



**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 (29)

2901. La myopathie myotubulaire (XLMTM) est une myopathie congénitale très sévère due à des mutations dans le gène MTM1 qui code pour une protéine ubiquitaire, la myotubularine. Cette pathologie, dont l'incidence dans la population masculine est de 1/50 000, ne bénéficie à l'heure actuelle d'aucun traitement et se traduit dans la majorité des cas par un décès au cours de la première année de vie.

Notre projet vise donc à mettre au point une stratégie de thérapie génique pour la XLMTM en utilisant des Virus Associés aux Adénovirus (AAV) afin d'apporter aux cellules musculaires déficientes pour la myotubularine un ADN capable de synthétiser cette protéine.

A ce jour, aucun modèle cellulaire de déficience en myotubularine n'a permis de reproduire le phénotype de la maladie (pas de remplacement possible). De plus, les études précliniques nécessitent le recours à un modèle animal. L'utilisation d'une lignée de souris déficientes pour le gène Mtm1 sera donc nécessaire à la réalisation de nos études. Cette lignée reproduit le phénotype de la maladie humaine avec fidélité (faiblesse musculaire, réduction de l'espérance de vie).

Afin de déterminer le nombre de souris nécessaires à notre étude et surtout de limiter au maximum, selon la règle des 3R, nous avons réalisé une étude statistique, par une approche standard de test de comparaison de moyennes : (cf. 3.3.5) et nous estimons donc à 10 le nombre de souris par groupe à analyser. Pour l'ensemble de notre projet qui durera 5 ans, et compte tenu des paramètres qui seront analysés, nous estimons à 450 le nombre de souris nécessaires à notre étude. Ce chiffre reflète notre effort pour limiter au maximum le nombre de souris utilisées pour notre étude, il sera justifié et détaillé dans le paragraphe 3.4.10.

De surcroît, afin de prévenir tout risque de souffrance excessive des souris, des points limites (raffinement) ont été clairement définis (perte de poids excessive, aspect général de l'animal) et sont maîtrisés par le personnel qualifié en charge de l'expérimentation animale. Par ailleurs, le raffinement sera mis en avant par l'utilisation d'une alimentation adaptée et enrichie pour pallier aux conséquences de la maladie chez l'animal (pâtée hydratante et nourrissante facilement accessible).

Les procédures expérimentales prévues dans ce projet se limiteront au strict nécessaire afin d'atteindre des résultats scientifiquement et significativement valides (réduction). Pour garantir cela, des calculs statistiques prédictifs ont été réalisés.

2902. L'incontinence urinaire n'affecte pas moins de 3 millions de personnes en France et 15 millions aux USA, très majoritairement les femmes. Elle se définit comme la perte incontrôlée et soudaine des urines. Les traitements disponibles (la médication, les agents gonflants, les approches chirurgicales: remontée de vessie ou implantation de sphincter artificiel) présentent plusieurs limites.

Pour l'incontinence urinaire sévère, il n'existe à ce jour aucune solution thérapeutique satisfaisante, les dispositifs médicaux actuels ne permettent pas une continence complète. Nous supportons le développement d'un nouvel implant urinaire artificiel pour traiter l'incontinence urinaire sévère chez la femme. Le dispositif médical innovant permet de fermer l'urètre de façon progressive en serrant un collier en silicone. Ce collier est piloté par un moteur lui-même contrôlé par de la télémetrie.

Cette étude comporte deux phases portant sur un effectif total de 38 porcs femelles adultes, la première phase expérimentale permettra de définir la procédure chirurgicale ainsi que le mode de fermeture du collier sur une durée brève (15 jours) et impliquera 13 animaux, la seconde phase, portera sur les effets de la pose du biomatériel sur une durée plus longue (3 mois) et impliquera 25 animaux.

La règle des 3R est ainsi respectée: la mise en place d'un essai clinique chez l'Homme impose la réalisation de telles études animales de biocompatibilité et d'efficacité des dispositifs médicaux. Ces études sont également l'occasion d'affiner le design du dispositif implantable lui-même ainsi que la technique chirurgicale. Le choix de l'espèce est essentiellement motivé par la proximité anatomique et physiologique avec l'espèce humaine. La taille des groupes expérimentaux est aussi réduite que possible (2 animaux pour la phase aiguë et 8 pour la phase chronique). Les animaux bénéficieront d'un traitement antalgique similaire à celui que reçoivent les patients hospitalisés et d'un suivi quotidien attentif. Les réactions adverses seront traitées lorsque cela est médicalement possible, dans le cas contraire, l'essai sera interrompu pour les animaux concernés.

2903. Les lymphocytes T gamma delta (GD) sont des cellules de l'immunité. Ces lymphocytes GDT interviennent dans la réponse immunitaire globale de l'organisme, c'est-à-dire dans la réponse immunitaire innée et adaptative. Les lymphocytes GDT sont principalement présents dans les muqueuses, le foie, les ganglions lymphatiques et le sang. Ces lymphocytes expriment un récepteur appelé TCRGD qui diffère selon l'origine tissulaire des lymphocytes GDT. Par exemple, les lymphocytes GDT sanguins expriment spécifiquement un TCR appelé VG9D2T. C'est grâce à ce TCR que les lymphocytes VG9D2T sont activés chez des patients infectés par des bactéries car ce récepteur se fixe spécifiquement aux phosphoantigènes bactériens. Il en résulte alors une destruction des bactéries par les lymphocytes VG9D2T. Ce processus de réponse immunitaire est unique aux lymphocytes VG9D2T humains.

Les amino-bisphosphonates sont des agents pharmacologiques utilisés dans le traitement des pertes osseuses associées à l'ostéoporose et aux métastases osseuses de différents cancers. Les pertes osseuses dans ces différentes pathologies sont le fait d'une stimulation exagérée de l'activité des ostéoclastes (cellules responsables de la résorption osseuse). Or les amino-bisphosphonates inhibent l'activité des ostéoclastes. Ils sont internalisés par ces cellules et bloquent l'activité d'une enzyme de la voie du mévalonate, la farnesyl pyrophosphate synthase (FFPS), ce qui conduit à l'inhibition de protéines associées à la survie cellulaire. D'autre part, l'inhibition de l'activité de la FFPS par les aminobisphosphonates entraîne une accumulation intracellulaire d'un phosphoantigène appelé isopentényl pyrophosphate (IPP).

Nous avons montré que les amino-bisphosphonates sont internalisés par les cellules cancéreuses et qu'ils exercent une activité anti-tumorale en bloquant l'activité de la FFPS. Il résulte de cette inhibition de la FFPS une accumulation d'IPP dans les cellules tumorales qui active spécifiquement les lymphocytes VG9D2T humains. Les lymphocytes VG9D2T détruisent alors les cellules tumorales. Fort de ces observations, nous réalisons actuellement un essai clinique appelé NEOZOL au cours duquel des patientes souffrant d'un cancer du sein ont reçu, avant d'enlever chirurgicalement la tumeur, un traitement dit néoadjuvant qui consiste en une chimiothérapie, donnée seule ou en association avec un amino-bisphosphonate: le zolédronate (ZOL). Le but de l'étude est de savoir si le ZOL en association avec une chimiothérapie exerce une activité anti-tumorale supérieure à celle de la chimiothérapie seule. Nous avons au cours de cette étude isolé les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs) qui sont plus ou moins enrichies en lymphocytes VG9D2T selon que les patientes ont été traitées ou non avec du ZOL.

Le but de la présente étude est de savoir si les PBMCs isolées des patientes ayant bénéficié d'un traitement avec le ZOL ont une activité anti-tumorale. Pour répondre à cette question, les PBMCs provenant des patientes avant et après qu'elles aient reçu un traitement avec le ZOL seront injectées à des souris immunodéficientes qui auront été préalablement greffées avec une tumeur mammaire humaine puis traitées avec du ZOL. Après le traitement au ZOL des patientes, les PBMCs sont enrichies en lymphocytes VG9D2T. Si notre hypothèse est exacte, nous anticipons que les PBMCs provenant des patientes après traitement avec le ZOL seront capables d'infiltrer les xénogreffes tumorales et de détruire les cellules cancéreuses du fait de l'activation des lymphocytes VG9D2T. A l'inverse, les PBMCs provenant de ces mêmes patientes avant qu'elles n'aient eu un traitement avec le ZOL n'auront aucune activité antitumorale, car les lymphocytes VG9D2T ne sont pas activés.

Les règles d'expérimentation seront comme suit. Les souris seront tout d'abord placées en stabulation durant une semaine avant le début du protocole, au sein de l'animalerie d'accueil. Elles cohabitent par groupe de quatre dans un environnement enrichi (maison rouge, coton), sous surveillance quotidienne. Tout élément rentrant en contact avec la souris est stérile: nourriture et litière sont irradiées, grilles, cages et biberons sont autoclavés. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Le change de la litière et de la cage s'effectue une fois par semaine par le personnel compétent de l'animalerie. Pendant toute la durée de l'étude, l'état de bien-être des animaux sera évalué quotidiennement. L'observation de signe de douleur ou de mal être (prostration, état du pelage, perte de poids) entraînera la sortie du protocole de l'animal. Lors de l'injection des cellules tumorales, les souris seront anesthésiées à l'Isoflurane. En cas de signes graves de stress associé à un des points limites qui serait atteint en cours d'expérimentation ou l'apparition de nécrose, les animaux seront mis à mort par dislocation cervicale avec sédation préalable. (Raffinement).

Les travaux in vitro préalables ne suffisent pas pour valider l'efficacité de l'activité antitumorale des lymphocytes GDT humains, nous devons utiliser des modèles animaux. Ce modèle animal est le seul qui nous permettra d'évaluer, l'efficacité de l'activité antitumorale des lymphocytes gdT humains dans un modèle animal de cancer du sein. Les modèles in vitro ne pouvant pas mimer la complexité d'un organisme (Remplacement).

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque groupe contiendra le nombre de souris minimum (4 souris par groupe, donc 8 souris par patiente) indispensable à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Un nombre total de 80 souris NOD/SCID sera donc nécessaire (Réduction).

2904. La fièvre Q est une maladie répandue imputable à une bactérie, *Coxiella burnetii*, capable d'infecter les mammifères, les oiseaux, les reptiles et les arthropodes. Elle donne lieu à une forme atténuée chez les ruminants mais peut provoquer des avortements et une mortalité néonatale chez les bovins, les ovins et les caprins. Il s'agit d'une zoonose, c'est-à-dire une maladie d'origine animale pouvant se transmettre à l'homme. Le contrôle de la fièvre Q en élevage et des risques d'exposition humaine, passe par une meilleure connaissance de son épidémiologie. En particulier, tout ce qui peut concerner l'identification des animaux porteurs et excréteurs de la bactérie (dépistage et détection précoce), la quantification de cette excrétion, les modalités d'excrétion du germe (moment de l'excrétion, durée, intensité par les voies vaginales, fécales et lactées). Mais également l'accumulation de données relatives à l'agent causal lui-même (caractérisation des souches, identification de facteurs de virulence, étude de la résistance, évaluation de la vaccination) permettrait la mise en place de mesures prophylactiques et sanitaires les plus appropriées.

Ce projet a pour but de réaliser l'isolement et la production de la bactérie *C. burnetii* en phase I à partir de prélèvements cliniques animaux ou environnementaux. Ces productions permettront de réaliser les études de caractérisation, plus fines, des souches de *C. burnetii* et la validation et/ou le développement de techniques d'isolement, de détection, de viabilité et de génotypage. Ce projet passe par l'inoculation de prélèvements (cliniques ou environnementaux) ou de tissus à des souris immunocompétentes qui constituent le modèle de choix.

C. burnetii étant intracellulaire obligatoire, les études de l'organisme vivant ne sont réalisables que grâce à l'utilisation d'animaux hôtes. L'utilisation de systèmes *in vitro* à base de cellules reste limitée car le pouvoir pathogène de la bactérie est atténué par ces techniques. Le nombre total d'animaux prévus pour les cinq ans de ce projet est de 330 souris, y compris les animaux témoins, pour une centaine d'échantillons étudiés.

Il s'agit de jeunes souris mâles (4-6 semaines) car, bien que sensibles à l'infection à *C. burnetii*, les jeunes animaux contrôlent mieux l'infection que les souris âgées. Les souris mâles sont plus sensibles que les souris femelles à l'infection de par l'effet protecteur des hormones femelles. Les souris sont hébergées au sein d'une animalerie de confinement de niveau 3 dans des cages ventilées individuellement, garnies de litière en cellulose et enrichies de matériaux de construction de nid. Elles reçoivent, *ad libitum*, une alimentation et de l'eau potable stériles et sont hébergées en groupe. Les conditions de température et d'hygrométrie nécessaires au bien-être des animaux sont également suivies. L'infection des animaux se déroule sur une période maximale de 10 jours. Il est à noter, lors d'études ultérieures utilisant ce modèle qu'aucun animal n'a présenté de complications avant la fin du protocole expérimental. Toutefois, une observation journalière est effectuée pour détecter tout signe de souffrance d'un animal (même si la dose infectieuse choisie reste suffisamment faible pour qu'aucune souffrance ne soit exprimée par les animaux). Les animaux présentant, éventuellement, des signes d'inconfort ou de stress recevront un traitement pour réduire la douleur ou bien seront euthanasiés si les signes sont trop importants.

2905. Les lagomorphes sont régulièrement utilisés dans la recherche pré-clinique dans le domaine de la santé humaine. Ils sont notamment inclus dans des études de biocompatibilité ou d'évaluation de la résorption locale d'un produit d'intérêt médical dont le but est de déterminer la réponse de l'organisme au niveau du site d'administration (évaluation des réactions locales et/ou suivi de la résorption du produit).

L'enjeu de ce projet est donc la réalisation d'administration de produit d'intérêt médical (dont des anti-inflammatoires) dans l'articulation du grasset et ensuite de vérifier la tolérance locale / innocuité ou de déterminer la résorption au niveau de cette articulation pour déterminer l'évolution du produit. Dans ce type d'étude, un suivi du produit dans l'organisme entier (détection dans le sang/plasma) est également possible.

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement de reproduire la diffusion ou la réponse de l'organisme suite à administration d'un produit en intra-articulaire, il est indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier le produit.

Ce projet se déroulera sur plusieurs études et selon deux procédures expérimentales: ponction de la capsule intra-articulaire pour injection et prélèvement de liquide synovial et prélèvements sanguins répétés, afin de suivre la pharmacodynamie et pharmacocinétique des produits administrés. Seuls des lapins seront utilisés et chaque intervention sur l'articulation se fera sous anesthésie générale et le nombre de prélèvements (sang et synovie) sera toujours réduit au minimum.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés par groupe (si possible car incompatibilité entre mâles, par exemple) dans des cages comprenant du matériel d'enrichissement adapté (ex: tablette cachette, buchette à ronger...) et en ayant un contact visuel avec ses congénères. Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place pour l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels effets secondaires pour une prise en charge rapide (observation de l'état de santé général, consommation alimentaire et hydrique...).

Au total, au maximum 600 animaux pourront être utilisés en 5 ans. Pour chaque étude, les données existantes sur le produit à tester et notamment sur la variabilité des résultats attendus, permettront de calculer au plus juste le nombre d'animaux nécessaires. Dans le cas de produits encore inconnus, des phases pilotes sont prévues avec moins d'animaux (environ 10 pour ne pas invalider les résultats en considérant la variabilité inter-individuelle), afin de sélectionner éventuellement les médicaments candidats pour une phase pivot et de déterminer le nombre d'animaux nécessaires.

2906. L'imagerie médicale par Résonance Magnétique (IRM) servant au diagnostic de nombreuses pathologies cérébrales (accident cérébral vasculaire, tumeurs, Alzheimer, ...) est basée sur le phénomène de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Sous l'effet d'un champ magnétique intense, certains noyaux se magnétisent. Cette aimantation macroscopique peut être exploitée pour déterminer les structures moléculaires. Conventionnellement, la RMN se focalise sur la détection des protons (^1H) car ce noyau est de loin le plus abondant et permet une excellente visualisation des tissus mous (via la détection de l'eau - H_2O).

A très haut champ magnétique, cette aimantation s'accroît ce qui ouvre la voie de l'imagerie de noyaux moins abondants tels que le carbone-13 (^{13}C), le lithium-7 (^7Li), l'oxygène-17 (^{17}O), le phosphore-31 (^{31}P) ou le sodium-23 (^{23}Na). Ces nouvelles approches d'imagerie offrent des perspectives extrêmement intéressantes pour l'étude non-invasive du métabolisme énergétique (ATP, phosphocréatine), de la neurotransmission (glutamate, GABA) ou encore pour caractériser les équilibres osmotiques (distribution intra- et extracellulaire de sodium). Cette multitude d'informations physiologiques et biochimiques pourraient à terme aider dans la compréhension des processus physiopathologiques des maladies neurodégénératives et pour l'évaluation de nouvelles thérapies.

Notre objectif est le développement et la validation d'outils dédiés à la RMN à haut champ (7 et 11,7 Tesla), notamment les antennes radiofréquences, et les schémas d'acquisition optimisés pour les différents noyaux non-proton observables *in vivo*. La mise en place de nouveaux outils pour l'imagerie cérébrale permettra de réaliser un suivi plus précis de l'état du cerveau

des patients et des modèles de primate non humain utilisés pour caractériser les mécanismes associés à ces maladies neurodégénératives.

Afin de réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire, les tests préliminaires seront systématiquement menés sur des objet-tests. Le nombre d'animaux a été réduit à un effectif de 10 nécessaire à la réalisation de 5 tests par semaine compte tenu du délai minimal de 15 jours entre chaque examen RMN. Par ailleurs, cet effectif devrait être suffisant pour acquérir des données de référence. D'autant plus que chaque animal sera réexaminé à plusieurs reprises (suivi longitudinal).

Afin de démontrer l'innocuité du champ magnétique de 11,7T et ainsi répondre aux exigences de l'ANSM, une étude ancillaire sera menée au cours de la première année de ce projet afin de suivre les fonctions mnésiques et exécutives (délivrés sur écran tactile sans restriction hydrique ou alimentaire) chez le macaque adulte exposé.

Le modèle primate se justifie par les similitudes anatomiques, physiologiques et biochimiques fortes permettant une extrapolation de nos protocoles aux conditions de la recherche clinique chez l'Homme. Les animaux utilisés pour ce projet sont nés et élevés dans des élevages agréés. Pour accumuler le maximum de données informatives après imagerie à très haut champs magnétique, les animaux seront soumis à des prélèvements sanguins. Leur hébergement enrichi suit les règles en vigueur de l'animalerie et les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance : anesthésie lors des examens RMN et paramètres physiologiques suivis en continu pour intervenir immédiatement. Des critères d'arrêt sont prévus dans ce projet afin de prendre en compte des effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation mettra en œuvre des traitements appropriés ou décidera d'une euthanasie.

2907. Le virus de la bursite infectieuse aviaire (IBDV) est le principal virus immunodépresseur chez le poulet (*Gallus gallus*). Il détruit les lymphocytes B (cellules du système immunitaire, responsables des réactions de défense de l'organisme contre les substances qu'il considère comme étrangères) de la Bourse de Fabricius (BdF, organe producteur des lymphocytes B chez les oiseaux) qui en temps normal produisent les anticorps protégeant les animaux des infections microbiennes.

Du fait de la destruction de leurs lymphocytes B par le virus, les sujets qui survivent à une infection par l'IBDV sont immunodéprimés (leur système immunitaire est affaibli). La mesure du potentiel immunodépresseur des souches d'IBDV constitue une étape importante de l'évaluation de leur pouvoir pathogène, obligatoire par exemple pour vérifier l'innocuité des souches virales atténuées utilisées comme vaccin vivant de la bursite infectieuse. Pour mesurer le pouvoir immunodépresseur de l'IBDV, un test de référence *in vivo* est normalisé par la Pharmacopée Européenne. Il prévoit une vaccination des poulets avec le vaccin IBDV à tester, suivie d'une vaccination dirigée contre un virus infectant également le poulet : le virus de la maladie de Newcastle (NDV). Les animaux sont ensuite infectés avec une souche virulente de NDV. La protection des animaux vaccinés NDV montre l'absence d'immunodépression induite par le vaccin contre l'IBDV. Chez les animaux non protégés, un point-limite basé sur l'intensité des signes cliniques de la maladie de Newcastle est défini : au-delà de ce point limite, une euthanasie compassionnelle sera pratiquée. L'espèce cible étant les volailles, ce projet ne peut se faire sans le recours à l'expérimentation animale sur des poulets. Le nombre minimum d'animaux requis par souche d'IBDV testée est de 30. Le projet, mené sur 5 ans, prévoit d'utiliser un nombre maximal de 600 poulets.

2908. Le neuroblastome est un cancer pédiatrique apparaissant dans 60% des cas chez des enfants de moins de 2 ans. Il est responsable de plus de 15% de la mortalité infantile liée au cancer. Le comportement de cette tumeur maligne est caractérisé par une hétérogénéité clinique marquée, allant de la régression spontanée chez certains patients à une inexorable et agressive progression métastatique chez d'autres. Les tumeurs primaires surviennent dans l'abdomen chez 70% des patients, le plus fréquemment dans la glande surrénale ou dans les ganglions sympathiques du thorax. La moelle osseuse et les os sont les sites les plus courants de métastases. Celles-ci sont présentes approximativement chez la moitié des patients. Par conséquent, les intensités du traitement du neuroblastome doivent être adaptées à la fois à la localisation de la maladie, mais aussi à son caractère invasif. Chez les patients les plus à risque, le traitement intensif par chimiothérapie se rapproche rapidement des limites de toxicité, en termes d'effets aigus et tardifs. De nouvelles approches plus spécifiques des tumeurs et globalement moins toxiques doivent être développées pour le traitement des neuroblastomes métastatiques agressifs.

