immunitaire capable d'exprimer l'enzyme au niveau de la tumeur primaire de nos souris. Notre projet consiste à évaluer si l'absence de cette population cellulaire retarde ou bien favorise le développement des métastases *in vivo*. Notre projet requiert la création d'une nouvelle lignée de souris à phénotype dommageable puisqu'elle développe spontanément un cancer métastatique. Nous comparerons la maladie chez les animaux ayant ou non cette cellule immunitaire. La grande variabilité de développement tumoral d'une souris à l'autre, ce qui est également le cas chez l'homme, implique de travailler sur des cohortes de souris importantes, mais notre expertise sur le modèle permet d'estimer que l'étude de 80 souris par groupe est suffisante pour l'obtention de données statistiques fiables. À 1 ou 6 mois, nous autopsierons les animaux pour une analyse post-mortem des cellules immunitaires infiltrant la tumeur primaire et les métastases. Nous privilégierons la mort des animaux si ceux-ci montrent des signes de souffrance liée au développement naturel du mélanome pendant la période de suivi clinique, car la prise d'analgesique risque d'affecter le développement tumoral et/ou les résultats de l'analyse des cellules post-mortem. Nous explorerons également si l'enzyme exprimée par cette cellule immunitaire est impliquée dans la progression tumorale. Cette étude nécessitera l'utilisation de trois autres espèces de souris, dont seulement deux subiront des procédures expérimentales. En résumé, les expériences seront réalisées sur des souris de fond génétique C57BL/6 sauvages et génétiquement modifiées. En conformité avec les exigences 3R, nous utiliserons des lots d'un nombre réduit d'animaux. Aucun acte chirurgical n'est prévu. Les animaux sacrifiés seront analysés *ex vivo*. Le nombre total d'animaux est estimé à 200 souris pour l'ensemble du projet qui se déroulera sur cinq ans.

Nos résultats récents suggèrent que l'enzyme que nous étudions pourrait être une cible importante dans le traitement du cancer. Ce projet permettra d'élucider les mécanismes par lesquels cette enzyme favorise la progression tumorale.

2597- Les maladies neuropsychiatriques affectent près d'un milliard de personnes dans le monde. L'allongement de la longévité est un facteur de risque majeur à l'augmentation de ces maladies. Le retentissement social pour les patients et leurs familles est considérable en raison des handicaps moteurs, intellectuels et psychiques qui en résultent. De ce fait, les conséquences économiques et sociales sont très significatives. Les maladies neuropsychiatriques les plus connues sont la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la schizophrénie et la dépression.

L'objectif de ce projet est d'analyser les gènes susceptibles de contribuer à ces pathologies et de rechercher des candidats médicaments efficaces par une approche qui consiste à travailler sur des cultures de cellules issues de souris transgéniques pour lesquelles les gènes ont été surexprimés ou supprimés. Ces études dites « *in cellulo* » permettent d'objectiver en imagerie des paramètres qui ne peuvent pas l'être ou beaucoup plus difficilement sur des organismes modèles entiers et sont complémentaires des études *in vivo* et *ex vivo*.

Le projet sera utilisé lors du développement préclinique de produits pharmacologiques comme test de screening secondaire pour des composés qui auront déjà montré une efficacité dans des tests biochimiques (screening primaire). Il peut donc permettre d'orienter la sélection des produits à tester ensuite sur organisme entier, et donc de réduire le nombre d'étude *in vivo/ex vivo* à planifier, et donc le nombre d'animaux à utiliser pour ces études.

Les caractéristiques de ces cultures primaires restent très proches de celles d'un organisme entier, et dans un contexte transgénique, proches de celles inhérentes à la pathologie humaine. La sélection de candidats médicaments a ainsi une meilleure valeur prédictive comparativement aux cultures de cellules dites immortalisées et qui ne nécessitent pas de recours à l'animal.

Il est nécessaire d'effectuer des prélèvements de parties du cerveau à des stades de développement fœtal, moment auquel les cellules présentent les meilleurs taux de viabilité.

Les caractéristiques cellulaires seront ensuite évaluées au moyen de techniques d'imagerie ou biochimiques: toxicité cellulaire, hyperphosphorylation et agrégats de protéines, croissance neuronale, morphologie cellulaire, stabilité des microtubules, trafic intracellulaire d'organites ou de vésicules. Dans un second temps, comme dans le cadre des études *in vivo/ex vivo*, il sera possible, dans le cadre de ce projet, de tester la capacité de composés candidats médicaments à supprimer les anomalies cellulaires observées. Dans ce projet, les produits testés seront directement introduits dans les puits de culture cellulaire.