L'objectif de ce projet est d'étudier le pouvoir anti-tumoral et de caractériser la voie de signalisation d'une famille de molécules présentes chez les patients à bas risque ou à régression spontanée, mais absent chez les patients présentant un neuroblastome métastatique.

Deux lignées humaines de cellules neuroblastiques agressives, isolées à partir de métastases osseuses de patients, seront injectées par voie sous-cutanée, au niveau des flancs des souris BALB/c nude, afin d'évaluer les effets anti-tumoraux de cette famille de molécules (miR30, Plexine A1 et Sema3c).

Ces souris immunodéficientes seront gardées au sein de l'animalerie d'accueil dans un environnement protégé de tous risques infectieux. Elles cohabitent par groupe de cinq dans un environnement enrichi par du matériel de nidification pour garantir un environnement social, sous surveillance journalière. L'observation de signes de douleurs ou de mal être (prostration, état du pelage, perte de poids) entraînera la sortie du protocole de l'animal. Enfin, si l'animal présente des signes de souffrance ou taille de tumeur importante, il sera euthanasié (Raffinement).

Nous utiliserons le modèle murin pour étudier la croissance tumorale des cellules de neuroblastomes *in vivo*, en modèle préclinique (Remplacement).

Afin de réduire le nombre de souris utilisé, chaque groupe contiendra le nombre minimum d'animaux (10 souris par groupe) indispensable à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Un nombre total de 140 souris sera nécessaire (Réduction).

2909. 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, les ovins sont infestés par le nématode gastro-intestinal du genre *Marshallagia* dans les régions steppiques et cause des lésions au niveau intestinal. Ce strongle a un comportement écologique très différent des autres strongles et nécessite donc d'être étudié. Ce ver est ingéré sur la pâture et se loge au niveau d'un des estomacs de l'animal. Il faut 30 à 35 jours pour que les larves ingérées se développent en adultes et pondent des œufs dans la lumière de l'estomac. Ces œufs sont retrouvés dans les matières fécales.

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 ovins âgés de 3 mois au moins pour obtenir des larves. Une suspension de parasites sera inoculée par voie orale aux ovins 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. En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et les carcasses seront commercialisées. Il s'agit dans ce projet d'utiliser un maximum de 5 animaux sur 5 ans pour multiplier 1 isolat de parasites.

Raffinement: Les animaux seront maintenus en bergerie tant que les parasites n'émettent pas d'œufs (20 à 30 jours après infestation) puis seront maintenus en cages par deux pendant 60 jours maximum. Dans les deux conditions, les animaux auront un enrichissement social: ils seront au minimum deux et pourrons avoir un contact physique ou visuel permanent.

2910. L'enseignement de la médecine, de la chirurgie et des soins infirmiers est une démarche pédagogique progressive qui fait appel à des enseignements théoriques, à des démonstrations avec des moyens multimédia, et également à des démonstrations et travaux pratiques avec des animaux sains. La pratique de l'art vétérinaire avec les chevaux est une discipline particulière, avec des animaux réputés sensibles, avec des méthodes d'examen clinique et d'examen complémentaires bien spécifiques. De mêmes, les soins infirmiers nécessitent de bien connaître les besoins des équidés et leurs réactions pour que le praticien puisse les réaliser en toute sécurité pour l'animal et pour lui. L'enseignement pratique de ces notions nécessite donc le recours à des chevaux vivants sains, pour que les étudiants puissent s'initier aux gestes simples du palefrenier jusqu'à maîtrise, progressivement les gestes les plus complexes que les vétérinaires utilisent dans la pratique de la médecine vétérinaire courante. Notre établissement forme des étudiants à devenir des vétérinaire généralistes, des vétérinaires spécialistes, mais aussi des infirmiers vétérinaires. Pour ce faire, le recours aux seules explications théoriques ou méthodes par vidéo ne sont pas suffisantes. Nous devons recourir à des chevaux en nombre suffisant pour permettre à chaque étudiant de pouvoir apprendre les gestes nécessaires à sa pratique sans pour autant trop utiliser et fatiguer les chevaux. Nous utilisons donc un effectif de 20 chevaux sur 5 ans. Un système de suivi de l'utilisation de ces animaux limite strictement les utilisations des chevaux pour éviter qu'ils ne soient trop sollicités. On détermine ainsi le temps de repos après chaque utilisation et le nombre maximal d'utilisations par an. Ces chevaux sont en utilisation continue et il n'est pas possible d'utiliser ces chevaux pour des procédures expérimentales qui seraient douloureuses ou invasives ou pour des procédures pédagogiques non décrites. Ces chevaux sont maintenus en troupeau, dans des pâtures entretenues, disposant ainsi d'un grand espace libre, ils vivent dans des conditions comparables à tous les chevaux de sport ou de loisir. Une équipe de techniciens et vétérinaires qualifiés assurent leurs soins quotidiens et suivent et répertorient leur état de santé, en évitant ainsi l'utilisation de tout cheval qui serait temporairement malade ou indisposé.

2911. Le seuil du Pont du Loup est situé en queue de retenue du Sautet au niveau de la confluence du Drac dans le département des Hautes-Alpes. Il s'agit d'un ancien barrage partiellement arasé qui joue aujourd'hui un double rôle de stabilisation du profil du Drac et de socle d'appui pour le Pont du Loup. La question du franchissement de cet obstacle par les truites a été inscrite au programme d'actions du contrat de rivière Drac Amont (fiche action B1.9.2). C'est dans ce cadre qu'une étude pour mieux connaître les besoins et les conditions de franchissement du seuil du Pont du Loup pour les géniteurs de truite de lac est conduite. L'échantillonnage de la retenue selon la norme EN 14757 réalisée en octobre 2009 a montré la présence d'une population abondante de truite fario et composée de plusieurs classes d'âge. Ces résultats traduisent probablement des conditions de continuité écologique entre la retenue et ses deux tributaires, la Souloise et le Drac. En effet, le seuil du Pont du Loup est un obstacle non-permanent au transit piscicole puisque sa franchissabilité est assurée lorsque la cote de la retenue du Sautet est égale ou supérieure à la cote du seuil (cote 757). Cependant cette cote ne peut pas être maintenue pendant de longues périodes par le gestionnaire hydro-électricien de la retenue en raison des contraintes hydrologiques et des demandes en électricité.

Il n'existe aujourd'hui aucun élément sur les comportements migratoires des géniteurs de truite (période, durée) pour permettre d'assurer des conditions optimales de franchissement. Les principales questions essentielles identifiées sont : A partir de quand et pendant combien de temps le seuil doit-il être franchissable ? Y a-t-il des périodes de migration à

privilégier? Et des durées optimales ? Quels sont les autres paramètres importants à prendre en compte (débit du Drac, T°C du Drac et de la retenue) pour mieux appréhender les périodes de migrations ? Les résultats aideront à déterminer la solution technique la plus appropriée pour assurer des conditions de franchissement optimale c'est-à-dire qui coïncide avec les exigences écologiques de l'espèce cible. In fine, le projet vise à faire des propositions pour maintenir le niveau du plan d'eau à la cote 757, à la période et sur la durée appropriées pour permettre la franchissabilité du seuil par les géniteurs de truite, tout en prenant en compte les contraintes d'exploitation de l'aménagement, les variations de la demande d'électricité, et l'évolution de l'hydraulicité.

Le projet propose d'étudier sur une durée de 3 ans le comportement migratoire d'un sous-échantillon de 100 truites sauvages marquées à l'aide d'émetteurs radio. Le modèle animal ne peut pas être remplacé pour répondre à la question posée (règle des 3 R : Remplacement) ; en outre, il est indispensable d'avoir recourt à des poissons sauvages pour étudier leur comportement in natura. L'effectif de 100 individus est le minimum pour obtenir un échantillon représentatif des comportements migratoires au sein de la population et pour évaluer la variabilité interannuelle de ces comportements, tout en limitant au maximum les atteintes sur la population (Règle des 3R : Réduction). Un marquage chirurgical est nécessaire pour l'implantation des marques dans la cavité péritonéale. Les animaux seront anesthésiés lors de l'opération, leurs constantes vitales seront surveillées et leur réveil post-opératoire assuré avant de les relâcher dans le milieu naturel (règle des 3R : Raffinement). Les opérations chirurgicales seront réalisées par du personnel formé à la chirurgie sur poisson.

2912. Le cancer reste une pathologie en très forte progression, tant par son incidence, sa mortalité que les coûts associés. L'OMS estime ainsi que la mortalité liée au cancer devrait augmenter de 51% entre 2002 et 2030, avec environ 11,5 millions de décès liés à cette pathologie en 2030 dans le monde. En parallèle, les traitements en oncologie restent encore trop inefficaces, avec un taux de réponse moyen d'environ 20%, et évoluent vers le ciblage de plus en plus spécifique des thérapies, avec un rapport efficacité/effets secondaires bien plus bénéfique pour les patients.

Néanmoins, l'efficacité des traitements même ciblés en cancérologie reste encore insuffisante. Le challenge est de disposer de modèles précliniques prédictifs hautement caractérisés pour pouvoir détecter plus tôt dans leur processus de développement les thérapies anticancéreuses efficaces adaptées à une sous-population ciblée de patients.

La médecine personnalisée a pris un virage important il y a environ une quinzaine d'années : depuis les premiers essais cliniques avec le trastuzumab ® en 1998 pour le traitement des cancers du sein métastatiques chez les patientes atteintes d'une tumeur surexprimant la protéine HER2. Aujourd'hui, les tumeurs du sein sont automatiquement analysées pour connaître le niveau d'expression de HER2, seules les tumeurs surexprimant HER2 étant susceptibles de répondre au traitement par le trastuzumab.

Il est désormais communément admis que les modèles de xénogreffe dérivés de tumeurs de patients, sans manipulation in vitro, sur des animaux immunodéficients reflètent mieux la biologie tumorale humaine que les tumeurs obtenues à partir de lignées cellulaires. L'établissement de ce type de modèles tumoraux offre la possibilité de représenter la diversité génétique des tumeurs et notamment des tumeurs qui ne répondent pas aux thérapies de référence. L'ensemble des échantillons tumoraux cliniques collectés seront amplifiés en souris immunodéficientes, puis centralisés dans une biobanque, pour être ensuite caractérisés, par nos collaborateurs, via des analyses moléculaires (génomique, transcriptomique, protéomique), histologiques, biologiques et pharmacologiques. Ce projet a pour objectif de développer des modèles de cancers prédictifs innovants et hautement caractérisés et de faciliter la mise en place d'une médecine personnalisée en accélérant l'innovation thérapeutique et l'identification de thérapies anticancéreuses efficaces, avec un transfert rapide vers la clinique, au bénéfice direct des patients.

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum tout en ayant un maximum de chance d'obtenir des résultats positifs. L'utilisation des animaux est essentielle pour ce projet et la souris nude est le modèle le plus pertinent. Tout au long de ce projet, nous veillerons au bien être des animaux et à réduire au maximum la souffrance ou l'angoisse des animaux.

Le nombre de souris estimé pour ce projet est de 530 sur une durée de 5 ans.

2913. Le protocole de recherche consiste à permettre à un total de 30 babouins de se tester librement dans des tâches cognitives à l'aide de stations de conditionnement opérant équipées d'écrans tactiles et de distributeurs de récompenses. Les babouins, qui vivent dans des groupes sociaux de tailles différentes, peuvent à tout moment et sans contrainte quitter momentanément leur enclos ou leur volière pour interagir avec les écrans tactiles. L'expérimentation repose donc sur un principe de volontariat, sans capture de l'animal. Les groupes d'animaux sont maintenus dans des enclos ou dans des volières de grandes tailles enrichies d'objets permettant des comportements riches et variés (tipi permettant de grimper, objets d'enrichissement que le singe peut manipuler). Plusieurs années de recul avec cette approche ont montré que l'utilisation des systèmes de test en libre accès atténue le stress de l'animal en expérimentation. Ce protocole constitue donc un raffinement (règle des 3Rs) favorable au bien-être de l'animal en expérimentation. Cette recherche apportera des informations sur la cognition du babouin, dans ses dimensions sociales et non sociales, et contribuera à démontrer l'intérêt des protocoles en libre accès dans le cadre de recherches comportementales sur le primate non humain. Cette recherche est également destinée à servir de cadre de référence pour les laboratoires de neurosciences désireux d'utiliser des protocoles en libre accès dans leur laboratoire.

2914. Notre projet vise à étudier les effets du stress sur l'efficacité des réponses immunitaires chez le porc. En effet, le porc élevé de manière intensive est soumis à différents stress au cours de sa vie (au moment du sevrage et de la mise en lot pour

l'engraissement notamment). Nous pensons que ces périodes de stress peuvent « fragiliser » l'animal et le rendre plus sensible aux infections.

Notre étude vise à démontrer que la prise en compte du bien-être animal en élevage associé à la diminution des facteurs de stress pour le porc permettrait de le rendre plus résistant aux infections et de limiter l'usage des antibiotiques.

Dans ce contexte, nous qualifierons *ex vivo* sur le sang de 102 porcs de race Large White âgés de 7 semaines l'efficacité de la réponse immunitaire avant et après avoir soumis ces animaux au stress de la mise en lot, couramment pratiquée en élevage. L'expérimentation comporte deux prises de sang (avant et après le mélange des animaux) réalisées en quelques secondes par un personnel entraîné sur des animaux en contention légère. Il existe un risque modéré d'apparition de combats entre les animaux après le mélange. Une surveillance stricte des animaux sera exercée pendant le mélange et les combattants seront séparés au besoin.

Ce projet est un projet à l'échelle de l'animal entier qui ne peut donc à l'heure actuelle être remplacé par des modèles *in vitro*. Notre étude s'inscrit dans la règle de réduction des animaux utilisés en expérimentation animale puisque nous allons réutiliser des porcs déjà produits et inclus dans un protocole validé, impropres à la consommation humaine et destinés à l'euthanasie.

2915. Le diplôme universitaire à la formation aux techniques de neurophysiologie per-opératoires du système nerveux central et périphérique permet aux chirurgiens du rachis et aux anesthésistes d'apprendre à contrôler les voies motrices cortico-spinales au cours des interventions chirurgicales concernant les déformations du rachis.

Le principe est de permettre le contrôle électrophysiologique des voies motrices en l'absence de neurophysiologistes qualifiés car ceux-ci sont rarement disponibles au bloc opératoire.

Quand un patient se fait opérer du rachis, il est essentiel de vérifier qu'il n'y a pas de lésion des fonctions motrices. Pour se faire, les chirurgiens et anesthésistes utilisent des appareillages de tests électrophysiologiques. Le principe de cet appareillage est d'implanter des électrodes de stimulation et des électrodes de réception au niveau des membres, de faire passer un courant électrique adapté et d'interpréter les réponses. Le contrôle électrophysiologique permet un contrôle en temps réel du système nerveux avec la possibilité d'adapter le geste du chirurgien de manière immédiate afin d'éviter une complication neurologique irréversible.

Pour cette procédure, nous utilisons des porcelets landras d'environ 50 kg (3/4 mois), provenant d'un élevage pour l'expérimentation animale. Les porcelets sont opérés comme des patients humains, sous anesthésie générale. Leur stress et leur douleur sont pris en charge. C'est une procédure sans réveil. C'est à dire que l'animal est euthanasié alors qu'il est encore sous anesthésie générale.

Le nombre de porcelets utilisés pour cette formation est de 60 pour 5 ans. Ce nombre sera revu à la baisse est uniquement à la baisse en fonction du nombre de chirurgiens inscrits à ce diplôme.

Nous n'avons pas les moyens, à ce jour, de remplacer cette formation par des méthodes *in silico* ou *in vitro*. La formation à ce diplôme doit donc être effectuée sur des êtres vivants.

2916. Les cancers du pancréas, de l'ovaire et de la vessie font partie des cancers majeurs entraînant le décès annuel en France d'environ 10000, 4000 et 5000 sujets, respectivement. L'objectif de ce projet est de mettre en place différents modèles orthotopiques tumoraux afin d'évaluer l'efficacité de vecteurs oncolytiques pour ces trois pathologies.

En préalable, ces vecteurs ont montré des capacités à lyser les cellules *in vitro*.

Suite à l'injection des cellules tumorales de différentes origines tissulaires dans les organes correspondants, les souris vont développer des tumeurs au site d'injection mimant ainsi de façon pertinente la réalité clinique humaine.

Après prise tumorale, les virus oncolytiques, en combinaison ou non avec des chimiothérapies, seront injectés dans les souris et l'effet thérapeutique sera évalué soit par analyse de survie, soit par analyse de la taille tumorale.

Les effets secondaires dus à l'évolution des tumeurs ainsi qu'à l'injection des virus et de la chimiothérapie seront surveillés et des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique des animaux seront mis en place pour limiter le stress et la souffrance des animaux.

Du fait de l'absence de système *in vitro* comportant tous les éléments cellulaires pouvant interférer avec la réplication virale, et permettant de mimer leurs interactions et leur mode d'action, l'emploi de modèles animaux est incontournable.

Le nombre d'animaux par groupe expérimental est de 10 pour les expériences de mises au point des modèles. Chaque expérimentation sera au maximum quadruplée afin de confirmer les résultats obtenus.

Le nombre maximum de souris envisagé pour ce projet avec ces hypothèses est de 4840.

2917. L'objectif de ce projet est de mettre en place le modèle orthotopique tumoral glioblastome (cancer du cerveau) afin d'évaluer l'efficacité de vecteurs oncolytiques pour cette pathologie.

En préalable, ces vecteurs ont montré des capacités à lyser les cellules *in vitro*.

Suite à l'injection des cellules tumorales dans le cerveau, par intervention chirurgicale sous anesthésie générale, les souris vont développer des tumeurs au site d'injection mimant ainsi de façon pertinente la réalité clinique humaine.

Après prise tumorale, les virus oncolytiques, en combinaison ou non avec des chimiothérapies, seront injectés dans les souris (par voie intra-veineuse ou directement dans la tumeur) et l'effet thérapeutique sera évalué par analyse de survie. La Dose Létale 50 (DL50) de plusieurs virus oncolytiques injectés directement dans le cerveau sera préalablement évaluée.

Afin de limiter la souffrance des animaux des produits analgésiques et anti-inflammatoires sont injectés en post-opératoire. Les effets secondaires dus à l'évolution des tumeurs ainsi qu'à l'injection des virus et de la chimiothérapie seront surveillés et

des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique des animaux seront mis en place pour limiter le stress et la souffrance des animaux.

Du fait de l'absence de système *in vitro* comportant tous les éléments cellulaires pouvant interférer avec la réplication virale et permettant de mimer leurs interactions et leur mode d'action, l'emploi de modèles animaux est incontournable.

Le nombre d'animaux par groupe expérimental se situe entre 5 et 20 animaux selon le type de procédure qui seront répétées au maximum quatre fois afin de confirmer les résultats obtenus.

Le nombre maximum de souris envisagé pour ce projet avec ces hypothèses est de 1540.

2918. Le cancer est la deuxième cause de décès dans les pays développés après les maladies cardiovasculaires. Les traitements conventionnels de nombreux cancers tels que la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie ont démontré des limites d'efficacité, nécessitant un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les virus oncolytiques sont une nouvelle classe d'agents thérapeutiques pouvant être une alternative au traitement des cancers. Par définition, un virus oncolytique est un virus qui démontre une réplication et une lyse spécifique des cellules tumorales avec une faible, voire aucune cytotoxicité sur les tissus dits « sains ».

La perspective de ce projet est d'évaluer l'efficacité et l'innocuité (absence de toxicité) de ces nouveaux vecteurs pour traiter des pathologies. Au préalable, ces vecteurs ont montré des capacités à lyser et détruire des cellules tumorales *in vitro*. Il s'agit donc maintenant de les tester *in vivo*.

La dose létale médiane (DL50) de ces virus (injectée par voie systémique) doit être déterminée pour ce projet : il s'agit de la dose à laquelle 50% des souris ne survivent pas à l'injection du virus,

Les effets secondaires dus à l'injection des virus seront surveillés et des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique moribond des animaux seront mis en place pour limiter le stress et la souffrance des animaux.

Du fait de l'absence de système *in vitro* comportant tous les éléments cellulaires pouvant interférer avec la réplication virale, et permettant de mimer leurs interactions et leur mode d'action, l'emploi de modèle animal est incontournable.

Le nombre d'animaux par groupe expérimental est de 5 animaux. Cet effectif permet d'obtenir des résultats significatifs. 20 virus seront testés à 8 doses différentes chez des souris immunocompétentes et immunodéficientes portant le nombre total d'animaux utilisés à 1800 sur toute la durée du projet. Chaque expérience sera réalisée qu'une seule fois.

Une fois la DL50 déterminée, ces virus seront injectés dans des souris porteuses de tumeurs murines ou humaines (implantées soit en souris immunocompétentes, soit en souris immunodéficientes) afin de déterminer *in vivo* l'activité thérapeutique anti-tumorale de nouvelles générations de virus oncolytiques. Cette partie du projet a déjà été évaluée par le comité éthique.

2919. CD146 est une protéine d'adhésion de la jonction endothéliale et est impliquée dans le maintien de l'intégrité vasculaire, en contrôlant notamment l'infiltration de produits sanguins dans les tissus sous-jacents. Cependant, son rôle dans l'athérosclérose et ses complications vasculaires telles que les calcifications vasculaires n'est pas élucidé à ce jour. C'est pourquoi nous proposons d'étudier le potentiel de CD146 comme cible thérapeutique dans les maladies cardiovasculaires, grâce à un modèle de souris invalidée constitutivement pour le gène CD146, modèle généré dans notre laboratoire. L'espèce animale utilisée sera la souris car la meilleure façon d'étudier les fonctions d'une molécule dans un contexte physiologique puis pathologique est de l'analyser *in vivo* à travers la physiopathologie animale. Afin de respecter les règles d'éthique, la règle des « 3R-Réduction/Remplacement/Raffinement » sera appliquée. Ainsi, une expérience pilote sera réalisée sur 6 animaux (3 animaux sauvages et 3 animaux déficients en CD146) pour chaque protocole. Puis, nous utiliserons le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de tests statistiques dans une seconde série d'expériences selon la méthode statistique pour le calcul d'effectif, soit un total de 96 souris. Le protocole sera arrêté si l'animal présente des difficultés à respirer (visualisées par une augmentation des rythmes cardiaque et respiratoire répercutée au niveau des flancs de l'animal), si l'animal est prostré ou en retrait, si ses poils sont hérissés. De plus, la douleur et la souffrance seront évaluées lors des protocoles et durant toute la vie de l'animal de la naissance à la mort grâce à une grille d'évaluation de la douleur et nous agirons en conséquence.

2920. L'insuffisance placentaire se complique d'une pré-éclampsie sur le versant maternel et d'un retard de croissance intra-utérin (RCIU) sur le versant fœtal. Le RCIU correspond à une estimation du poids fœtal, ou un poids de naissance, inférieur au 10ème percentile associé à une cassure ou un infléchissement de la courbe de croissance. Une modification de la perfusion sanguine du placenta peut s'accompagner d'un retard de croissance intra-utérin (RCIU). Celui-ci complique environ 10% des grossesses et entraîne une morbidité néonatale plus élevée que chez les fœtus de poids normal à terme. Il est difficile de détecter un dysfonctionnement placentaire précoce avec les outils d'imagerie diagnostique actuellement disponible en pratique clinique (par exemple, l'échographie Doppler). L'échographie, simple et relativement peu coûteuse, est le principal examen d'imagerie utilisé en obstétrique. Récemment, nous avons démontré que l'échographie de contraste est un outil efficace permettant de quantifier très précisément la perfusion placentaire à différents stades de gestation chez la rate. Un projet d'étude préclinique visant à démontrer la pertinence de l'échographie de contraste comme outil de mesure de la perfusion placentaire au cours de la gestation sur un modèle de RCIU murin est actuellement en cours de d'évaluation.

De récents travaux ont montré l'implication du facteur de croissance VEGF et de son récepteur dans la physiopathologie de la pré-éclampsie. Le suivi de son expression au cours d'une insuffisance placentaire permettrait donc d'établir un diagnostic précoce de la pathologie. Les récentes avancées en imagerie moléculaire ont permis l'élaboration d'agents de contraste ultrasonores capables de reconnaître spécifiquement des cibles moléculaires exprimées à la surface des cellules endothéliales.

A ce jour, l'efficacité des agents de contraste ciblés récepteurs au facteur de croissance a été démontrée pour la détection précoce de la néovascularisation tumorale. Dans ce contexte, nous proposons d'utiliser l'échographie de contraste afin d'obtenir une quantification du récepteur au facteur de croissance présent à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux placentaires. Nous souhaitons quantifier l'expression du récepteur au facteur de croissance sur les cellules endothéliales du placenta à J14, J17 et J20 par une imagerie de contraste sur 10 rates gestantes au cours d'une gestation physiologique. Dans un second temps, nous allons provoquer un RCIU chez 15 rates gestantes en ligaturant l'artère utérine droite à J17 puis nous réaliserons une quantification des récepteurs aux facteurs de croissance à J20. La ligature de l'artère utérine droite induira une baisse de la perfusion de la corne utérine droite. L'ischémie placentaire provoquera un RCIU.

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

Remplacement: Nous étudions la physiopathologie du RCIU. Par conséquent, à cette étape du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un autre modèle d'étude in-vitro ou in-silico. Par ailleurs, l'utilisation des agents de contraste échographiques ne sont pas autorisés en pratique courante chez la femme enceinte. Des données complémentaires sont nécessaires afin d'établir leur innocuité. L'ensemble de ces manipulations comportent des procédures d'analyse histologique afin d'étayer les données de sécurité des agents de contraste.

Réduction: D'après le calcul d'effectif, un nombre total de 25 rates est nécessaire pour obtenir une quantification et tenir compte des variabilités de la mesure. Dix rates seront étudiées dans le cadre de la gestation physiologique puis 15 rates dans le cadre de la mise en place d'un modèle pathologique de RCIU. Le nombre restreint d'animaux examinés permettra de mettre en évidence la faisabilité de notre approche en montrant qu'une corrélation existe entre les paramètres ultrasonores utilisés et l'analyse histopathologique des tissus. Selon les résultats obtenus, une étude de plus grande ampleur pourra ultérieurement être mise en place.

Dans un premier temps, une étude longitudinale sera réalisée afin d'évaluer l'expression du récepteur au facteur de croissance aux 14ème, 17ème et 20ème jours de gestation. Afin de pouvoir comparer les valeurs obtenues aux différents jours de gestation entre elles, un effectif minimum de 10 rates est souhaitable pour mettre en évidence une différence.

Dans une seconde procédure, le modèle de RCIU sera mis en place afin de mettre en évidence une différence dans l'expression du récepteur au facteur de croissance VEGFR-2 entre les cas et les témoins. Un effectif de 15 rates est nécessaire.

Raffinement: Les rates seront hébergées par deux en présence d'un objet d'enrichissement (morceaux de carton). Les animaux atteints d'un retard de croissance intra-utérin seront observés deux fois par jour et toute manifestation de symptômes persistants tels que définis dans le point limite engendra l'euthanasie des animaux par le personnel qualifié.

2921. L'anaphylaxie (réaction allergique grave) est un état grave au potentiel fatal qui exige un diagnostic rapide et un traitement immédiat.

Dans le cas de l'enfant atteint d'anaphylaxie, il revient généralement aux parents de réaliser les injections à leur enfant en cas de choc. Des difficultés subsistent pour l'administration du traitement : l'appréhension de l'injection par les parents et leurs enfants et les erreurs de manipulation du matériel d'injection dans l'urgence de l'acte (stérilité, réglage de la dose, auto-piqûre).

Le produit testé pour ce projet permettra un traitement oral, ce qui exclut toute injection afin de simplifier l'utilisation du traitement et de sécuriser l'administration afin de limiter les erreurs réalisées dans l'urgence pour s'assurer de l'issue optimale de celui-ci. Ce projet vise à étudier la pharmacocinétique de la substance active (absorption, distribution, métabolisme, et élimination) contenue dans le médicament après son administration dans l'organisme. Les deux espèces animales les plus décrites dans les bibliographies et présentant une physiologie et une anatomie proches de celles de l'homme, seront employés pour ce projet: le porc et le chien.

Après administration du produit testé chez les animaux, des prélèvements sanguins seront réalisés afin d'étudier la libération et la diffusion du produit.

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

La conception de ce projet (y compris la sélection des espèces d'essai, leur nombre, leur poids, les doses sélectionnées et les voies d'administrations) est basée sur les informations disponibles issues des études in vitro, des données bibliographiques ainsi que sur l'utilisation clinique ultérieure prévue.

Grâce à une bonne standardisation des essais le nombre d'animaux est réduit au maximum tout en évitant de compromettre les objectifs du projet. Ainsi, un total de 32 porcs et 32 chiens sera utilisé au cours du projet. Ce nombre a été déterminé en fonction des données déjà disponibles sur les molécules étudiées et en fonction des analyses réalisées. Chaque animal recevra plusieurs formulations différentes et doses testées afin de réduire le nombre total d'animaux. Les chiens et les porcs seront maintenus dans un environnement social et éthologique adapté. De plus, une équipe spécialement formée prodiguera des soins adaptés aux animaux et leur fournira un environnement social adapté à leurs besoins.

2922. Les astrocytes sont indispensables au fonctionnement cérébral et à la survie des neurones. En conditions pathologiques, les astrocytes deviennent « réactifs », ce qui se caractérise par des changements morphologiques bien établis. Mais comment les fonctions de soutien normalement remplies par les astrocytes sont-elles altérées ou amplifiées par leur état réactif ? En particulier, le rôle des astrocytes réactifs dans la maladie de Huntington (MH) reste controversé. La MH est une maladie neurodégénérative héréditaire caractérisée par des déficits cognitifs, psychiatriques et des troubles moteurs. En France, la maladie touche environ 1 personne sur 10 000 et aucun traitement efficace n'est actuellement disponible pour guérir ou ralentir sa progression.

Pour mieux comprendre les conséquences fonctionnelles de la réactivité astrocytaire in vivo, notre équipe a développé des vecteurs viraux permettant de moduler sélectivement les astrocytes in vivo en induisant ou en bloquant leur réactivité. Ces vecteurs sont injectés par stéréotaxie dans le cerveau de souris modèles de la MH.

Le premier objectif de ce projet vise à évaluer l'impact thérapeutique de la modulation de la réactivité astrocytaire par ces vecteurs, dans un modèle murin de la MH. Nous évaluerons différents symptômes de la pathologie en utilisant des techniques variées allant de l'évaluation motrice, à l'analyse biochimique et histologique, en passant par l'imagerie cérébrale par résonance magnétique. Le deuxième objectif vise à identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents. Ce projet permettra de mieux comprendre le fonctionnement des astrocytes réactifs et de cerner leur contribution dans la MH.

Les maladies neurodégénératives affectent le cerveau et conduisent à des altérations complexes du fonctionnement cérébral et du comportement. Ni la modélisation informatique ni l'expérimentation sur cellules in vitro ne permettent encore d'appréhender ces processus très complexes. De plus, notre projet s'intéresse aux interactions entre les neurones et les astrocytes et seule l'étude du cerveau entier in situ permet de conserver la complexité de ces interactions.

Le projet prévoit au maximum 500 rongeurs 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 en accord avec le vétérinaire de l'installation, pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Leur état de santé sera également surveillé tout au long de l'expérience. Le suivi quotidien des rongeurs hébergés en groupe dans un milieu enrichi et l'application de critères d'arrêts en élevage et en expérimentation, permettra de garantir leur bien-être. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté et mettra en œuvre les traitements appropriés.

2923. TLR3 est un récepteur de l'immunité innée présent dans la plupart des cellules immunitaires et épithéliales et qui entraîne une inflammation impliquée dans la réponse anti-virale.

Cependant, dans les cellules cancéreuses qui expriment toujours le récepteur (cancer du sein, cancer du poumon, etc), l'activation du récepteur entraîne à la fois une inflammation mais aussi la mort de ces cellules cancéreuses et un ralentissement de la croissance tumorale.

La possibilité de ciblage thérapeutique de TLR3 dans les cancers a été confirmée par une étude rétrospective démontrant que seules les patientes dont le cancer du sein exprimait TLR3 avaient répondu favorablement à un traitement avec un ligand de TLR3.

Malgré leur activité adjuvante en vaccination, aucune molécule cible de TLR3 n'a à ce jour obtenu l'autorisation de mise sur le marché, en raison d'effets toxiques ou de manque d'efficacité, et d'homogénéité structurelle.

Récemment, un ligand de TLR3, parfaitement défini structurellement et donc reproductible a été mis au point. Nous avons apporté la preuve de concept in vitro de l'effet pro-apoptotique de cette molécule sur des cellules tumorales.

L'objectif de ces expériences est de démontrer l'efficacité thérapeutique anti-tumorale de cette molécule in vivo.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Le projet a pour but de développer une nouvelle molécule pro-apoptotique et immunothérapeutique ciblant les cancers épithéliaux TLR3. Ces résultats s'inscrivent dans le cadre du développement d'une application thérapeutique utilisable chez les patients.

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

- Le projet fait suite à des études en culture ayant démontré (1) l'induction de l'apoptose dans les lignées tumorales suite à une incubation avec ce ligand.
- Seul un modèle in vivo nous permettra d'étudier l'effet de cette molécule sur la croissance et les métastases de cellules du cancer du poumon humain.
- Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats: ralentissement ou régression de la croissance tumorale. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettra d'éviter la souffrance des animaux.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Une première expérience avec 4 groupes de 5 souris (20 souris) sera réalisée, suivi d'une seconde expérience comportant 2 groupes de 10 souris, qui sera répétée 2 fois (40 souris). La dernière expérience comportera 10 modèles de PDX (Protocole préalablement validé par le comité d'éthique et mis en action au LMT) avec 10 souris par modèle (100 souris). Au total, 160 souris seront incluses dans ce projet pendant les 3 ans à venir.

2924. Les tissus muqueux constituent des portes d'entrée privilégiées pour une majorité d'agents infectieux, et la lutte de l'organisme contre ces pathogènes repose de manière importante sur un système immunitaire spécifique des muqueuses et activé localement. Ainsi, le développement de vaccins délivrés par voie muqueuse (par exemple orale) est devenu un enjeu important de la vaccinologie, en particulier pour des pathogènes qui ont jusque là résisté aux approches classiques de vaccination parentérale. Récemment sont apparus des « nanovaccins » très prometteurs dans lesquels les principes vaccinaux sont incorporés dans des nanovecteurs, permettant d'améliorer leur stabilité, leur ciblage et leur efficacité, et de limiter leurs effets secondaires. Néanmoins les mécanismes de passage de ces nanovaccins à travers les muqueuses ne sont pas encore bien décrits, ce qui freine leur développement. Ce projet a pour but de caractériser la prise en charge in vivo de nanovecteurs biodégradables au niveau des muqueuses et leur devenir dans l'organisme. Pour se faire, il doit être réalisé sur un organisme modèle entier, avec des muqueuses (et en particulier une immunité muqueuse) bien développées et caractérisées, ce qui

exclut les approches in vitro et les organismes modèles non Vertébrés. Le projet sera ainsi réalisé sur le modèle du poisson zèbre adulte, dont les muqueuses présentent des organisations tissulaires similaires en de nombreux points à celles de l'homme, et qui peut avantageusement remplacer les modèles mammifères pour ce projet. Ce travail participera au développement de vaccins administrables par voie muqueuse dans le but de stimuler efficacement l'immunité muqueuse. Le nombre maximum envisagé de poissons utilisés dans les procédures expérimentales est de 722 poissons. Il sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. L'administration des nanovecteurs est évaluée à un niveau modéré pour 30 poissons maximum et léger pour les autres. Les points limites sont fixés afin de réduire la souffrance des animaux (absence de signes généraux évocateurs de mal-être).

2925. La consommation de viande est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. Les données épidémiologiques ont été consolidées par des études du laboratoire à l'aide modèle animaux. Les mécanismes mis en jeu impliquent la peroxydation lipidique catalysée par l'hème apportée par la myoglobine de la viande. Une des hypothèses implique une perturbation de l'épithélium colique par les produits terminaux de la peroxydation lipidique pouvant aboutir à une inflammation intestinale et la perturbation de la perméabilité intestinale. Le but de ce protocole est d'évaluer in vivo l'impact de la consommation d'hème sur l'inflammation et la perméabilité intestinale et de vérifier si le microbiote (un partenaire majeur de l'écosystème colique) participe à la formation de produits terminaux de peroxydation. Dans le cadre de la présente demande le modèle animal utilisé est le modèle classiquement utilisé pour étudier la relation aliment/cancer (110 rats Fisher F344 mâles de 5 semaines utilisés dans le cadre des 3R : le nombre de rat est réduit au maximum de façon toutefois à ne pas impacter la qualité statistique de nos résultats, le raffinement est inclus avant (choix du protocole pour limiter les interventions sur les animaux), pendant (la durée est réduite au maximum en travaillant sur des marqueurs précoces) et après (exploitation optimale des données obtenues) ce projet. L'utilisation de modèle animal est indispensable (remplacement impossible) car aucun modèle cellulaire ne permet de modéliser le lien aliment/épithélium colique/microbiote).

2926. La consommation de viande est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. L'épidémiologie a été consolidée par des études expérimentales à l'aide de modèle animaux. Les mécanismes impliquent la peroxydation lipidique catalysée par l'hème apportée par la viande rouge ou l'hème nitrosylé de la charcuterie. Les travaux expérimentaux ont permis de montrer que l'ajout d'antioxydant dans le régime pouvait limiter cet effet promoteur. Dans ce cadre, un projet épidémiologique, nous a permis de vérifier que dans une cohorte de femmes françaises (1) la consommation d'hème et d'hème nitrosylé est associée à un risque supérieur de développer des adénomes colorectaux et que (2) un statut d'antioxydant élevé du régime va protéger contre cette association positive. Le cocktail d'antioxydants responsable de cet effet dans la cohorte a été identifié. Dans le cadre de ce projet, l'objet de la présente demande est de vérifier l'efficacité du cocktail d'antioxydants contre la promotion de la carcinogenèse colorectale médiée par l'hème ou l'hème nitrosylé, dans un modèle animal classiquement utilisé pour étudier la relation aliment/cancer (111 rats Fisher F344 mâles de 5 semaines utilisés dans le cadre des 3R : le nombre de rat est réduit au maximum de façon toutefois à ne pas impacter la qualité statistique de nos résultats, le raffinement est inclus avant (choix du protocole pour limiter les interventions sur les animaux), pendant (la durée est réduite au maximum en travaillant sur des stades précoces du cancer) et après (exploitation optimale des données obtenues) ce projet. Le nombre des lésions précancéreuses au niveau du côlon ainsi que des marqueurs de peroxydation lipidique dans les fèces seront suivis pendant le projet. L'utilisation de modèle animal est indispensable (remplacement impossible) car nous travaillons avec un aliment promoteur de la carcinogenèse (l'expérimentation chez l'Homme est donc impossible et aucun modèle cellulaire ne permet de modéliser le lien aliment/cancer).

2927. Les huiles minérales sont des mélanges complexes d'hydrocarbures aromatiques et saturés. Certaines de ces huiles sont utilisées dans les procédés de fabrication des aliments ou dans les emballages alimentaires, d'autres sont des polluants environnementaux. De ce fait, les hydrocarbures qui les constituent se retrouvent dans la chaîne alimentaire conduisant à l'homme. La caractérisation du danger que présentent ces contaminants se heurte à l'insuffisance des données, tant en matière de devenir que de toxicité. En particulier, il n'existe pas à ce jour d'information précise sur le danger que présente chacune des principales sous-classes d'hydrocarbures saturés (linéaires, ramifiés, naphthéniques) ni sur leur accumulation éventuelle dans les tissus de l'organisme. Le but de ce projet est

- (1) de mieux connaître le comportement et les effets d'un mélange complexe d'hydrocarbures parfaitement caractérisé;
- (2) d'identifier dans ce mélange les sous-fractions qui sont les plus toxiques et celles qui s'accumulent le plus;
- (3) d'établir le lien entre la dose d'exposition et le niveau de bioaccumulation.

Pour mener à bien cette tâche deux expérimentations animales distinctes, utilisant un total de 227 rats Fischer 344 femelle (espèce, souche et genre les plus sensibles) sont prévues : La première consistera à exposer 3 lots de rats à un mélange complexe d'hydrocarbures saturés représentatifs des huiles minérales alimentaires, incorporé à l'aliment aux taux de 40, 400 et 4000 mg/kg d'aliment. Un quatrième

lot de rat recevra de l'aliment témoin. Une analyse histologique du foie sera effectuée à différents temps et une évaluation du potentiel immunotoxique du mélange sera réalisée en fin d'expérimentation.

La deuxième consistera à travailler non plus à partir d'une fraction complexe, mais à partir de 4 sous-fractions qui auront été préparées et caractérisées à partir du mélange préalablement testé. Dans ce cas, deux doses seulement seront testées. En vue d'optimiser l'expérimentation, nous avons prévu, sur les mêmes animaux de réaliser les observations histopathologiques, les analyses quantitatives d'huiles minérales et les tests relatifs au système immunitaire. Les mêmes tissus seront prélevés et les

mêmes analyses seront effectuées. Les résultats obtenus et leur comparaison avec ceux de la première expérimentation devraient permettre de déterminer, parmi les différentes catégories d'hydrocarbures qui constituent les huiles minérales, lesquelles sont à l'origine des effets toxiques.

Tout a été mis en œuvre pour répondre aux exigences en matière de bien-être animal : réduire le nombre d'animaux utilisés sans limiter de trop la puissance statistique de l'analyse des données, optimiser l'expérimentation notamment par partage d'animaux entre 3 équipes réalisant des mesures/observations complémentaires, limitation de la durée de l'expérimentation, pas de prélèvements invasifs, réduction du stress (période d'acclimatation, visites quotidiennes, conditions d'hébergement enrichies).

2928. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, elles sont à l'origine de 30% de la mortalité mondiale totale. L'ischémie du myocarde est une pathologie cardiovasculaire très répandue qui est à l'origine de dysfonctions vasculaire et cardiaque (arythmies et infarctus du myocarde). L'infarctus du myocarde touche 120 000 personnes par an en France et provoque le décès de 50 millions d'Hommes chaque année dans le monde. Cette pathologie qui survient à la suite de l'obstruction d'une artère coronaire privant ainsi une partie du myocarde d'oxygène, entraîne à long terme une dysfonction du ventricule gauche du cœur qui aboutit à l'insuffisance cardiaque. La fatigue, les difficultés respiratoires et la dysfonction ventriculaire qui en résultent, sont encore mal prises en charge par les traitements actuels et nécessitent donc la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques.