Les lignées de souris transgéniques envisagées, reproduisant des pathologies humaines, sont susceptibles de développer en vieillissant un phénotype dommageable. Mais grâce à des informations acquises dans la littérature et en interne, relatives au développement de ce phénotype, ces animaux seront utilisés à un âge antérieur à l'apparition des premiers signes comportementaux (troubles moteurs et/ou cognitifs).

Les femelles gestantes feront l'objet d'une surveillance quotidienne entre leur arrivée et leur utilisation (1 à 5 jours), avec, en cas d'apparition d'un signe de souffrance, application des points limites mis en œuvre pour tous les mammifères utilisés dans l'établissement. Les cages de toutes les femelles gestantes seront enrichies par la présence de mouchoir de cellulose « nesting material ».

On peut estimer le nombre de souris nécessaires à la conduite de ce projet sur 5 ans à environ 1400.

2598- Le laboratoire étudie les mécanismes clés de la neurogenèse dans le cortex cérébral au cours du développement embryonnaire et postnatal chez la souris. La déficience de ce gène COUP TF1 (appelé aussi NR2F1) est reconnue chez l'humain comme entraînant un retard mental et des atrophies optiques. Chez la souris, la délétion complète entraîne des perturbations lors de la formation du cortex (et pouvant donc entraîner des modifications comportementales comme la dépression et l'anxiété) ainsi qu'une réduction de volume de l'hippocampe ce qui pourrait se traduire par des modifications comportementales en terme d'apprentissage et de mémoire spatiale. De plus, une autre modification génétique peut entraîner une expression partielle de ce gène au niveau des progéniteurs corticaux et de l'éminence latérale.

Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons déterminer l'implication de COUP TF1 sur des comportements d'intérêts (anxiété et dépression) en fonction de son expression régionale et indirectement de déterminer le rôle respectif des différentes structures sur ces comportements.

En accord avec la règle des 3Rs, le Raffinement a été effectué afin de réduire l'inconfort des animaux au strict minimum exigé par les tests :

La durée minimale sera appliquée pour chaque test, afin de réduire le stress auquel seront exposés les animaux. Afin de limiter le nombre total d'animaux utilisés (Réduction) ceux-ci seront soumis successivement à chacun des différents tests comportementaux. Bien qu'il existe un gène homologue chez les invertébrés, il n'existe pas chez ceux-ci de modèles de Remplacement pour des études intégrées comme la mémoire, l'anxiété ou la dépression aussi fines que chez la souris. L'anxiété sera étudiée dans le test de Dark-light box et le caractère compulsif par un test simple d'enfouissement de billes. Le caractère dépressif sera enregistré par un test de résignation (Porsolt's test). Enfin, le caractère anhédonique de la dépression sera analysé dans un test de préférence au sucrose. Afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables, un nombre de 60 souris mâles adultes a été fixé pour cette étude.

2599- L'ischémie reperfusion est une séquence rencontrée dans de nombreuses pathologies ou interventions chirurgicales dont la chirurgie réparatrice de l'aorte et la transplantation rénale. Elle est responsable de dysfonctions à long terme des organes. L'ischémie d'un organe correspond à la phase où l'organe est isolé de la circulation sanguine et subit un défaut d'apport en nutriment et en oxygène. La reperfusion se traduit par une reprise de la circulation sanguine en lien avec le retour de l'apport en nutriment et de l'oxygène. Cette séquence est connue pour entraîner des lésions sévères de l'organe en particulier liées à la production de molécules oxydantes. Ainsi, des dérivés à propriétés antioxydantes sont des candidats intéressants pour limiter les lésions d'ischémie reperfusion. Dans un modèle de culture cellulaire, les résultats préliminaires ont montré que des composés isolés à partir des sarments de vigne appelés stilbénoides ou des dérivés polyphénoliques offraient une protection significative contre les dommages liés à l'hypoxie réoxygénation mimant l'ischémie reperfusion au sein d'un organe. Dans ce projet, nous voulons mettre en évidence le rôle protecteur de ces composés dans un modèle d'ischémie reperfusion rénale in vivo chez le rat. Pour cela nous utiliserons des rats males de souche Sprague-Dawley qui seront utilisés pour répondre aux 2 objectifs de ce projet. Le premier objectif est de déterminer le passage sanguin de deux de ces composés suite à leur injection en intrapéritonéale. Pour cela, nous déterminerons la concentration sanguine de chacun des produits pendant 24h suite à leur injection. Le deuxième objectif de ce projet est destiné à tester ces molécules dans la protection des lésions d'ischémie reperfusion rénale. Une ischémie rénale bilatérale de 60 minutes sera réalisée chez ces animaux associée à une reperfusion de 3h et 7 jours. La fonction rénale sera évaluée ainsi que les lésions du rein à 3h et 7 jours. Le sacrifice à 7 jours permettra de déterminer l'efficacité de ces dérivés sur la reprise de la fonction rénale post ischémie et le sacrifice à 3 heures permettra de préciser le mécanisme d'action des dérivés dans les premières heures de reperfusion caractérisées par une production importante de molécules oxydantes.