Cette situation clinique peut être étudiée au laboratoire grâce aux modèles précliniques chez l'animal et ainsi permettre la découverte de nouvelles thérapies. L'ischémie du myocarde et l'insuffisance cardiaque fonctionnelle qui en découlent, sont des processus intégrés et complexes qui ne sont pas modélisables in vitro. Ces symptômes sont mesurés dans des modèles animaux développés spécifiquement pour mimer les pathologies humaines. Une sténose coronaire (obstruction de l'artère coronaire) induite par chirurgie chez le rat fournit un modèle expérimental pertinent pour l'étude de l'infarctus du myocarde in vivo mais également du développement de l'insuffisance cardiaque consécutive.

La chirurgie nécessaire à la sténose coronaire et à l'induction de l'infarctus est réalisée sous anesthésie et couverte par une analgésie pré et post-opératoire. La fonction cardiaque et l'évolution de l'insuffisance cardiaque sont ensuite suivies par des méthodes non invasives et indolores, comme l'échocardiographie. Elles sont de plus réalisées sous anesthésie gazeuse afin de limiter le stress. La mesure des paramètres hémodynamiques (pression artérielle, fréquence cardiaque) est également réalisée sous anesthésie en fin d'expérimentation.

Ces examens visent à mesurer finement les effets d'un candidat médicament via un suivi longitudinal (dans le temps) par individu et ainsi limiter le nombre d'animaux utilisés.

Cet état clinique d'insuffisance cardiaque, peut être aggravé par différents facteurs de risques dits de co-morbidités tels que l'hypertension, le diabète ou encore l'obésité. Différentes souches de rats, présentant spontanément un ou plusieurs de ces facteurs de risques peuvent ainsi être utilisées pour développer ce modèle, selon les besoins de recherche, afin de reproduire au plus juste les contextes d'insuffisances cardiaques retrouvés chez les patients.

Ces études s'inscrivent en fin de processus de recherche de nouveaux candidats médicaments, à savoir que seuls seront étudiés des candidats médicaments préalablement sélectionnés pour leur efficacité sur des tests in vitro, et dont la pharmacosécurité chez le rat est avérée.

Dans ces conditions, un suivi quotidien de l'état général des animaux est assuré conjointement entre les équipes de zootechnie et les expérimentateurs. Les rats sont hébergés dans la mesure du possible hébergés en groupe et bénéficient d'un enrichissement du milieu comme des bâtonnets à ronger. Enfin tout animal présentant au moins un des signes constituant les points limites prédéfinis est immédiatement retiré de l'étude.

Nous estimons une utilisation d'environ 270 rats par an sur toute la durée du projet, soit 1350 rats sur les 5 années.

2929. Les céréales sont un substrat particulièrement sensible à la colonisation par les moisissures dont certaines produisent des métabolites secondaires toxiques appelés mycotoxines. En Europe, les conditions climatiques sont favorables à la production par les moisissures du genre *Fusarium* de diverses fusariotoxines dont le Déoxynivalénol (DON).

Le Cadmium (Cd) est un élément trace très toxique présent dans les sols et lié aux dépôts atmosphériques naturels et industriels ainsi qu'aux engrais minéraux et aux boues d'épuration. Il est facilement absorbé par les racines de blé et s'accumule dans les graines.

Le DON et le Cd sont parmi les contaminants les plus préoccupants pour la sécurité des produits alimentaires céréaliers. Leur niveau dans les céréales destinées à la consommation humaine est strictement réglementé en Europe. On en retrouve cependant des quantités mesurables dans le blé dur français et la question des effets de l'exposition des consommateurs au mélange DON et Cd reste posée.

Plusieurs études toxicologiques ont évalué l'exposition au DON ou au Cd chez les mammifères mais l'étude de leur association n'a jamais été abordée.

L'exposition chronique au DON entraîne des troubles de la croissance, de l'immunité et de la reproduction. Au niveau cellulaire, il perturbe la synthèse des macromolécules, la signalisation cellulaire, la différenciation et la prolifération. Il diminue la fonction de la barrière intestinale et induit une réponse inflammatoire.

Le Cd a pour cible les reins, le foie, les os, les cellules sanguines et le système nerveux. Si on connaît bien les mécanismes d'absorption et de transport dans l'intestin, on connaît mal l'impact de l'ingestion chronique de Cd sur l'intestin lui-même.

L'intestin est la première cible lors de l'ingestion d'aliments contaminés et notre projet vise à étudier la toxicité intestinale du DON et du Cd et la nature de leurs interactions (additivité, antagonisme ou synergie). Les animaux seront exposés à des doses réalistes au regard des teneurs mesurées dans les aliments. Si en parallèle des modèles cellulaires seront utilisés, ils ne pourront donner que des réponses partielles d'un type cellulaire, isolé de l'environnement tissulaire.

Nous utiliserons des rats mâles sevrés et exposés de manière sub-chronique à une alimentation contaminée (contaminants individuels ou en mélange à différentes doses). L'utilisation du modèle rat se justifie par le nombre d'études bibliographiques et d'outils méthodologiques disponibles ainsi que par nos résultats préliminaires qui suggèrent que le DON altère l'épithélium intestinal. Le nombre d'animaux utilisé par groupe expérimental est limité en tenant compte de la variabilité interindividuelle qui nécessite des effectifs suffisants pour les analyses statistiques. 180 animaux sur 3 ans seront utilisés pour réaliser plusieurs études visant à tester des doses et des durées d'exposition différentes. Ils seront hébergés dans des conditions optimales et des enrichissements (maisonnettes, bûchettes en bois..) pourront être ajoutés. Pour limiter le stress des animaux lié à un gavage quotidien, le DON sera incorporé dans la nourriture. Le Cd, sera délivré dans l'eau de boisson. Les doses utilisées ne sont pas attendues pour induire des effets délétères.

2930. La myopathie myotubulaire est une maladie mortelle d'origine génétique due à une perte de fonction musculaire. Aucun traitement n'existe à ce jour. L'objectif du projet est de tester l'efficacité thérapeutique potentielle d'un nouveau traitement en utilisant un modèle de souris atteint de la même pathologie.

L'enjeu et les perspectives sont d'ouvrir une piste de traitement pour les patients atteints de la maladie. La stratégie utilisée s'appuie sur des résultats positifs montrant l'effet bénéfique d'une molécule sur des cellules (in vitro). Ces résultats nécessitent maintenant d'être confirmés sur l'organisme entier (in vivo) pour prouver l'efficacité du concept.

Le modèle animal de la myopathie myotubulaire est une souris qui présente la même déficience génétique que celle présente chez les patients et qui reproduit les symptômes de la maladie humaine.

Nous aurons besoin pour l'ensemble de cette étude de 192 souris. Deux molécules différentes ayant des propriétés pharmacologiques similaires mais une sélectivité distincte seront administrées séparément. Leur efficacité respective sera évaluée en analysant notamment l'amélioration de la locomotion et de l'état général des souris malades, en comparaison au traitement placebo. Un suivi journalier des animaux sera effectué de façon à réaliser les soins nécessaires.

Toutes les molécules testées ont déjà fait ou feront d'abord l'objet d'études in vitro sur cellules isolées. En cas d'inefficacité ou de conséquences délétères observées in vitro, aucune expérimentation animale ne sera réalisée.

Aucun test invasif ne sera réalisé sur les animaux. Concernant la règle des trois R :

- Le nombre d'animaux sera le minimum raisonnable pour démontrer statistiquement le bénéfice ou l'absence de bénéfice des traitements prévus.

- Le détail des protocoles utilisés sera basé sur des données scientifiques ayant démontré l'efficacité et la non toxicité (aux doses administrées) chez l'animal des molécules testées dans d'autres situations pathologiques, de manière à maximiser les chances de succès et limiter le nombre de tests et donc d'animaux.

- Toutes les mesures possibles seront prises pour maximiser le bien-être et limiter le stress, l'angoisse et la souffrance des animaux.

2931. L'objectif de ce travail est de maintenir la virulence des souches de *Borrelia* présentes au laboratoire car après plusieurs passages en cultures in vitro les souches perdent leur plasmide de virulence et ne sont donc plus efficaces pour infecter des cellules ou des animaux.

Pour tester cette virulence nous inoculons à des souris C3H/HeN âgées de 3 semaines une souche connue et quantifiée de *Borrelia* par voie intra dermique et nous mesurons toutes les semaines la taille des articulations tibio-tarsiennes de celles-ci. Au 30ème jour d'infection nous effectuons un prélèvement sanguin sous anesthésie et nous réalisons une sérologie. Si la sérologie est négative alors l'animal n'est pas infecté il est donc euthanasié. Si la sérologie est positive alors l'animal est infecté et on va donc être utilisé pour faire du transfert de tissus cutanés dans un autre animal sain afin de maintenir la virulence de la souche bactérienne.

Pour cela, on utilise un morceau d'oreille de la souris infectée que l'on va greffer sur le dos (petite incision de la peau) d'une autre souris saine C3H/HeN de 3-4 semaines afin de lui transmettre la maladie. Après 3 semaines de greffe, on anesthésie la souris greffée et on lui prélève du sang en rétro orbital pour faire une sérologie. Si la sérologie est positive alors cette souris sera anesthésiée et un morceau de son oreille sera à nouveau prélevé pour infecter une autre souris C3H/HeN de 3-4 semaines saine pour lui transmettre la maladie. Au bout de trois semaines, on vérifie la sérologie en cas de sérologie positive alors la souris est euthanasiée par surdose d'isoflurane puis exanguination on prélève tous les organes à cette souris (vessie coeur, articulation, peau, cerveau) que l'on met en culture. Au bout de 2 greffes consécutives sur animal sain, on considère que l'on a récupéré tous les plasmides de virulence de la souche bactérienne de *Borrelia*.

Toutes les souris qui ont une sérologie négative seront euthanasiées par surdose d'isoflurane.

L'intérêt de maintenir des souches toujours très virulentes de *Borrelia* nous permet d'étudier l'infection à *Borrelia* dans des modèles in vitro et in vivo aussi proches que les "modèles naturels" d'infection qui circulent dans la Nature et infectent l'Homme.

Nous utilisons en général 6 souris par souche à laquelle il faut rendre ou vérifier la virulence. Les organes prélevés lors de l'euthanasie sont mis en culture et les cultures de *Borrelia* obtenues sont elles même congelées afin de nous permettre d'avoir une souchothèque composée de souches de *Borrelia* à bas passage et donc très virulentes pour permettre des études ultérieures.

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

Remplacement: Nos souches pour récupérer de leur virulence doivent être au contact du système immunitaire de l'hôte et de son système sanguin c'est pourquoi nous avons besoin de travailler sur animal entier.

Raffinement : L'expérience dure environ 30 jours ce qui est une longue période pour les animaux c'est pourquoi nous les gardons par groupe de deux afin de leur éviter un stress supplémentaire.. Les animaux sont observés quotidiennement et si l'on voit qu'un animal éprouve des difficultés pour se déplacer alors on ajoute du paracétamol dans l'eau de boisson et on surveille encore plus cet animal. Si malgré le traitement il n'y a pas d'amélioration alors les animaux seront euthanasiés.

Les animaux sont nourris ad libitum et on dépose dans leur cage des enrichissements afin qu'ils s'y amusent.

Réduction : Nous utilisons le nombre le plus restreint d'animaux pour cette expérience car il n'y a pas d'étude statistique à faire.

Nous utiliserons environ 12 souris/ an soit au total 60 souris pendant les 5 ans..

2932. L'utilisation d'antibiotiques (ATB) est la seule mesure qui s'avère efficace contre les infections chroniques bactériennes pulmonaires. Néanmoins, des posologies mal adaptées sont à l'origine de concentrations inefficaces au niveau pulmonaire. Dans un contexte de pénurie de nouveaux ATB, il convient de développer de nouvelles stratégies d'administration des ATB existants. L'administration pulmonaire d'antibiotiques sous forme d'aérosol permet de cibler directement les poumons et d'augmenter l'efficacité thérapeutique en diminuant les effets secondaires. Ainsi, l'effet direct au niveau des tissus cibles permet l'administration de faibles doses tout en ayant des concentrations locales élevées. L'un des principaux défis liés à cette voie d'administration est le contrôle du dépôt de l'aérosol dans le poumon. Ce défi peut être résolu par le développement de microparticules de faible densité chargées en antibiotiques et ayant des propriétés aérodynamiques appropriées pour atteindre les poumons profonds quand elles sont administrées au moyen d'un inhalateur de poudre. Un point important est que ces microparticules peuvent contrôler la libération du principe actif afin d'obtenir une efficacité maximale. Aussi, le développement de microparticules permettant d'obtenir une libération prolongée d'antibiotiques au sein du poumon permettrait de diminuer la fréquence des inhalations, d'augmenter le suivi du traitement et le confort du patient. L'antibiothérapie pulmonaire utilisant un inhalateur de poudre est en pleine essor. La tobramycine a récemment été approuvée (2012) pour une utilisation via un inhalateur pour le traitement des infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose. Les fluoroquinolones (FQs) sont des antibiotiques utilisés par voie orale pour le traitement intermittent des infections pulmonaires chroniques à *P. aeruginosa*, mais sont maintenant envisagés pour être développés sous forme d'inhalateur de poudre. Cependant, l'absorption systémique des FQs après inhalation pulmonaire est très rapide (< 5 min) et les profils de concentrations plasmatiques sont identiques à ceux obtenus après injection intraveineuse. Aussi, il serait intéressant de diminuer la vitesse d'absorption des FQs afin d'augmenter leur effet local au sein du poumon. Les FQs interagissent avec les cations métalliques (élément chimique chargé positivement), ce qui diminue leur absorption par voie orale. Cet effet pourrait être utilisé pour ralentir l'absorption pulmonaire des FQs et augmenter leur effet local.

Ainsi, l'objectif de ce projet est de développer des microparticules composées de FQs et cations di- ou trivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) aérosolisables par inhalateur de poudre sèche et permettant la libération contrôlée de l'antibiotique au sein du poumon afin de lutter contre les infections pulmonaires bactériennes chroniques.

L'intérêt de l'administration sous forme de microparticules nébulisées de FQs par rapport à la voie intraveineuse de référence sera donc évalué en mesurant pour chaque couple FQ/cation, chaque formulation et chacune des voies d'administration (intraveineuse et nébulisée), les concentrations au niveau plasmatique et pulmonaire par lavages broncho-alvéolaires, ceci à différents temps post administration. Pour cette étude pharmacocinétique (devenir du médicament après administration), le rat a été choisi car c'est la seule espèce rongeuse pour laquelle la technique du LBA est parfaitement décrite. 342 rats seront utilisés pour cette étude et la règle des 3R a été prise en compte dans l'élaboration de ce protocole. Pour réduire le nombre d'animaux, des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA associées à un travail de modélisation pharmacocinétique en aval vont nous permettre de réaliser plusieurs comparaisons entre les groupes. Le remplacement des animaux est impossible car aucun modèle alternatif n'existe pour mimer les concentrations plasmatiques et pulmonaires à la suite d'une administration de substance médicamenteuse. Toutefois, le raffinement est pris en compte pendant l'expérimentation, à savoir que l'administration des microparticules par voie nébulisée et intraveineuse ainsi que les prélèvements sanguins et par lavages bronchoalvéolaires sont réalisés chez des rats anesthésiés. De plus, entre l'administration et les prélèvements, les animaux vigiles sont placés dans un environnement thermostaté, avec libre accès à la nourriture et à l'eau et 2 par cage afin de limiter le stress lié à l'expérimentation.

2933. Les traumatismes sont la première cause de décès dans le monde avant 40 ans. La mortalité est essentiellement liée aux lésions cérébrales et à des pertes sanguines massives (choc hémorragique). L'état de choc est caractérisé par une hypoxie tissulaire systémique persistante, conséquence de la diminution de la volémie plasmatique et de la perte d'hématies transportant l'oxygène. Le métabolisme anaérobie s'initie pour compenser le manque d'oxygène tissulaire. Une acidose lactique, la production de radicaux libres et de protons sont observées entraînant inflammation et mort cellulaire dont les conséquences engagent le pronostic vital du patient.

La présence d'une coagulopathie associée à l'état de choc hémorragique est responsable d'une augmentation de la mortalité et des nécessités transfusionnelles chez ces patients. Ce syndrome, dont la physiopathologie reste mal comprise, est nommé « coagulopathie aigue traumatique ».

A l'heure actuelle, aucun modèle expérimental de coagulopathie traumatique n'est disponible. Ce projet, d'une durée de 8 mois, a pour objectif de mettre au point ce modèle. Il impliquera l'utilisation de 48 rats Sprague Dawley.

Les expérimentations seront réalisées dans le respect de la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) :

- Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum de cas permettant la réalisation d'une étude statistique.
- Le raffinement est respecté au niveau des conditions d'hébergement des animaux et des procédures d'anesthésie/analgesie.
- Il s'agit d'une étude sur une pathologie impliquant l'organisme dans son ensemble et pour laquelle le remplacement n'est pas possible

La mise au point de ce modèle permettra d'évaluer l'impact de différentes prise en charges (molécules pro-coagulantes, transporteurs d'oxygène, solutés de remplissage) sur la coagulopathie traumatique.

2934. L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client de l'entreprise, qui développe notamment des composés thérapeutiques dans le domaine des troubles métaboliques. Le principal objectif de l'étude est d'évaluer les effets d'un composé en développement (nommé, la dénomination du composé est sujette à confidentialité) sur le métabolisme énergétique chez un modèle de rats obèses et diabétiques présentant des perturbations de flexibilité métabolique, le rat ZDF. Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de détailler l'efficacité et les mécanismes d'action de leur composé anti-diabétique.

Le présent projet sera composé de deux paradigmes expérimentaux distincts :

- Dans le premier paradigme expérimental, l'impact des traitements sur la prise alimentaire, le poids corporel, l'activité locomotrice et les échanges respiratoires sera mesuré pendant 72h à l'aide de cages intelligentes (Physiocages) chez un modèle de rat obèse et diabétique (ZDF fa/fa) et chez son contrôle mince (ZDF +/- ?). Ce paradigme permettra de mettre en évidence l'impact des traitements sur un ensemble de composantes du métabolisme énergétique à l'état basal. Le composé X sera administré dans l'eau de boisson tout au long des 72h de mesure. Les résultats seront comparés à ceux obtenus chez des animaux contrôles chez lesquels l'eau de boisson ne contiendra pas le composé. Des prélèvements sanguins seront pratiqués avant et juste après le passage en physiocages et un prélèvement d'organe sera pratiqué à l'issue des 72h de mesures. Au total, ce premier paradigme nécessitera l'utilisation de 32 animaux (4 groupes de 8 animaux).

- Dans le second paradigme expérimental, l'impact des traitements sur l'activité locomotrice et les échanges respiratoires sera mesuré chez des animaux à jeun, à haute fréquence et de façon automatisée pendant 12h à l'aide de cage intelligentes (Physiocages) chez le rat ZDF (fa/fa). L'analyse à jeun permettra d'observer finement l'impact du composé sur la flexibilité métabolique, en particulier sur les variations de taux d'oxydation des lipides et des glucides au cours de la période de jeûne. Le composé X sera administré par gavage oral au début de la période de mesure de 12h afin de s'assurer d'une exposition suffisante à la molécule à court terme. Les résultats seront comparés à ceux obtenus chez des animaux contrôles recevant uniquement le véhicule par la même voie d'administration. La période de jeûne induit classiquement un shift métabolique avec une transition des taux d'oxydation des substrat énergétiques (glucides>lipides). Cette flexibilité métabolique est altérée chez les animaux obèses et diabétiques et notamment chez le rat ZDF. Le présent paradigme permettra ainsi de vérifier si le traitement induit une amélioration de cette flexibilité métabolique. Des prélèvements sanguins seront pratiqués avant et juste après le passage en physiocages et un prélèvement d'organes sera pratiqué à l'issue des 12h de mesures. Au total, ce second paradigme nécessitera l'utilisation de 16 animaux (2 groupes de 8 animaux).

Cette étude pharmacodynamique emploiera un total 48 animaux et étant basée sur des procédures expérimentales très peu invasives, le niveau de souffrance qui pourrait en résulter est par conséquent léger. La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- Raffinement: Le modèle animal d'obésité et de diabète qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur ces pathologies. Un enrichissement des cages d'hébergement sera assuré par l'ajout de briquettes de bois. Par ailleurs, les animaux seront suivis de façon quotidienne de façon à détecter tout signe d'inconfort et de permettre une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise sur l'analyse des paramètres d'intérêt sur de

nombreux modèles rongeurs obèses et diabétiques. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

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

2935. La mise en œuvre d'un Réseau de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines français depuis sa création en 1984 a pour mission le contrôle de la qualité des produits de la mer et du milieu marin pour la consommation humaine.

Ces contrôles s'effectuent par bio-essais sur souris pour la recherche de phycotoxines paralysantes (PSP) présentes dans les mollusques bivalves issus des zones de production conchylicoles ou des gisements naturels.

Par ailleurs, dans le cadre de l'évolution au 01 janvier 2010 du dispositif national de surveillance des phycotoxines lipophiles (Lipophiles) dans les coquillages fondée sur l'analyse chimique ciblée des phycotoxines réglementées (LC-MS/MS) à la place du bio-essai sur souris (outil de détection de toxicité globale), un dispositif de vigilance a été mis en place. Il permet notamment de détecter l'apparition de phycotoxines non réglementées et de phycotoxines lipophiles non connues. Ce suivi,

réalisé à une fréquence mensuelle, recommande une analyse concomitante des échantillons de coquillages par analyse chimique sur la chair totale et la glande digestive et par bio-essai sur souris de la glande digestive.

N total maximal = 2600 [il s'agit du nombre maximal de souris hébergées dans la structure, soit 50 souris / semaine].

Concernant la règle des 3R, les deux bioessais sont strictement définis par les protocoles délivrés par un Laboratoire de référence. Pour un échantillon donné, seules 3 souris sont utilisées par bioessai (PSP ou Lipophiles) ce qui est la Réduction maximale autorisée. Concernant le Remplacement, les bioessais sont dans une phase de remplacement par des analyses chimiques puisque l'on connaît certaines des molécules recherchées mais cela n'est pas possible pour les phycotoxines non réglementées ou des phycotoxines lipophiles non connues. Concernant le Raffinement, les tests durent de 15 min à 24h durées pendant lesquelles les souris sont hébergées en conditions standard à l'exception de l'enrichissement qui n'est pas autorisé dans ces bioessais.

2936. Les métastases osseuses sont des complications fréquentes de nombreux cancers dont le cancer du sein. Elles provoquent une morbidité importante chez les patientes, entraînant en particulier l'apparition de fractures pathologiques. Les métastases osseuses sont la conséquence d'une dissémination des cellules cancéreuses dans la moelle osseuse qui, secondairement, sécrètent des facteurs solubles capables de stimuler exagérément la formation et l'activité des ostéoclastes (cellules osseuses responsables de la résorption osseuse). Cette stimulation de la résorption osseuse conduit à une destruction osseuse et donc à l'apparition de fractures pathologiques. Cette observation a conduit à l'utilisation en clinique de médicaments inhibiteurs de la résorption osseuse, les bisphosphonates. Ils diminuent la fréquence d'apparition et la progression des fractures pathologiques chez les patientes souffrant d'un cancer du sein métastatique.

Plus récemment, il a été observé que les cellules cancéreuses sécrétaient non seulement des facteurs capables de stimuler la résorption osseuse, mais également d'autres facteurs (comme la sclérostine) qui inhibent la formation et l'activité des ostéoblastes (cellules osseuses responsables de la formation osseuse). Il en résultait donc que la destruction osseuse induite par les cellules cancéreuses était en fait la résultante d'une stimulation de la résorption osseuse et d'une inhibition de la formation osseuse.

Au vu de ces résultats nous émettons l'hypothèse qu'un traitement associant un bisphosphonate (inhibiteur de la résorption osseuse) et un antagoniste de la sclérostine (stimulateur de la formation osseuse) devrait permettre une plus grande efficacité dans le traitement des métastases osseuses en favorisant la reconsolidation osseuse.

Afin de tester cette hypothèse, nous allons traiter des animaux porteurs de métastases osseuses avec un anticorps anti-sclérostine, seul ou en association avec un bisphosphonate (zoledronate), pour savoir si l'association de ces deux traitements est supérieure à une monothérapie pour inhiber la progression des lésions osseuses chez les animaux. Dans une seconde étape, nous testerons l'efficacité de l'anti-sclérostine, seul ou en association avec le zoledronate, sur la prévention des métastases osseuses. Dans ces conditions expérimentales, les animaux seront traités avant l'apparition de lésions osseuses. Si notre hypothèse s'avère exacte, nos résultats permettront d'envisager une nouvelle stratégie thérapeutique en clinique.

Les règles d'expérimentation seront comme suit. Les souris seront tout d'abord placées en stabulation durant une semaine avant le début du protocole, au sein de l'animalerie d'accueil. Elles cohabitent par groupe de cinq dans un environnement enrichi (maison rouge, coton), sous surveillance quotidienne. Tout élément rentrant en contact avec la souris est stérile: nourriture et litière sont irradiées, grilles, cages et biberons sont autoclavés. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Le change de la litière et de la cage s'effectue une fois par semaine par le personnel compétent de l'animalerie. Pendant toute la durée de l'étude, l'état de bien-être des animaux sera évalué quotidiennement. L'observation de signe de douleur ou de mal être (prostration, état du pelage, perte de poids) entraînera la sortie du protocole de l'animal. Lors de l'injection des cellules tumorales, les souris seront anesthésiées. Elles seront traitées par la buprénorphine lors de l'apparition des lésions osseuses (>6-8 mm²) (Raffinement).

La preuve de concept in vitro ne suffit pas pour valider l'efficacité de l'anticorps anti-sclérostine sur les métastases osseuses, nous devons utiliser des modèles animaux. Ce modèle animal est le seul qui nous permettra d'évaluer, l'efficacité de l'anticorps anti-sclérostine dans une approche métastatique. Les modèles in vitro ne pouvant pas mimer la complexité d'un organisme (Remplacement).

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque groupe contiendra le nombre de souris minimum (8 souris par groupe pour le protocole safety, 15 souris par groupe pour les protocoles curatif et préventif) indispensable à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Un nombre total de 136 souris Balb/c nude sera donc nécessaire (Réduction).

2937. Les vaisseaux HEVs - pour High Endothelial Venules - sont des vaisseaux spécialisés dans le recrutement de lymphocytes qui sont localisés dans les ganglions lymphatiques. Des vaisseaux HEVs sont également retrouvés dans les maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes. Ces pathologies se caractérisent par une réponse inappropriée du système immunitaire. En favorisant l'entrée de lymphocytes sur le site d'inflammation, les vaisseaux HEVs semblent contribuer au développement et au maintien de ces maladies.

Les cellules formant les vaisseaux HEVs sont très plastiques et peuvent, suite à des modifications du microenvironnement, perdre leur capacité de recrutement des lymphocytes. Récemment, certains mécanismes contrôlant le maintien des vaisseaux HEVs dans les ganglions lymphatiques en condition physiologique ont été identifiés. Toutefois, les mécanismes régulant le développement des vaisseaux HEVs au cours des maladies inflammatoires chroniques, demeurent encore largement inconnus. Ce projet a donc pour but d'identifier les mécanismes contrôlant les vaisseaux HEVs en conditions inflammatoires. Mieux connaître la régulation des vaisseaux HEVs en condition pathologique est crucial. Dans le cas des maladies inflammatoires chroniques bloquer la fabrication des vaisseaux HEVs permettrait de freiner l'entrée de lymphocytes sur le site

d'inflammation et ainsi d'enrailler la boucle inflammatoire qui entretient ces pathologies. De plus la connaissance des mécanismes moléculaires d'induction et de maintien du phénotype HEV devrait aussi permettre de développer des protocoles de mise en culture et de maintien de cultures cellulaires de HEV plus satisfaisantes afin de disposer de modèles alternatifs pour une partie des études ultérieures.

L'analyse fonctionnelle des HEV nécessite de travailler dans un modèle animal sauvage ou transgénique, car ces analyses ne peuvent se faire en dehors d'un système biologique intégré comportant tous les acteurs cellulaires (système immunitaire, microenvironnement inflammatoire). Aucun système cellulaire complexe ne peut y être substitué à ce jour et le maintien en culture de cellules endothéliales de type HEV est encore extrêmement limité. Dans le cadre de ce projet, deux modèles d'inflammation sont développés, un modèle d'inflammation aiguë du ganglion, et un modèle d'inflammation chronique de la peau. L'ensemble des procédures a fait l'objet d'expériences pilotes afin de valider les conditions expérimentales, temps de traitement, nombre d'animaux par groupe nécessaire aux analyses et validation statistiques. Le suivi des animaux est quotidien un maximum de 3030 souris seront utilisées, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au minimum permettant d'atteindre des valeurs statistiques correctes et les temps de traitement ont aussi été optimisés afin d'engendrer le moins de stress possible pour l'animal.

Pour ces analyses fonctionnelles, nous avons développé des techniques d'imageries par microscopie intravitale qui permettent de suivre simultanément plusieurs paramètres et nous permettent donc de réduire le nombre d'animaux utilisés pour atteindre ces données fonctionnelles.

2938. Le laboratoire teste l'efficacité biologique des substances actives ou des formulations biocides sur des souches de diptères (moustiques) et culicidae hématophages nuisants. L'étude de la biologie, l'écologie, l'éthologie des espèces cibles et de leur sensibilité aux biocides nécessitent la production d'une quantité importante de moustiques de souches de référence élevées ou de populations sauvages, aux stades larvaires ou adultes en insectariums.

Le laboratoire dispose de deux animaleries où sont hébergés et soignés 16 cobayes exposés à des populations de différentes souches de moustiques (*Culex quinquefasciatus*, *Cx. pipiens*, *Cx. modestus*, *Aedes caspius*, *Ae. detritus*, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* et autres espèces sauvages), pour assurer le cycle de reproduction des femelles hématophages.

Le gorgement hebdomadaire des femelles s'opère sur des animaux anesthésiés mis en contact direct avec les moustiques dont les espèces ne tolèrent pas ou mal le repas de sang artificiel. Hormis l'utilisation d'anesthésique en sous-cutané, permettant la réduction du stress et de la gêne liée à la manipulation de l'animal ou aux piqûres de moustiques, aucune autre manipulation n'est effectuée sur les animaux. Dans un souci de réduire la fréquence d'exposition à l'anesthésique et aux piqûres de moustiques à un intervalle de 15 jours (dans des conditions optimales), il est essentiel de multiplier par 2 le nombre de cobayes utiles : soit 16 cobayes pour le maintien de 8 souches de moustiques.

Le nombre de cobayes utilisés au total sur 5 ans est estimé à 30. Les cobayes sont élevés en cage par paire. Leur état de santé est vérifié selon des critères précis. Ils reçoivent, en dehors des soins et visites quotidiennes obligatoires, une attention particulière et des soins spécifiques (supplémentation en vitamine C, coupe régulière des griffes, régime de fruits et légumes frais adaptés à leur physiologie). Le choix d'utiliser des cobayes rustiques (domestiques, non albinos) et la qualité des soins qui leur sont apportés, leur permettent une espérance de vie moyenne de 3 à 4 ans.

2939. Les cellules souches neurales (CSN) sont le réservoir de la neurogenèse adulte, permettant de produire de nouveaux neurones tout au long de la vie chez les mammifères. Cependant, même si le stock de CSN reste constant au cours du vieillissement, la neurogenèse décroît progressivement avec l'âge, provoquant des déclin cognitifs incurables. Les traitements pharmacologiques visant à la stimulation des CSN quiescentes (dormantes) constitue un espoir thérapeutique contre les maladies neurodégénératives. La voie Sonic Hedgehog (Shh) est importante pour la régulation des CSN et des cellules issues des premières divisions (progéniteurs) se situant au niveau de la zone sous-ventriculaire (ZSV), une des deux principales zones de neurogenèse du cerveau adulte. Nous avons déjà montré qu'une activation génétique de la voie Shh permet d'amplifier le stock de CSN quiescente en stimulant leur division symétrique. Nous cherchons pour ce projet à vérifier si l'injection de Shh intraventriculaire permet la sortie de quiescence des CSN et la production de nouveaux progéniteurs neurales à court terme. Cette expérience permettra de valider la modulation pharmacologique de la voie Shh comme un candidat crédible pour la stimulation des CSN.

Le protocole mis en jeu ici rend indispensable le recours à l'animal vivant. Aucune méthode alternative ne peut le remplacer. En effet il est clairement établi que l'environnement cellulaire joue un rôle clé dans le maintien de la quiescence des CSN qu'il n'est pas possible de reproduire de manière identique en culture *in vitro*. Le modèle retenu pour ce projet est le rongeur dont le nombre d'animaux par lot (un lot témoin et un lot traité) a été estimé à 5 et a été ramené au minimum nécessaire pour assurer la validité des résultats. Un total de 10 rongeurs élevés dans nos locaux sera nécessaire à cette étude qui se déroulera sur 3 mois.

Sur un modèle de souris transgénique Fucci-Green qui permet à l'aide d'un gène rapporteur fluorescent de repérer les différentes phases du cycle cellulaire, des injections intraventriculaires de Shh seront réalisées après anesthésie et analgésie par stéréotaxie. 72 heures après injection, les rongeurs seront profondément anesthésiés puis euthanasiés afin d'analyser par cytométrie en flux les cellules de la zone sous-ventriculaire de leur cerveau. C'est l'analyse de la proportion de cellules Fucci-Green positives parmi les populations qui nous permettra d'en évaluer leur prolifération.

Bien que les protocoles d'anesthésie et d'analgésie soient définis et validés par une équipe de vétérinaire, l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience (3 jours) et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Les animaux sont hébergés selon les règles en vigueur dans l'animalerie. Le suivi quotidien des rongeurs, hébergés en groupe,

garantira leur bien-être. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Leur état de santé sera surveillé tout au long de l'expérience, afin d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance

2940. Il est aujourd'hui bien démontré que les grands prématurés, soumis à un nombre croissant de procédures invasives lors de leur séjour en Unité de Soins Intensifs, ressentent la douleur et que cette dernière a des conséquences délétères à court et long terme sur leur développement neurologique. La prévention de cette douleur doit donc faire partie intégrante de la prise en charge de ces enfants. Il n'existe cependant aucun consensus concernant les moyens à mettre en œuvre dans cette population. Les pratiques antalgiques sont très hétérogènes et la place des anesthésiques n'est pas clairement définie. Ainsi, bien que le sevoflurane soit l'agent anesthésique volatil le plus utilisé en pédiatrie et en néonatalogie, il n'existe que très peu de données quant à sa tolérance et ses effets à long terme, et en particulier chez les nouveau-nés prématurés, population dans laquelle aucune donnée n'est disponible. En parallèle, il existe un très grand nombre de données de la littérature rapportant les effets neurotoxiques des anesthésiques chez l'animal exposé en période néonatale. Ainsi, plusieurs études rapportent des effets délétères (mort neuronale, anomalie de formation des synapses) des gaz halogénés (Desflurane, Isoflurane et Sevoflurane) chez le rongeur, mais avec des durées d'exposition longues (6h ou plus) et/ou répétées. Ces conditions ne reflètent pas les pratiques courantes en néonatalogie chez le nouveau-né prématuré qui est soumis à des durées d'exposition plus faibles. Le but de notre étude est d'analyser les effets d'expositions courtes (<1h) au sevoflurane chez le raton âgé d'une semaine de vie postnatale, un âge représentatif des conditions de prématurité chez le nouveau-né humain. Les ratons (130 individus au total) seront exposés au sevoflurane (1-3% dans 100% d'oxygène) sur une station d'anesthésie fabriquée selon les normes européennes d'utilisation hospitalière et composée d'un évaporateur relié à une enceinte en plexiglass transparente étanche au sein de laquelle un volume contrôlé de sevoflurane / oxygène viendra circuler. L'admission de gaz est contrôlée par un débitmètre et le flux de gaz est constant, prévenant l'accumulation du dioxyde de carbone expiré. L'enceinte en plexiglass est placée sur un tapis chauffant. Les signes cliniques d'hypoxie ou de détresse respiratoire au cours de l'exposition au sevoflurane seront contrôlés. La saturation pulsée en oxygène (SpO2) et l'activité électrocardiographique seront contrôlées chez certains animaux, tout comme le taux de glucose sanguin. Aucune hypoxie ou arythmie cardiaque n'est néanmoins attendue. Les ratons seront remis à leur mère en fin d'exposition (13 rates). Plusieurs groupes expérimentaux seront constitués : des animaux témoins et des animaux exposés à 1, 2 et 3% sevoflurane, qui seront analysés 4h, 24h ou 7 jours après exposition grâce à des techniques histologiques et de biologie moléculaire. Les analyses auront pour objectifs d'évaluer les effets potentiellement neurotoxiques du sevoflurane concernant l'organisation anatomique générale du cerveau, la mort neuronale et la formation des synapses. Concernant l'étude des synapses, une méthode permettant de visualiser les sites synaptiques après transfert de gènes au sein du cerveau embryonnaire par transfection par électroporation in utero sera utilisée. Les embryons portés par 4 rates gestantes subiront cette procédure avant exposition. Les animaux seront hébergés en animalerie A2, feront l'objet d'un suivi quotidien par les zootechniciens et les conditions d'hébergement seront enrichies (bâtons à ronger, tunnels). La souffrance et la douleur seront évaluées et traitées.

2941. Discipline frontière à l'interface entre Neurosciences et Immunologie, la neuro-immunologie occupe aujourd'hui une place de plus en plus importante. De nombreux travaux insistent en effet sur la communication étroite, à la fois moléculaire et cellulaire s'opérant entre ces deux systèmes intégratifs et l'importance du système immunitaire dans la mise en place du système nerveux, que ce soit au niveau central (SNC) ou périphérique (SNP). La connaissance et la compréhension de ces interactions s'avèrent cruciales pour la caractérisation de processus neurodégénératifs et de dérèglements immuns, dans la mesure où nombre de pathologies sont concernées par cette interface. Sclérose en plaque, maladie d'Alzheimer et de Parkinson ou encore maladie à prions sont en effet autant de pathologies directement concernées par ces interactions neuro-immunitaires.

Dans le cadre de ce projet, l'étude du système olfactif représente un modèle de choix pour mettre en évidence les interactions s'opérant entre système nerveux et système immunitaire. En effet, le système olfactif est le seul à posséder des neurones directement en contact avec l'environnement au niveau de la muqueuse olfactive. Cette muqueuse est donc un accès privilégié de pathogènes vers le système nerveux central. Bien que peu caractérisés à l'heure actuelle, des études préliminaires ont montré que les neurones sensoriels olfactifs expriment de nombreux récepteurs aux messagers du système immunitaire, dont ceux à l'IL17C, à un niveau très élevé. Ce projet est axé sur les études des mécanismes d'action de l'IL17C. Il peut agir directement sur la détection du signal odorant mais aussi par une action sur la dynamique de ce tissu qui se régénère en permanence. Il pourrait également jouer sur la résistance de l'organisme à l'entrée de pathogène.

Les approches expérimentales que nous utilisons incluent: l'injection intranasale de 4 microlitres par narine d'une solution témoin ou d'une solution d'IL17C, 2 fois par jour pendant 10 jours à des souris, puis l'étude du comportement de ces animaux exposés à des odeurs, l'enregistrement de l'activité de la muqueuse olfactive et l'évaluation de l'impact de l'IL17C au niveau du renouvellement cellulaire de ce tissu.

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

Les souris incluses dans ce projet (60 souriceaux nouveau-nés (<10J) et 180 souris de 2 mois) sont nées et élevées en captivité et proviennent d'un élevage autorisé. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des résultats. Les deux procédures expérimentales sont de sévérité légère, et elles ont été

choisies, en accord avec la Structure chargée du Bien Etre des Animaux de l'installation, pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Les animaux sont entraînés à coopérer à ces deux procédures, ce qui permet de diminuer efficacement leur stress éventuel. La santé et le bien-être des animaux sont régulièrement contrôlés par du personnel agréé, en accord avec la législation en vigueur.

2942. Le tractus gastro-intestinal est un milieu complexe dans lequel coexistent des cellules épithéliales et immunes de l'hôte, une grande diversité de microorganismes et des antigènes alimentaires. Le microbiote intestinal est notamment composé de plusieurs milliards de microorganismes qui sont étonnamment bien tolérés par l'hôte. Dans certaines circonstances, la tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal est rompue, conduisant à une réponse immune et à une inflammation intestinale ou extra-intestinale. C'est notamment le cas dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) comme la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). La rupture de cet équilibre s'illustre par une dysbiose au niveau du microbiote du tube digestif c'est à dire une modification des quantités et des proportions des microorganismes composant le microbiote. Des données concrètes existent sur la modification des populations bactériennes alors que la composante fongique de ce microbiote est beaucoup moins connue. Le but du projet est de comprendre le rôle du microbiote fongique dans les interactions entre le système immunitaire intestinal et le microbiote intestinal en situation basale et au cours de l'inflammation. Afin de précisément définir les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'inflammation et le rôle du microbiote dans ces maladies trois types de modèles de colites seront utilisés : (i) par traitement chimique ; (ii) par infection microbienne et (iii) par transfert adoptif de cellules immunitaires. En parallèle dans ces différents contextes le microbiote en lui-même pourra être modifié par différents moyens : traitements antibiotique, antifongique, gavage par des souches fongiques ou bactériennes ou même transfert de microbiote avec l'usage de souris axéniques. L'essentiel des prélèvements (sang, tissus, contenus intestinaux) sera fait post mortem à l'exception des fèces. Dans une volonté de mettre en œuvre la règle des 3R, nous avons prévu d'utiliser au maximum les expérimentations in vitro sur des lignées cellulaires ou des cellules primaires pour réduire le nombre d'animaux utilisés. Nos groupes de souris seront réduits à 8-10 souris par paramètre étudié, car travailler avec moins de souris ne permettrait pas d'obtenir des résultats statistiquement significatifs étant donné la variabilité observée dans ces expérimentations animales. L'étude de ces écosystèmes impose d'utiliser un modèle animal pour valider les hypothèses soulevées grâce aux résultats des expérimentations in vitro. En effet, il n'existe pas aujourd'hui de modèle in vitro récapitulant tous les paramètres du tube digestif. De plus, l'ensemble des procédures proposées sont spécifiques de modèle in vivo et ne pourrait être fait dans d'autres contextes. Sur la durée totale du projet (5 ans) un total maximum de 1500 souris conventionnelles ou axéniques confondues seront utilisées.