La règle des 3R a été prise en compte dans ce projet. Ainsi, afin d'étudier la séquence d'ischémie-reperfusion, les méthodes d'étude in vitro sont très limitées en raison de l'absence de vascularisation permanente de l'organe ou des cellules et de l'impossibilité d'étudier in vitro les multiples conséquences de l'ischémie-reperfusion. Il est donc nécessaire d'évaluer le bénéfice de molécules protégeant des lésions d'ischémie reperfusion en utilisant un modèle animal. Pour ce projet de 3 ans, nous utiliserons les mêmes animaux pour répondre aux 2 objectifs de ce projet, ce qui nous donne un total de 96 rats. Ce nombre d'animaux est le minimum requis pour les analyses statistiques et découle d'un compromis entre les questions de minimisation d'une part et l'accès à l'information scientifique d'autre part. Toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie et les animaux, hébergés par 2, bénéficieront d'une analgésie afin de réduire au minimum la douleur liée à la chirurgie.

2600- De nombreuses molécules thérapeutiques injectables utilisées dans les traitements contre les cancers ou les maladies métaboliques ont l'inconvénient d'être éliminées rapidement par l'organisme (durée de demi-vie de l'ordre de quelques heures), ou encore de provoquer des réactions immunitaires de type allergique après injections répétées.

Les produits développés dans ce projet consistent en l'encapsulation de ces molécules thérapeutiques à l'intérieur des globules rouges, permettant ainsi leur protection et augmentant leur durée de vie.

L'ensemble des travaux décrits ici (preuve d'efficacité anti-tumorale, études pharmacocinétique/pharmacodynamique, études de toxicité et d'efficacité) constitue un projet complet d'études exploratoires chez la Souris en vue de valider la formulation optimale des produits, ainsi que leur efficacité thérapeutique sur des animaux avec tumeurs. Ces études nous permettront d'alimenter les dossiers réglementaires de demandes d'autorisation d'études cliniques.

Le nombre d'animaux utilisés dans ces procédures (3000 souris au maximum sur 5 ans, pour l'évaluation complète de 6 traitements) est déterminé comme étant le minimum nécessaire pour obtenir des résultats scientifiquement et

statistiquement fiables. Aucune méthode in vitro alternative ne permet le remplacement des animaux utilisés pour étudier la toxicité éventuelle du produit injecté dans l'organisme.

De même, pour l'efficacité anti-tumorale, les modèles ex vivo existants ne s'avèrent pas suffisamment pertinents pour apporter une preuve de concept fiable.

Aucun effet secondaire grave n'est attendu suite aux injections, mais les animaux seront surveillés durant 1 à 2h suivant cet acte, puis observés tous les jours, et pesés régulièrement.

Les procédures exécutées ne provoqueront qu'un inconfort passager et ne nécessiteront qu'une contention légère.

Les animaux porteurs de tumeurs feront l'objet de soins particuliers, et la croissance tumorale sera évaluée très fréquemment, afin de prévenir toute gêne. Durant l'étude, tout sera mis en œuvre pour minimiser le stress auquel les animaux sont soumis.

Les animaux seront hébergés en groupe (sauf animaux incompatibles), et des éléments d'enrichissement du milieu seront mis à disposition : blocs à ronger, litière papier pour la confection de nids, etc....