Chacune des expérimentations est effectuée avec des doses adaptées n'engendrant pas ou très peu de mortalité, les durées d'expérimentations n'excèdent pas 28 jours et les conditions d'euthanasie sont clairement définies.

2943. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la 5ème cause de cancer et la 2ème cause de décès par cancer. Son traitement, lorsqu'il est possible, est interventionnel (chirurgical ou radiologique). Le diabète de type 2 (DT2) est un facteur de risque connu de CHC. Ainsi, dans les pays occidentaux, 30-40% des cas de CHC surviennent sur un syndrome métabolique. Des études récentes ont mis en évidence un effet protecteur de la metformine, antidiabétique oral non hypoglycémiant, sur la survenue de CHC chez les patients diabétique, mais aucune étude n'existe hors contexte de diabète. D'autre part, tous les modes d'action de la metformine ne sont pas compris, en particulier dans les interactions entre ses effets et les processus de fibrogénèse précédant le CHC, de même que ces effets sur la carcinogénèse et les liens entre ceux-ci et le syndrome métabolique.

De plus, toutes les études précliniques actuelles, basées sur des modèles animaux de CHC induit, n'évaluent pas l'effet préventif au long cours de la metformine. Nous proposons donc d'évaluer l'effet de la metformine dans la prévention au long cours du CHC dans des modèles de CHC spontanés chez les rongeurs exempts ou non de la problématique métabolique.

Pour cela nous réaliserons une étude prospective sur 12 mois d'administration de la metformine à un modèle spontané et non induit de carcinome hépatique chez rat LEC qui est un modèle animal dont les lésions de fibrose hépatique et de CHC découlent de l'accumulation toxique de cuivre dans les hépatocytes. Il ne présente aucun trouble métabolique. Par ailleurs, l'absence de modèle spontanée de CHC combiné à la composante métabolique telle que le diabète chez le rat nous amène à comparer le modèle de rat LEC à un modèle chez la souris TSOD qui, développe de façon spontanée également un CHC associé à des altérations métaboliques. Nous suivrons les différents groupes d'animaux sur le plan clinique, biologique et morphologique afin de mesurer le développement de la fibrose et du CHC. Nous étudierons aussi les voies de carcinogénèse et de fibrose hépatique impliquées dans ces différents modèles animaux et leurs relations respectives avec la metformine à partir d'échantillons de foie post mortem.

Cette étude va nous permettre de confirmer l'intérêt de la metformine en prévention du CHC sans troubles métaboliques sous-jacent, menant à court terme à un essai clinique facilité par la bonne connaissance de ce médicament en pharmacopée humaine. Elle pourrait également mener à l'identification de cibles d'action nouvelles, ouvrant la voie à de futures recherches de traitement du CHC.

Afin de répondre à l'utilisation d'une analyse multi variée des caractéristiques de représentativité d'un effet bénéfique nous avons établis à un nombre de 60 rats LEC et 48 souris TSOD maximum nécessaires à cette étude. A notre connaissance il n'y a pas de méthodes de substitutions. Par ailleurs l'observation du comportement, et de l'intégrité physique de l'animal sera effectuée de manière journalière tout au long de la période d'expérimentation (Week end et jours fériés compris) par la réalisation d'un score de points limites. Un score de 5 suivant le tableau des points limites entrainera l'arrêt de

l'expérimentation pour l'animal. En cas de détection de douleurs de l'animal une procédure d'analgésie sera mise en place. Une non réponse à la procédure d'analgésie ou de procédure de soin entrainera l'euthanasie de l'animal par gradient de CO₂.

2944. Notre sujet de recherche est orienté vers l'étude des mécanismes moléculaires contrôlant le développement du cortex cérébral et, lorsqu'ils sont perturbés, sont à l'origine de maladies neuro-développementales chez l'homme. En particulier, l'objectif principal de notre travail est de mieux comprendre le rôle du centrosome au cours de ce processus complexe de développement. Le centrosome est une organelle clé de la cellule car il participe grandement à l'établissement et au maintien de la morphologie cellulaire et à l'organisation intracellulaire des autres composants de la cellule. Des mutations dans des gènes codant pour des protéines centrosomales sont associées à des pathologies du système nerveux tel que l'épilepsie ou la microcéphalie. Ici nous souhaitons comprendre comment cet organelle régule le développement du cortex et pourquoi le cerveau est si sensible à des défauts de composition du centrosome. Ainsi nous pourrions améliorer notre compréhension des mécanismes soutenant l'apparition dans ces maladies chez l'homme.

Le développement du cortex a été bien décrit chez les mammifères et est très proche du développement humain. Dès lors, ce modèle est le plus adapté pour répondre à notre question biologique. De plus, aucun modèle d'expérimentation *in vitro* ne peut mimer ou refléter toute la complexité des phénomènes ayant lieu dans le cortex en développement, tels que la prolifération des progéniteurs neuronaux, la migration et la différenciation neuronales.

Nous analysons le rôle de nos gènes d'intérêt pendant les stades de développement embryonnaire du cerveau grâce à des approches génétiques visant à modifier l'expression ou la fonction des protéines étudiées. Pour cela, nous avons besoin de transférer de l'ADN plasmidique non pathogène par un protocole d'injection/électroporation *in utero* dans le système nerveux central d'embryons de souris gestante anesthésiées. En sacrifiant les animaux à différents temps de la gestation, nous pouvons étudier les conséquences cellulaires de ces modifications génétiques sur les différentes phases du développement du cerveau.

Le nombre total de souris gestantes utilisées pour ce projet est estimé à 464 femelles gestantes correspondant à environ 4000 embryons manipulés. Le nombre de souris utilisées est justifié par l'étude des conséquences de la perte de fonction et de la surexpression des formes mutées des gènes d'intérêts (6 conditions au total- 4 gènes d'intérêt) à différents stades du développement (2 stades embryonnaires et 2 stades postnataux).

L'utilisation de l'expérimentation animale pour nos travaux est rendue nécessaire par la complexité de l'environnement cortical qui ne peut pas être recréé par des approches *in vitro*. Toutefois, nous garderons à l'esprit notre responsabilité de diminuer au maximum le nombre d'animaux expérimentés tout en atteignant la significativité statistique. Pour minimiser le nombre d'animaux utilisés, aucune nouvelle expérience ne sera effectuée avant qu'une analyse complète des précédentes ne soit réalisée.

Nous prendrons en compte avec la plus grande attention le bien être de nos animaux. L'élevage et la reproduction de nos animaux se font dans un environnement contrôlé permettant une réduction du stress pour l'animal. Durant l'expérimentation les femelles gestantes sont anesthésiées par voie gazeuse (isoflurane). Nous limitons le temps de manipulation à 45 minutes sur l'animal anesthésié. Un anti-inflammatoire non-stéroïdien, la metacam, est injecté avant l'opération par voie sous-cutanée. La metacam est également ajoutée au biberon pendant 2 jours après la chirurgie (2mg/kg dans l'eau de boisson). L'animal se réveille dans une cage chauffée à 35°C et est surveillé régulièrement. Nous vérifions que les animaux mangent et s'abreuvent normalement. Les jours suivants, les animaux sont surveillés deux fois par jour pour voir notamment si la plaie a besoin de soins et pour détecter d'éventuelles infections post-chirurgicales ou autres complications. L'objectif est de prévenir toute douleur ou détresse. En cas d'infections importantes ou de douleur manifeste, les animaux sont euthanasiés immédiatement par dislocation cervicale.

2945. Les gliomes (ou tumeurs gliales) correspondent à un type particulier de tumeurs cérébrales dont le grade de malignité est extrêmement variable d'un patient à l'autre. Les plus sévères d'entre eux (c'est-à-dire de grade IV ou glioblastomes) sont caractérisés par un pronostic vital très sombre du fait de leur résistance aux thérapies conventionnelles (chirurgie suivie d'une radio-chimiothérapie) et par conséquent de la rechute systématique de la maladie. Le développement de nouveaux principes actifs est donc un défi permanent.

Le projet consiste à évaluer les effets anti-tumoraux de différentes approches thérapeutiques (chimiothérapie délivrée par voie systémique ou locale associée ou non à une radiothérapie) dans des modèles orthotopiques (c'est-à-dire à leur emplacement anatomique habituel) de tumeurs gliales induites chez les rongeurs par implantation intracrânienne de cellules de gliome. En cas d'approche thérapeutique locale, l'administration intracérébrale (voie intra-tumorale) pourra nécessiter la mise en place d'une canule à demeure ; cette canule pouvant servir à la fois pour l'inoculation des cellules tumorales et pour l'administration des substances à l'essai.

Un suivi longitudinal et non-invasif de la croissance tumorale pourra être réalisé par l'utilisation des techniques d'imagerie optique comme la bioluminescence et la fluorescence *in vivo*, ou de l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

La durée totale de suivi dépend de la cinétique de croissance tumorale *in vivo* des cellules implantées ainsi que de l'apparition des signes cliniques associés à la tumeur (de quelques semaines à plusieurs mois - 6-9 mois - selon le type et l'origine des cellules tumorales implantées). En fin d'expérience, le cerveau des animaux contenant la tumeur pourra être prélevé pour analyses. D'autres prélèvements de tissus ou de sang pourront être effectués en phase terminale.

Au cours de chaque étude de ce projet, différents groupes d'animaux seront constitués (en général 4 groupes avec 10 animaux par groupe). Pour ce projet d'une durée de 5 ans, il est prévu un nombre maximum de 1200 souris (4 groupes de 10 souris par étude x 6 études par an x 5 ans) et 400 rats (4 groupes de 10 rats par étude x 2 études par an x 5 ans).

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur (souris ou rat) car il n'existe pas de méthode alternative (in vitro ou in silico) permettant de se substituer complètement aux essais in vivo pour évaluer les effets d'une nouvelle approche thérapeutique sur les gliomes. Avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité ou de la toxicité d'un candidat médicament. À ce jour, les rongeurs (souris ou rat) sont les espèces les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par étude est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est effectué par :

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à des procédures peu invasives et peu douloureuses lors du suivi tumoral par imagerie
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire
- l'utilisation de techniques d'analyses et de dosage adaptées nécessitant le moins de volume sanguin possible lors des prélèvements.

2946. Les anticorps immunomodulateurs permettent d'obtenir des fontes tumorales durables dans le temps dans des cancers métastatiques en rechute habituellement non sensibles aux thérapeutiques conventionnelles et dans des types histologiques aussi divers que le mélanome, le cancer du poumon ou le cancer de vessie. L'arrivée de ces anticorps en cancérologie pédiatrique est en cours.

Le challenge thérapeutique des années à venir est d'identifier des combinaisons thérapeutiques permettant et d'augmenter le nombre de sujets sensibles à ces traitements et en augmenter l'efficacité.

Il a été montré que des agonistes de récepteurs Toll-like (TLR) augmentaient l'efficacité des anticorps immunomodulateurs. D'autres travaux ont montré que les vaccins anti-infectieux disponibles commercialement avaient des vertus d'agonistes de TLR. Nous souhaitons produire la preuve de concept que ces vaccins anti-infectieux, produits de grade clinique, commercialement disponibles et peu onéreux, peuvent augmenter l'efficacité des anticorps immunomodulateurs quand utilisés en combinaison.

1-Objectif scientifique du projet:

Déterminer des combinaisons synergiques permettant d'améliorer l'efficacité thérapeutique des anticorps immunomodulateurs en cancérologie en utilisant des vaccins anti-infectieux comme agents immuno-stimulants.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Production du rationnel pré-clinique nécessaire à la réalisation d'un essai clinique de phase I/II testant la faisabilité et la toxicité de la stratégie d'immunisation in situ avec d'injections intra-tumorales d'agents immunostimulants tels que les vaccins anti-infectieux.

3- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Les expériences de ce projet ont été optimisées pour une utilisation minimale des modèles animaux. Les vaccins anti-infectieux ont été validés in vitro sur les lignées tumorales pour leur propriété oncolytique. Une validation in vivo chez la souris est néanmoins indispensable pour apprécier l'interaction avec le système immunitaire et l'activité antitumorale de ces approches d'immunothérapie innovante. Le nombre de souris utilisées est réduit au maximum sans toutefois compromettre l'interprétation statistique des résultats obtenus. Une surveillance adaptée des animaux et une définition de points limites précoces permettent de limiter au maximum la souffrance des souris.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Nombre maximum de souris : 740

2947. Chez l'homme, la toxine botulique est utilisée dans le traitement des maladies neurologiques caractérisées par une contraction exagérée d'un muscle entraînant des troubles des mouvements et/ou de posture qui peuvent être chroniques et douloureux (spasticité des membres, torticolis, le pied bot équin, contractions de la mâchoire, contraction des paupières entraînant la fermeture répétitive et incontrôlée des paupières...). Le traitement consiste en l'injection de petites quantités de toxine botulique dans les muscles atteints empêchant la stimulation du muscle par le nerf associé. La toxine botulique induit alors une faiblesse des muscles hyperactifs injectés. Ce traitement est efficace mais n'agit qu'après quelques jours et doit être renouvelé après plusieurs mois.

Des recherches sont donc faites pour améliorer la puissance, la rapidité et la durée d'action des toxines.

L'activité des toxines est testée selon un processus qui débute par une évaluation in vitro avec des tests purement biochimiques puis sur des cultures de différents types cellulaires et ensuite différents types de muscles isolés de rongeurs. Le recours aux animaux n'est fait que si les toxines ainsi testées répondent aux critères recherchés. Elles seront testées sur le rat et la souris. L'utilisation des deux espèces et le choix des souches sont basés sur leur différence de sensibilité aux sous-types de toxines étudiées.

La toxine ou son solvant (milieu dans lequel elle est préparée) sont injectés dans un muscle d'une patte du rongeur anesthésié. Cette injection est faite au travers de la peau ou après une petite incision de la peau préalablement rasée ceci afin de bien identifier le muscle d'intérêt. L'incision est refermée par une agrafe et suivie lors de la surveillance quotidiennement de l'état de santé des animaux.

Ce projet a pour objectif d'étudier l'effet d'une toxine de référence sur l'activité musculaire en utilisant 4 différentes méthodes complémentaires largement décrites et utilisées. Sa caractérisation grâce à ces méthodes servira de base et de référentiel à l'étude de nouvelles toxines. Seront ainsi mesurés:

- La faiblesse musculaire spontanée de la patte injectée par simple observation et quantification de l'écartement des doigts
- La répartition du poids de l'animal sur ses pattes lors de son déplacement libre dans un espace clos sans l'intervention d'un opérateur.
- La force musculaire maximale développée lorsque que l'animal s'agrippe à une grille.
- L'activité électrique de différents muscles par électromyographie (mesure de l'influx nerveux sous anesthésie) selon une méthode proche de celle utilisée chez l'homme

Le nombre d'animaux utilisé est réduit car les 4 tests sont pratiqués sur les mêmes animaux et répétés 2 fois dans le temps permettant ainsi de suivre chez un même animal l'évolution de l'activité de la toxine étudiée. Ainsi la qualité des résultats est améliorée par une diminution de la variabilité inter-animal et la possibilité de comparer l'évolution des différents paramètres mesurés chez le même animal.

Raffinement:

Les procédures associées à une piqure sont réalisées sous anesthésie générale gazeuse par inhalation qui permet un bon confort des animaux placés sur une table chauffante et un réveil rapide lorsqu'elle est arrêtée. Pendant l'anesthésie les animaux sont placés sur une table chauffante. Des microélectrodes sont utilisées.

Les animaux sont hébergés en groupe avec enrichissement durant toute l'étude.

Une grille d'évaluation de l'état des animaux est utilisée.

Le nombre d'animaux par groupe est de 6 pour le groupe contrôle et 7 pour les groupes recevant la toxine, nombre basé sur des données historiques obtenues sur ces différents modèles. Un groupe de 2 animaux ne recevant ni solvant ni toxine sera ajouté et servira de témoins absolus ce qui permettra d'avoir un enregistrement des paramètres sans aucune injection. Une étude comporte généralement 1 groupe contrôle, 3 groupes traités par 1 dose différente et 2 animaux témoins. Une étude dure une semaine. Un nombre de 87 rats et 87 souris est prévu pour ce projet sur une période de 1 an.

2948. Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) touchent près de 3 personnes sur 100 000 par an en France. Malgré les traitements de type chimiothérapies ou immunologiques (greffes de cellules souches hémapoïétiques) et une rémission dans 50 à 80% des cas, les cellules leucémiques persistent chez l'hôte sous forme de maladie résiduelle minimale (MRD) et sont responsables des rechutes à plus ou moins long terme. Plusieurs études montrent la persistance des cellules leucémiques dans la moelle osseuse mais les mécanismes y conduisant sont mal définis du fait de l'absence de disponibilité d'échantillons tissulaires pendant le traitement. Les études visant à déterminer les mécanismes conduisant à cette persistance tumorale dans différents modèles animaux de tumeurs solides font état de la participation de la réponse lymphocytaire T adaptative. Dans le cadre des LAM, aucun modèle animal expérimental de MRD leucémique n'a, à ce jour, été décrit dans la littérature. Le remplacement du modèle animal par des modèles de culture de cellules en trois dimensions s'avère difficile car ces derniers ne permettent pas de recréer un microenvironnement médullaire et une dynamique de la réponse lymphocytaire T favorables à la persistance des cellules leucémiques. Le premier objectif de ce projet nécessite donc la mise en place d'un modèle animal de MRD leucémique après traitement par chimiothérapie (cytarabine) des souris leucémiques. Nous utiliserons un modèle animal expérimental de LAM disponible au laboratoire et basé sur l'injection d'une lignée leucémique C1498 à des souris syngéniques C57BL/6J. Ces souris développent la LAM de façon homogène ce qui réduit la variabilité entre les différents groupes d'animaux et les différentes expériences. Les données de la littérature nous permettent également de réduire le nombre d'animaux à 492 souris pour ce projet en nous renseignant sur le nombre de cellules leucémiques à injecter et les doses de cytarabine favorisant la rémission. Ainsi, trois concentrations de cellules leucémiques et deux doses non létales de cytarabine seront testées sur de petits échantillons d'animaux (groupes de 6 souris). L'injection de la chimiothérapie n'entraîne pas de douleur ou de souffrance des animaux. En revanche, un seuil d'arrêt de l'expérimentation a été défini pour les souris injectées avec les cellules leucémiques : elles seront euthanasiées dès les premiers signes de souffrance liés au développement de la LAM. Grâce à ce modèle animal, nous analyserons la réponse lymphocytaire T anti-WT1 avant et après traitement. En effet, l'expression de la protéine WT1 dans les cellules leucémiques des patients permet de suivre la MRD médullaire et de prédire les rechutes après traitement. C'est un antigène capable d'induire des réponses lymphocytaires T chez les patients mais dont les caractéristiques épitopiques sont encore mal définies. L'expression de la protéine WT1 dans notre modèle nous permettra de suivre la localisation des cellules leucémiques résiduelles à différents temps dans les différents organes et de caractériser les lymphocytes T spécifiques participant à leur persistance ou à leur élimination. Enfin, nous étudierons la contribution des lymphocytes T régulateurs car les données de la littérature soulignent leur accumulation dans la moelle osseuse au cours des LAM et du traitement par chimiothérapie chez les patients.

2949. Les chirurgies de l'ombilic chez les veaux nouveau-nés sont fréquentes. Une prise en compte du coût de l'intervention et de l'anesthésie est essentielle étant donnée la valeur faible des veaux face au coût de leur production. La rachianesthésie est une technique d'anesthésie locorégionale efficace, facilement réalisable sur les jeunes veaux et peu coûteuse. Elle est souvent associée à une sédation systémique et utilisée comme alternative à l'anesthésie générale, laquelle requière plus d'équipement et entraîne une dépression cardiorespiratoire plus marquée et une morbi/mortalité plus élevée chez le jeune veau.

La procaïne, anesthésique local ayant une autorisation de mise sur le marché (AMM) chez les bovins et remplaçant le lidocaïne, a été peu investiguée pour cette voie d'administration. Le protocole d'investigation se décline en 4 phases.

La première phase consiste à tester, lors de l'exérèse chirurgicale des structures ombilicales anormales, la qualité de la rachianesthésie obtenue avec 3 associations à base de procaïne (anesthésique local) et d'alpha-2 agoniste (molécule sédatrice et analgésique). La qualité analgésique pour la réalisation de la chirurgie sera évaluée ainsi que la sécurité sur l'appareil cardiovasculaire et respiratoire, de même que les caractéristiques de réveil et de rétablissement pour déterminer quelle association de molécules est la plus efficace et sécuritaire.

La deuxième phase consiste à évaluer la sédation de la xylazine par voie intramusculaire versus intraveineuse et du brotizolam en IV chez le veau de moins d'un mois en terme de qualité, de durée et d'effets cardiovasculaires et respiratoires pour déterminer quel protocole est le moins dépressif pour une sédation optimale.

La troisième phase consiste à documenter par myélographie la relation volume/étendue de la migration dans le canal rachidien lors d'une injection rachidienne puis à corréliser les résultats obtenus avec une étude sur cadavre de la migration d'un colorant dans le canal rachidien.

La quatrième phase consiste à comparer l'efficacité de la procaïne et de la lidocaïne en rachianesthésie associées à la xylazine dans un contexte clinique. L'utilisation d'animaux de l'espèce-cible, les veaux, ne peut être remplacée par d'autres moyens, le but étant de documenter un protocole destiné à être utilisé en pratique vétérinaire de terrain.

Dans le respect de la règle des 3R:

Remplacement: L'utilisation d'animaux de l'espèce-cible, les veaux, ne peut être remplacée par d'autres moyens, le but étant de documenter un protocole destiné à être utilisé en pratique vétérinaire de terrain.

Réduction: La limite du nombre d'animaux a été décidée dans le respect de la règle des 3R avec un nombre minimal compatible avec une significativité statistique (il est prévu au total 66 veaux).

Raffinement: Toutes les mesures ont été prises afin de supprimer et/ou réduire la souffrance des animaux.

2950. Chez l'homme, la toxine botulique est utilisée dans le traitement des maladies neurologiques caractérisées par une contraction exagérée d'un muscle entraînant des troubles des mouvements et/ou de posture qui peuvent être chroniques et douloureux (spasticité des membres, torticolis, le pied bot équin, contractions de la mâchoire, contraction des paupières entraînant la fermeture répétitive et incontrôlée des paupières...). Le traitement consiste en l'injection de petites quantités de toxine botulique dans les muscles atteints empêchant la stimulation du muscle par le nerf associé. La toxine botulique induit alors une faiblesse des muscles hyperactifs injectés, sans pour autant affecter leur fonctionnement normal.

Ce traitement est efficace mais n'agit qu'après quelques jours et doit être renouvelé après plusieurs mois.

Des recherches sont donc faites pour améliorer l'efficacité des toxines en termes de puissance, de rapidité et de durée d'action.

L'activité des toxines est testée selon un processus qui débute par une évaluation in vitro avec des tests purement biochimiques puis sur des cultures de différents types cellulaires et ensuite différents types de muscles isolés de rongeurs. Si les toxines ainsi testées répondent aux critères recherchés, elles seront évaluées sur la souris par une méthode d'observation d'un réflexe naturel. Cette méthode consiste à observer l'écartement des doigts des pattes arrière lorsque la souris est attrapée par la queue. Cet écartement est maximum chez une souris normale mais diminué après l'injection de toxine dans un muscle d'une des pattes arrière. Cette diminution de l'écartement des doigts reflète la faiblesse musculaire induite qui peut ainsi être quantifiée. Ce test permet une mesure répétée dans le temps et ainsi de caractériser la toxine étudiée (puissance, rapidité et durée d'action).

La toxine est injectée dans un muscle d'une patte arrière au travers de la peau sous anesthésie gazeuse permettant un réveil rapide.

Cette méthode, avec effet local, limite les effets délétères au niveau général. Les animaux sont hébergés en groupe avec un enrichissement dans leurs cages. Ils sont observés quotidiennement et pesés tous les jours pendant la 1ère semaine qui suit l'injection puis au moins une fois par semaine tout au long des études. Une grille d'observation est utilisée en support de l'évaluation de l'état de santé des animaux. Dans ce projet, les animaux ne sont utilisés qu'après une évaluation in vitro des toxines. Le nombre d'animaux est réduit car les mêmes animaux sont suivis dans le temps. La qualité des résultats est ainsi améliorée par une diminution de la variabilité inter-animal. Différentes souches de souris pourront être utilisées selon leur sensibilité au type de toxine étudiée. Généralement le nombre d'animaux est de 6 par groupe. Il pourra être ajusté en fonction de la souche ou du type de toxine étudiée.

Une estimation de 15000 souris est proposée sur les 5 ans de validité du projet.

2951. La myopathie de Duchenne est une maladie due à une dégénération musculaire continue. Cette maladie engendre non seulement des problèmes de mobilité mais surtout des pathologies cardiaques et respiratoires menant à la mort prématurée des patients. Les cellules souches sont des cellules capables de s'auto renouveler mais également de se différencier en toutes les cellules composant le corps humain dont font partie les cellules musculaires. De nombreuses équipes essaient de reproduire in vitro, c'est-à-dire en dehors du corps humain et dans des conditions artificielles, certaines cellules spécifiques à partir des cellules souches. La thérapie cellulaire ou l'administration de cellules cultivées in vitro chez le patient pourrait permettre la cure ou une amélioration des conditions de vie de cet individu. Dans notre cas, nous avons créé un protocole permettant la production de « précurseurs musculaires » qui ont la capacité de se différencier en cellules musculaires (régénérer des muscles). Les résultats publiés chez le modèle murin montrent que la greffe de cellules souches différenciées en précurseurs musculaires peut dans une certaine mesure corriger au niveau tissulaire les défauts liés à une myopathie.

Ce projet a pour but de tester le potentiel régénératif des cellules progénitrices que nous avons obtenues in vitro. En effet, nos résultats démontrent que nos cellules présentent les marqueurs de précurseurs musculaires cependant il nous est impossible de tester in vitro les capacités régénératives de ces cellules. La validation ultime de notre protocole est de confirmer que ces cellules ont la capacité de 1- Réparer un muscle préalablement endommagé en se différenciant en cellules musculaires et 2- Proliférer en réponse à une 2ème blessure musculaire, une caractéristique de vraies cellules souches. Cette dernière étape ne nécessite pas de changement par rapport au nombre des souris nécessaires.

Nous nécessiterons environ 144 animaux pour la totalité du projet et respectons les règles 3R consistant à :

i) Réduction : Le test ultime in vivo dans un vrai muscle ne sera fait qu'à partir de lignées dont la différenciation myogénique a été valide in vitro. ii) Raffinement : Toutes les procédures sont faites sous une anesthésie générale et un traitement antalgique est prévu pour limiter la souffrance.

iii) Remplacer : Ce projet a pour but de mettre en place un protocole de différenciation myogénique in vitro à partir de cellules des patients.

2952. L'augmentation de l'incidence des maladies inflammatoires (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique, arthrites) et des maladies auto-immunes (allergie alimentaire, diabète de type 1) est associée au mode de vie occidental. Des changements environnementaux multifactoriels sont susceptibles d'être à l'origine de ces dérèglements de l'homéostasie immunitaire.

Il a été montré qu'un régime riche en graisse induit une dysbiose du microbiote intestinal caractérisée notamment par une augmentation du niveau des entérobactéries. Associé à cette dysbiose, une augmentation de la perméabilité intestinale a été observée ayant pour conséquence une endotoxémie liée à la fuite de LPS de la lumière intestinale vers la circulation sanguine systémique. Une faible inflammation du côlon a été observée comme associée à cette augmentation de la perméabilité.

Une augmentation des entérobactéries est observée dans de nombreuses pathologies humaines (maladies inflammatoires de l'intestin, syndrome de l'intestin irritable, diabète). Fait intéressant, ces maladies impliquent une inflammation intestinale (de grade élevé ou faible) ou une inflammation systémique. Ces données suggèrent fortement que l'inflammation crée des conditions favorables à la croissance des entérobactéries.

Nous émettons l'hypothèse qu'un régime riche en graisse pourrait induire une inflammation de bas grade et donc stimuler les entérobactéries ouvrant la voie à l'apparition de maladies inflammatoires. Dans ce projet, nous proposons de déchiffrer (i) les mécanismes par lesquels la bactérie *E. coli* s'adapte au stress induit par le régime riche en graisse, (ii) les conséquences pour l'homéostasie intestinale de l'hôte, (iii) les effets protecteurs potentiels de *Lactococcus lactis* CNCM 1631 / *Lactobacillus rhamnosus* I-3690 et (iv) les mécanismes impliqués dans ces effets protecteurs.

C'est un projet qui s'étalera sur 3 ans et nécessitera un total maximum de 400 souris axéniques. Afin de précisément définir les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'inflammation et l'influence sur le microbiote de ce régime alimentaire un modèle de colite par induction chimique sera utilisé. En parallèle dans ces différents contextes le microbiote en lui-même pourra être modifié par différents moyens : traitements antibiotiques, gavage par des souches bactériennes ou même transfert du microbiote de souris conventionnelles dans des souris élevées stérilement depuis la naissance (axéniques). L'essentiel des prélèvements (sang, tissus, contenus intestinaux) sera fait post mortem à l'exception des fèces.

Afin d'appliquer au mieux la règle des 3R, nous avons prévu dans nos projets scientifiques des groupes de souris réduits à 8-10 animaux. Ce nombre d'animaux est calculé au plus juste en fonction de notre expérience antérieure pour garantir la qualité statistique des données et minimiser le nombre de répétitions. L'étude de ces écosystèmes et de la problématique de l'impact du régime alimentaire impose le modèle animal pour valider les hypothèses soulevées par l'étude de patients chez l'homme. Il n'existe pas aujourd'hui de modèle in vitro intégrant ces problématiques multifactorielles de l'influence du régime alimentaire sur l'inflammation via le microbiote.

Les animaux sont hébergés dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (litière changée régulièrement, eau et nourriture à volonté, température et hygrométrie régulées,...). Nous avons veillé à enrichir le milieu de vie par l'ajout de feuille de cellulose dans les cages et d'un abri prévu à cet effet. Le suivi attentif et régulier des animaux sera réalisé afin de minimiser autant que possible la souffrance éventuelle des animaux.

2953. Pour comprendre les fonctions de l'ensemble de nos gènes, il est nécessaire de générer, analyser et caractériser des modèles de souris génétiquement modifiées.

Notre module est en charge de la création des lignées de souris génétiquement modifiées par des techniques de transgénèses. Ces lignées de souris peuvent devenir des modèles de maladie humaine et vont permettre de mieux comprendre le processus de développement de ces maladies. Ces modèles peuvent également répondre à d'autres intérêts scientifiques tout aussi importants (comme par exemple devenir des modèles de choix pour la recherche fondamentale). Ces souris, en tant que modèle de maladies humaines, vont également permettre de tester des médicaments et de valider (ou d'invalider) des cibles thérapeutiques. Toutes les lignées générées le seront au stade hétérozygote et donc aucun phénotype lié à la modification génétique n'est attendu. La création de nouvelles lignées de souris nécessite différentes étapes :

-La production d'embryons.

Elle se traduit par la mise en accouplement de femelles productrices d'embryons superovulées ou non avec des mâles fertiles.

-La microinjection des embryons (deux techniques différentes utilisées) :

- La microinjection de nucléases dans un ovocyte fécondé (embryon 0,5 jours post-coïtum).

- La microinjection de cellules souches embryonnaires murines (ES) dans un blastocyste (embryon à 3,5 jours post-coïtum).

-La réimplantation des embryons microinjectés.

Les embryons sont réimplantés dans des femelles pseudogestantes (mères porteuses) par acte chirurgical. Ces femelles sont au préalable mises en accouplement avec des mâles vasectomisés (par intervention chirurgicale). L'utilisation de ces mâles vasectomisés est nécessaire pour obtenir des femelles qui sont à l'issue de l'accouplement stimulées homonalement. Ainsi, l'utérus des femelles pseudogestantes est favorable à la nidation des embryons microinjectés.

-La transmission de la modification génétique.

- Dans le cas des souris obtenus par l'injection des nucléases, les progénitures sont identifiées et sont mises en accouplement avec des souris de fond génétique « sauvage » afin de transmettre la mutation à la descendance.

- Dans le cas des souris obtenus par l'injection d'ES, les progénitures sont constituées de deux génomes différents (celui de l'embryon et celui de la cellule ES microinjectées), ces dernières contiennent donc en partie la modification génétique attendue. Ces souris sont mises en accouplement avec des souris de fond génétique « sauvage », ce qui permettra d'obtenir des souris hétérozygotes (porteur de la mutation génétique d'intérêt).

La création de lignées de souris nécessite l'utilisation d'animaux. En revanche, il est indispensable de se préoccuper de l'éthique et de leur bien-être. Il est important d'enrichir leur environnement (coton, papier), de respecter les conditions d'élevage (le nombre d'animaux par cage, la température, l'hygrométrie, cycle nyctéméral, etc). Il faut sans cesse raffiner les techniques utilisées, ainsi que le travail effectué en périphérie, afin de réduire l'utilisation des animaux.

Pour la centaine de lignées produites chaque année qui sont l'objet de cette autorisation, nous estimons nos besoins en animaux à 5025 souris maximum pour les 5 ans du projet

2954. La fibroscopie est une méthode d'exploration non invasive des tractus digestif et respiratoire couramment utilisée en médecine humaine et qui se développe en médecine vétérinaire;

- Le nombre de vétérinaires "canins" (c'est à dire soignant les chiens et les chats) s'équipant en matériel de fibroscopie est en régulière augmentation en France depuis quelques années;

- A cette croissance d'équipement correspond un besoin croissant en formation technique et pratique, en particulier dans le domaine de la fibroscopie digestive et respiratoire.

Le projet s'inscrit dans le cadre de la formation continue des praticiens vétérinaires. Elle consiste à former des vétérinaires à l'exploration à l'aide d'un endoscope du tractus digestif supérieur (oesophage, estomac et duodénum proximal) et l'arbre trachéo-bronchique et à réaliser des biopsies de muqueuse digestive et un lavage broncho-alvéolaire.

- Le recours au porc anesthésié permet:

* l'apprentissage des gestes de base de manipulation d'un endoscope,

* la connaissance des muqueuses normales (présentées le matin sur photos et vidéos),

* le repérage des éléments anatomiques des principaux organes explorés (également exposés lors de la partie théorique de l'enseignement, sur photos et vidéos),

* la réalisation de biopsies muqueuses. Il s'agit de prélèvements superficiels, effectués entre l'épithélium et la partie supérieure de la muscularis mucosae,

* la réalisation du lavage broncho-alvéolaire (LBA)

* ces deux apprentissages sont fondamentaux en tant qu'actes per-endoscopiques dans un cadre diagnostique.

La formation se déroule sur une journée. La matinée est consacrée à des présentations du matériel et des accessoires, de leurs utilisations, de l'anatomie normale (carnivores et porc) et des techniques qui seront mises en oeuvre l'après-midi, sur photos et vidéos. Sont également présentées les indications, contre-indications et limites de l'endoscopie.

La partie pratique débute toujours par une démonstration du geste par l'enseignant, puis la réalisation individuelle, par groupe de quatre praticiens, à tour de rôle et en binôme, sous contrôle permanent de l'enseignant. Cette procédure non-invasive durera quatre heures au maximum au total (pour les deux procédures), et sera réalisée sous anesthésie générale. En absence de complications sévères liées au geste ou de complications anesthésiques, la douleur étant légère voire nulle, tous les animaux seront réveillés à la fin de la formation et recevront un antalgique pendant 2 à 4 jours. Ils pourront ensuite être utilisés dans un autre projet de formation recourant à une procédure sans réveil.

Il y a au plus huit praticiens vétérinaires, un enseignant et deux porcs anesthésiés et donc deux postes de travail par journée. Nous prévoyons de répéter la formation 4 fois par an au maximum. Le nombre total d'animaux utilisés pour la période de 5 ans est estimé à quarante.

2955. Les Travaux Pratiques décrits dans ce projet se déroulent dans le cadre du DUT GB. Ce diplôme (BAC+2) professionnalisant a pour objectif de former les techniciens supérieurs se destinant, pour certains, à travailler dans les laboratoires de recherche qui utilisent l'expérimentation animale. Ces travaux pratiques permettent ainsi d'initier concrètement les étudiants aux principales techniques de l'expérimentation animale, comme le stipule le programme pédagogique, en respectant son cadre éthique et réglementaire. Plus précisément, il s'agit d'apprendre les techniques de prélèvements d'organes sur animaux euthanasiés et leur anatomie ainsi qu'en amont, les techniques de préhension de l'animal, d'anesthésie, d'antalgie/analgésie et d'euthanasie réglementaire. Les organes prélevés sur animaux euthanasiés sont ensuite étudiés dans le cadre de travaux pratiques d'histologie ou de physiologie animale. Ces travaux pratiques permettent donc également d'atteindre les objectifs pédagogiques disciplinaires.

Ces travaux pratiques sont accompagnés d'un cours présentant les modèles animaux, la législation et les règles éthiques de l'expérimentation animale. Ce cours est basé sur les formations expérimentales Niveau I et II suivies par le personnel.

Modèles utilisés et nombre d'animaux :

Les modèles utilisés sont les rongeurs (souris et rats). Il s'agit de 3 Travaux Pratiques de Physiologie/Histologie Animale (2 en 1^o Année et 1 en 2^o Année) :

- 2 TP sur la souris où les souris sont anesthésiées puis euthasiées par les étudiants assistés de l'enseignant et de la préparatrice afin de prélever des tissus ou organes (peau, pancréas, intestin) pour une analyse histologique par la suite. (1 TP en 1^o Année et 1 TP en 2^o Année ABB)

- 1 TP sur le rat où les rats sont anesthésiés par les étudiants assistés de l'enseignant et de la préparatrice puis euthasiés afin de prélever des tissus ou organes (intestin) pour une étude physiologique de l'organe isolé par la suite. (1 TP en 1^o Année)

Afin de diminuer le nombre d'animaux, le nombre de ce type TP sur animaux anesthésiés a été réduit (2 TP uniquement dans l'année pour initier les étudiants en 1^o Année et 1 TP en 2^o Année ABB) et les étudiants travaillent en binôme (pour les souris) ou même à 4 (pour le rat) sur un seul animal.

Le nombre d'animaux utilisés pour les TP entrant dans le cadre de l'expérimentation animale est donc :

- Pour les souris : 56 par année en 1^o Année et 14 en 2^o Année ABB = 70 par année scolaire. Pour la durée de 5 ans demandée, le nombre de souris estimé est donc de 350 souris

- Pour les rats : 28 par année. Pour la durée de 5 ans demandée, le nombre de rat estimé est donc de 140 rats.

Au cours du TP de 1^o année sur le rat anesthésié puis euthanasié, des méthodes de raffinement ont été mises en place à l'aide du vétérinaire référent de la cellule «bien-être de l'animal» : injection d'analgésique quelques minutes avant le TP par la préparatrice et l'enseignant de TP (buprénorphine) puis injection d'anesthésiant par les étudiants. Enfin l'animal est euthanasié en utilisant une méthode réglementaire.

2956. Nous avons récemment identifié un nouveau déficit immunitaire chez l'homme causé par des mutations dans le gène codant pour la CTP synthase 1 (CTPS1). Nous avons montré que ce gène pouvait représenter une cible thérapeutique pour le traitement du rejet de greffe et des maladies auto-immunes dans des expérimentations in vitro. Ce projet a pour but d'apporter maintenant la preuve de concept que CTPS1 in vivo est une cible pour le développement de nouveaux immunosuppresseurs. Notre projet a été défini en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (règle des 3R). Le projet consistera à obtenir un modèle murin génétiquement modifié de souris déficientes en CTPS1, à caractériser la réponse immunitaire de ces souris, puis enfin à tester ces souris dans des modèles pathologiques dont un modèle de rejet de greffe et trois modèles de maladies auto-immunes. Il est attendu que le défaut de CTPS1, chez les animaux ainsi créés, n'ait aucun effet dommageable sur sa santé et son bien-être. Par contre, les procédures nécessaires pour déclencher un rejet de greffe ou une maladie auto-immune chez ces animaux pourront avoir un impact sévère sur la santé et le bien-être de ces animaux. Pour limiter la douleur engendrée par ces procédures, les animaux recevront des antalgiques au cours de ces procédures. Néanmoins, il est escompté un avantage chez les animaux déficients en CTPS1 avec une diminution de la sévérité de la maladie voire une absence de celle-ci dans les quatre modèles pathologiques testés. Des points limites ont été définis dans chacune des procédures à partir desquels les animaux seront euthanasiés. Le projet s'appuie sur des données obtenues in vitro nécessitant maintenant une confirmation in vivo à l'aide de modèles animaux. Les stratégies expérimentales, d'accouplement et de production des animaux ont été optimisées afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les trois modèles de maladies auto-immunes seront testés séquentiellement et, selon les résultats obtenus dans le premier modèle testé, il sera alors décidé de tester ou non le suivant. Le nombre d'animaux utilisé dans le projet est de 402.

2957. Les plaquettes sanguines jouent un rôle essentiel pour arrêter les hémorragies. Ces cellules sont issues des mégacaryocytes (MKs), continuellement produits dans la moelle osseuse afin d'assurer le renouvellement des plaquettes. Les MKs s'ancrent à la monocouche de cellules endothéliales, la traverse et se fragmentent en libérant des plaquettes dans la circulation sanguine. La façon dont les MKs adhèrent et la route qu'ils empruntent pour traverser la monocouche des cellules endothéliales ne sont pas connues. Des maladies humaines résultant d'une anomalie d'ancrage des MKs aux cellules endothéliales sont associées à un défaut de production de plaquettes (microthrombopénie correspondant à des plaquettes moins nombreuses et plus petites) et des risques hémorragiques.

Objectif : Le projet vise à mieux comprendre et à caractériser finement les interactions entre les cellules endothéliales et les MKs, en utilisant des approches d'imageries de haute résolution. Les étapes d'adhésion des MKs aux cellules endothéliales sont imparfaitement reproduites in vitro d'où la nécessité d'utiliser des modèles animaux. Pour l'essentiel des études, les tibias et les fémurs seront prélevés sur des animaux euthanasiés par injection de pentobarbital. Comme les MKs sont rares dans la moelle osseuse, les souris seront traitées au SDF1 qui est un facteur chimio-attractant destiné à augmenter le nombre de MKs accolés aux vaisseaux sanguins.

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

Remplacement : Des expériences de différenciation in vitro des mégacaryocytes à partir de précurseurs hématopoïétiques ont déjà été réalisées mais sans pouvoir aboutir à une production efficace de plaquettes. Les expériences in vivo sont encore nécessaires pour bien comprendre la totalité des processus engagés lors de la formation des plaquettes sanguines et compléteront nos expériences in vitro.

Raffinement : Une attention particulière sera apportée à la mise à mort des animaux par un personnel formé et expérimenté, et à l'injection et le suivie des animaux traités aux SDF1.

Réduction : Les études en microscopie électronique nécessitent peu d'échantillon et différentes approches d'imagerie peuvent être utilisées sur la même souris. Pour les cultures, le nombre prévu de souris pour le projet est réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Sur l'ensemble du projet, d'une durée de 5 ans, nous ferons appel à 84 souris.

2958. Le cancer du sein est le premier cancer féminin dans le monde, et représente un problème majeur de santé publique. L'étude des altérations du génome et de l'expression des transcrits codés par les gènes, réalisée à grande échelle a mis en évidence l'importante hétérogénéité des tumeurs de sein. Plusieurs sous-types moléculaires de tumeurs du sein ont pu être distingués sur la base de leur profil d'expression génique et de la présence de marqueurs protéiques. Cette classification a ouvert la voie à des thérapies ciblées, puisque les tumeurs du sous-type luminal (exprimant les récepteurs aux oestrogènes) répondent au tamoxifène, tandis que les tumeurs du sous-type ERBB2+ sont la cible de traitements dirigés contre l'oncogène ERBB2. Les tumeurs de la catégorie "basal-like" ou "triple-négative" (n'exprimant ni les récepteurs hormonaux à l'oestrogène et à la progestérone, ni l'oncogène ERBB2) sont très agressives, de mauvais pronostic, et ne font pas encore l'objet de thérapies ciblées. Ces tumeurs sont traitées avec des chimiothérapies qui ne sont efficaces que pour 30 à 40% des patientes et qui sont responsables de nombreux effets secondaires. La mise en évidence de nouveaux marqueurs moléculaires des tumeurs triple-négatives constitue donc un enjeu majeur pour l'identification d'une part des populations le plus susceptible de répondre au traitement, et d'autre part de nouvelles cibles et axes thérapeutiques.

L'objectif de ce projet vise à potentialiser l'efficacité des chimiothérapies actuelles et à évaluer l'effet anti-tumoral et anti-métastatique d'un nouveau composé.

Ce projet implique l'induction de la formation de tumeurs et de métastases chez la souris afin de pouvoir suivre la diminution de la taille des tumeurs et des métastases en réponse aux traitements. Cela permettra à terme de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques aux patientes.

Les expériences seront réalisées sur des souris femelles immunodéficientes pour permettre le développement et la croissance des tumeurs à partir de cellules tumorales humaines. Ce projet prévoit l'utilisation de 600 souris .

Les expériences sont préalablement réalisées in vitro afin de valider les hypothèses de travail. Un modèle de tumeur in vitro a été mis au point à partir de cultures en 3-dimensions (sphéroïdes) en présence de matrice extracellulaire et permettra de reproduire partiellement les conditions de croissance tumorale in vitro. Ce modèle se substituera aux modèles in vivo pour l'analyse moléculaire de la réponse au traitement. Cependant, les expériences in vitro ne tiennent pas compte de l'environnement complexe de la tumeur intégrée dans un organisme entier ce qui peut modifier la réponse au traitement. Seules les expériences in vivo permettent de confirmer les résultats obtenus in vitro et de valider la réponse de la tumeur au traitement au sein d'un organisme entier. Ces expériences sont par ailleurs un prérequis au transfert vers la clinique.

Pour limiter le nombre de souris, la formation et croissance des métastases sera suivie par imagerie intravitale permettant de suivre le développement d'une métastase au sein de la même souris au cours du temps. De plus, pour les expériences de croissance tumorale, chaque souris développera une tumeur chaque flanc (droit et gauche), ce qui permettra d'augmenter le nombre de tumeurs obtenues sans augmenter le nombre de souris. Par ailleurs, l'analyse des données de la littérature a permis de prédéterminer la dose optimale de drogue à utiliser et donc permet d'éviter l'utilisation d'animaux supplémentaire pour déterminer la dose.

Les expériences sont planifiées pour ne pas générer de souffrance des souris. L'utilisation de l'imagerie intravitale permet de suivre et de quantifier la formation de métastases de manière non invasive et non douloureuse. Le suivi régulier des souris permet de détecter précocement une éventuelle souffrance des animaux et d'y remédier soit par administration d'analgésique soit par arrêt de la procédure.

2959. La dermatite atopique est une maladie de la peau pouvant être associée à d'autres affections telles que l'asthme ou la rhinite allergique. La dermatite atopique, caractérisée par du prurit et de l'eczéma, affecte 10% à 20% des enfants et 1% à 3% des adultes. Les patients présentent une inflammation de la peau et des niveaux d'immunoglobulines dans le sang anormaux. Notre laboratoire a mis au point un modèle murin de dermatite atopique, générée par l'application d'un analogue à la vitamine D directement sur la peau. Grâce à ce modèle, nous avons identifié une cascade d'évènements immunologiques qui abouti à l'initiation de la réponse immunitaire dans les ganglions lymphatiques.

Dans ce projet, nous souhaitons poursuivre l'utilisation de ce modèle murin de dermatite atopique afin de déchiffrer le réseau immunitaire à l'œuvre dans la réponse induite par l'application cutanée de cet analogue à la vitamine D. L'identification et la caractérisation des cellules impliquées dans ces processus pourraient permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans cette objectif, l'analogue sera appliqué au niveau de l'oreille d'animaux génétiquement modifiés tout les deux jours, puis les échantillons seront collectés après 3 jours, 5 jours et 11 jours de traitement, et la réponse immunitaire sera caractérisée au niveau cellulaire et moléculaire. Cette cinétique nous permettra d'identifier les évènements marquant les différentes phases de la réponse immunitaire. Nous analyserons l'expression des gènes et les compositions cellulaires au niveau de l'épiderme et du derme de l'oreille, ainsi qu'au niveau des ganglions drainants.

Remplacement: Les phénomènes à l'œuvre dans ces réactions immunitaires mettent en jeu différents organes et des réseaux impliquant plusieurs types cellulaires. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences in vivo pour comprendre cette réponse inflammatoire et identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques.

Réduction: Ce protocole sera appliqué à un total de 11 lignées de souris génétiquement modifiées afin d'identifier les rôles de différentes molécules et cellules de la réponse immunitaires. Chaque lignée sera constituée au maximum de quatre groupes de 6 animaux, pour un total de 792 animaux. Deux groupes serviront à l'analyse de l'expression des gènes dans les ganglions lymphatiques et au niveau des oreilles des animaux. Ces animaux permettront également d'effectuer une analyse histologique de la peau. Les deux autres groupes seront utilisés pour caractériser les population de cellules présentent dans ces organes. L'effectif de 24 animaux par groupe est l'effectif minimal qui nous permettra d'avoir des résultats statistiquement interprétables pour les différents paramètres mesurés.

Raffinement: l'administration de l'analogue à la vitamine D se fait par application cutanée, ce qui nécessite simplement une anesthésie gazeuse légère. Aux jours 3 et 5, aucune différence n'est notée au niveau des oreilles des animaux tandis qu'à partir du jour 9 jusqu'au jour 11 on observe une rougeur des oreilles qui peut être accompagnée de légères démangeaisons.

2960. Certaines malformations cardiaques congénitales ainsi que l'hypertension artérielle pulmonaire (maladie progressive grave qui touche les petits vaisseaux sanguins des poumons) se compliquent d'un mauvais fonctionnement (insuffisance) du ventricule droit qui souffre de façon chronique et prolongée d'un excès de charge en pression et/ou en volume. Cette insuffisance cardiaque droite conduit au décès prématuré d'adultes encore jeunes, le traitement de cette maladie étant peu satisfaisant avec une surmortalité de 7.5% chez les 20-30 ans. Ainsi, la découverte de nouveaux traitements apparait primordiale afin de lutter ou diminuer le développement de cette maladie.

Récemment, la thérapie cellulaire a ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques en cardiologie et des études expérimentales puis cliniques ont prouvé son efficacité pour améliorer la contraction du muscle cardiaque après un infarctus du myocarde. Cependant, aucune étude n'a été menée sur le ventricule droit défaillant.

Avant de tester cette thérapie prometteuse chez les patients, il est crucial d'appréhender au préalable la faisabilité de cette approche, le devenir des cellules implantées et l'efficacité de la thérapie cellulaire sur un modèle animal. Concernant les maladies cardiovasculaires, le porc constitue un modèle de choix en santé humaine de par l'existence de caractéristiques et de propriétés anatomiques et physiologiques cardio-vasculaires comparables à celles de l'homme.

Avant de débiter cette étude, des expériences sur des cellules puis sur des modèles de rongeurs ont été effectuées afin de réaliser la preuve de concept. Le chercheur responsable est assisté dans sa démarche par des chirurgiens cardiaques congénitaux et des cardiopédiatres afin de favoriser les procédures non invasives (échographie cardiaque), d'optimiser tous les gestes invasifs et réduire ainsi le nombre d'animaux sacrifiés. Pour la totalité du projet, nous utiliserons au maximum 68 animaux.

Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs auront une nourriture adaptée et seront stabulés en groupe de deux dans des cages de 2m² (individus de poids <50kg) pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire les stress. Leur environnement sera enrichi pour favoriser l'activité de foussement.

2961. L'augmentation de l'incidence des maladies inflammatoires (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique, arthrites) et des maladies auto-immunes (allergie alimentaire, diabète de type 1) est associée au mode de vie occidental. Des changements environnementaux multifactoriels sont susceptibles d'être à l'origine de ces dérèglements de l'homéostasie immunitaire.

Il a été montré qu'un régime riche en graisse induit une dysbiose du microbiote intestinal caractérisée notamment par une augmentation du niveau des entérobactéries. Associé à cette dysbiose, une augmentation de la perméabilité intestinale a été observée ayant pour conséquence une endotoxémie liée à la fuite de LPS de la lumière intestinale vers la circulation sanguine systémique. Une faible inflammation du côlon a été observée comme associée à cette augmentation de la perméabilité.

Une augmentation des entérobactéries est observée dans de nombreuses pathologies humaines (maladies inflammatoires de l'intestin, syndrome de l'intestin irritable, diabète). Fait intéressant, ces maladies impliquent une inflammation intestinale (de grade élevé ou faible) ou une inflammation systémique. Ces données suggèrent fortement que l'inflammation crée des conditions favorables à la croissance des entérobactéries.

Nous émettons l'hypothèse qu'un régime riche en graisse pourrait induire une inflammation de bas grade et donc stimuler les entérobactéries ouvrant la voie à l'apparition de maladies inflammatoires. Dans ce projet, nous proposons de déchiffrer (i) les mécanismes par lesquels la bactérie *E. coli* s'adapte au stress induit par le régime riche en graisse, (ii) les conséquences pour l'homéostasie intestinale de l'hôte, (iii) les effets protecteurs potentiels de *Lactococcus lactis* CNCM 1631 / *Lactobacillus rhamnosus* I-3690 et (iv) les mécanismes impliqués dans ces effets protecteurs.

C'est un projet qui s'étalera sur 3 ans et nécessitera un total maximum de 400 souris conventionnelles. Afin de précisément définir les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'inflammation et l'influence sur le microbiote de ce régime alimentaire un modèle de colite par induction chimique sera utilisé. En parallèle dans ces différents contextes le microbiote en lui-même pourra être modifié par différents moyens : traitements antibiotiques, gavage par des souches bactériennes ou même transfert du microbiote de souris conventionnelles dans des souris élevées stérilement depuis la naissance (axéniques). L'essentiel des prélèvements (sang, tissus, contenus intestinaux) sera fait post mortem à l'exception des fèces.

Afin d'appliquer au mieux la règle des 3R, nous avons prévu dans nos projets scientifiques des groupes de souris réduits à 8-10 animaux. Ce nombre d'animaux est calculé au plus juste en fonction de notre expérience antérieure pour garantir la qualité statistique des données et minimiser le nombre de répétitions. L'étude de ces écosystèmes et de la problématique de l'impact du régime alimentaire impose le modèle animal pour valider les hypothèses soulevées par l'étude de patients chez l'homme. Il n'existe pas aujourd'hui de modèle in vitro intégrant ces problématiques multifactorielles de l'influence du régime alimentaire sur l'inflammation via le microbiote.

Les animaux sont hébergés dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (litière changée régulièrement, eau et nourriture à volonté, température et hygrométrie régulées,...). Nous avons veillé à enrichir le milieu de vie par l'ajout de feuille de cellulose dans les cages et d'un abri prévu à cet effet. Le suivi attentif et régulier des animaux sera réalisé afin de minimiser autant que possible la souffrance éventuelle des animaux.

2962. Le cerveau joue un rôle fondamental dans la perception visuelle car entre la stimulation, la réception d'une image et la perception de son contenu, de nombreux traitements sont réalisés (décodage, filtrage, extraction des contours, ...). La compréhension de ces mécanismes est l'objectif principal de notre équipe : chercher à comprendre le fonctionnement normal

du cerveau, les principes fondamentaux de son organisation et la manière dont l'information y est traitée (encodée, décodée). Pour répondre à ces objectifs, nous utilisons des approches complémentaires, allant de l'échelle microscopique (celle de la cellule grâce à l'électrophysiologie) à l'échelle mésoscopique (celle du réseau de neurones et des cartes fonctionnelles grâce aux techniques de neuroimagerie). Les résultats obtenus servent parallèlement de base à une modélisation théorique et nous aide à mieux comprendre le traitement de l'information au sein des réseaux corticaux. Elle autorise le développement d'algorithmes utiles pour une meilleure connaissance du cerveau, avec des applications dans les systèmes d'intelligence artificielle, ou bien dans l'élaboration des concepts d'interface homme-machine ou des prothèses médicales. Pour cette thématique complexe, et de manière à obtenir des résultats pertinents, représentatifs et utiles, le modèle utilisé est le chat anesthésié (30 animaux issus de notre élevage seront utilisés chaque année, soit 150 animaux sur 5 ans). Le chat est en effet l'espèce qui a été la plus étudiée dans le domaine de la vision. Le choix de cette espèce nous permet ainsi nous appuyer sur une large base de connaissances concernant les fonctionnements fondamentaux du système visuel et de limiter ainsi, le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs, l'utilisation de cette espèce se justifie aussi par le fait que son système visuel évolué effectue un traitement de l'information collectée à la rétine, qui est très proche de celui de l'homme. Les aspects spatiaux et temporels de l'information visuelle sont traités en parallèle, les modules corticaux spécialisés dans le traitement des attributs visuels élémentaires sont organisés selon leur position dans l'espace et la vision binoculaire frontale autorise une vision 3-D de son environnement. Les protocoles anesthésiques ont été optimisés (protocole, déroulement et surveillance) pour maintenir les animaux dans les meilleures conditions possibles et obtenir des résultats pertinents, standardisables et reproductibles. Pour optimiser les phases expérimentales, de nombreux paramètres physiologiques sont analysés en temps-réel ce qui nous permet de choisir et adapter rapidement les protocoles expérimentaux (stimulations visuelles, caractérisation des neurones, ...) aux réactions de l'animal, et ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés. Compte tenu de la problématique, le choix d'un modèle in vivo possédant un système visuel développé est actuellement irremplaçable. Outre l'utilisation des données enregistrées pour l'analyse du traitement de l'information visuelle par le cerveau, les données recueillies sont également utilisées par d'autres équipes du laboratoire pour construire, développer et valider des modélisations théoriques. Nos nouveaux résultats viendront compléter notre série de travaux, nous permettant ainsi de cibler des questions spécifiques comme par exemple les processus de décodage des images naturelles.

2963. Le poisson zèbre (*Danio rerio* - Cyprinidés) est un modèle populaire en biologie du développement, grâce à la transparence des embryons et larves qui permet une observation non invasive des organes et cellules in vivo et aussi pour les possibilités d'études génétiques. L'observation de cellules peut être facilitée par des marqueurs fluorescents. Le poisson zèbre permet d'établir des lignées transgéniques, des lignées mutantes pour un gène d'intérêt ainsi l'utilisation de l'animal ne peut être REMPLACÉE par une technique in vitro.

L'objet de ce projet est notamment de prélever l'extrémité de la nageoire caudale afin de génotyper les animaux, c'est-à-dire d'identifier lesquels portent bien la mutation génétique d'intérêt.

REDUCTION :

Afin d'établir ces lignées de poissons-zèbres génétiquement modifiées, notre expérience a prouvé qu'un effectif maximal de 96 poissons est nécessaire par lignée, soit 4800 sur toute la durée du projet.

RAFFINEMENT:

Afin de limiter le stress, la procédure de biopsie est réalisée sous anesthésie générale même si aucun dommage n'est attendu. En effet, le comportement des poissons après biopsie est normal et la régénération de la nageoire caudale est complète en une dizaine de jours.

2964. L'ataxie de Friedreich (AF) est la forme la plus répandue des ataxies héréditaires, elle se manifeste par une diminution progressive de la coordination motrice et des troubles de l'équilibre associés à une sévère atteinte cardiaque.

Les tissus les plus affectés sont le système nerveux ainsi que le muscle cardiaque. La pathologie débute au niveau des ganglions dorso rachidiens où se situe les gros neurones sensitifs qui dégèrent chez les patients. L'étape suivante est une dégénérescence progressive des faisceaux se trouvant dans la moelle épinière et remontant jusqu'au cerveau.

Le gène responsable de la pathologie code pour la frataxine, une protéine mitochondriale impliquée dans la biosynthèse des protéines à centre Fe-S et l'homéostasie du fer. Aucune approche thérapeutique n'est de plus disponible pour l'AF. Notre laboratoire a publié récemment la capacité à prévenir/corriger l'atteinte cardiaque associée à l'AF. Plus récemment, nous avons généré un modèle murin de l'atteinte neuronale de l'AF et démontré la capacité à corriger rapidement les signes cliniques associés à l'AF au moyen d'une injection intraveineuse de vecteur adéno-associée codant la frataxine. L'objectif de ce projet est une optimisation préclinique de notre approche thérapeutique, en modifiant les vecteurs de thérapie génique pour cibler au mieux les tissus d'intérêt, avec en parallèle une optimisation des sites d'injections.

Le but ultime de ce projet est de générer la preuve de concept finale afin de proposer un essai clinique pour corriger l'atteinte neuronale dans les patients atteints de l'ataxie de Friedreich.

Un nombre total de 1073 souris sera utilisé sur ce projet (914 mutants et 159 contrôles), correspondant au nombre minimum de souris nécessaire afin de mener des analyses statistiques pour nos résultats tant pour les analyses de comportement que histologiques et moléculaires.

2965. Le but du projet est de déterminer l'impact de la délétion d'un gène sur la mise en place des mécanismes d'homéostasie lipidique, dans le cadre d'un régime enrichi. Ce projet sera réalisé en utilisant des souris génétiquement modifiées, afin de mettre en évidence l'impact de la suppression du gène, par comparaison avec des animaux contrôles non modifiés. Ce projet

visant à étudier un mécanisme physiologique complet, l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode in vitro ou in silico ne peut actuellement se substituer à l'étude du gène cible dans son environnement et ses interactions au sein de l'organisme.

Ce projet pourra s'appliquer à 10 lignées différentes par an, pour un nombre total d'animaux de 360 souris. Ces lignées ne concerneront que des phénotypes non dommageables et une étude rétrospective sera mise en place le cas contraire.

Pour procéder à cette étude, des souris mutantes n'exprimant plus le gène d'intérêt sont générées et étudiées en comparaison avec des animaux contrôles. Une cohorte de 36 animaux sera utilisée afin d'obtenir une puissance statistique suffisante à l'étude. Ces animaux seront soumis à un protocole comportant différents tests permettant de caractériser les capacités d'homéostasie lipidique, à différents âges ; mais aussi à des tests permettant de caractériser la lignée, lorsque celle-ci n'a pas encore été étudiée sur certains domaines (fonction cardiaque par exemple).

Tous les tests utilisés font partie des tests de phénotypage classiquement utilisés dans la recherche préclinique et décrits dans la littérature. Cette batterie de tests permet de mettre en place un corpus de données visant à déterminer l'impact de cette délétion sous un régime standard, mais aussi dans le cadre d'un enrichissement du régime en sucres et en graisse.

Ce protocole permet ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés afin de satisfaire les exigences de réduction.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux, ainsi qu'une pesée hebdomadaire.

Les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter toute redondance dans l'étude des phénotypes engendrés par la mutation.

Les souris utilisées sont issues de lignée en cours d'élevage et pour lesquelles aucun phénotype léthal ou majeur n'a été observé.

2966. L'ataxie de Friedreich (AF) est la forme la plus répandue des ataxies héréditaires, elle se manifeste par une diminution progressive de la coordination motrice et des troubles de l'équilibre associés à une sévère atteinte cardiaque.

Les tissus les plus affectés sont le système nerveux ainsi que le muscle cardiaque. La pathologie débute au niveau des ganglions dorso rachidiens (DRG) où se situent les gros neurones sensitifs qui dégénèrent chez les patients. L'étape suivante est une dégénérescence progressive des faisceaux se trouvant dans la moelle épinière et remontant jusqu'au cerveau.

Le gène responsable de la pathologie code pour la frataxine, une protéine mitochondriale impliquée dans la biosynthèse des protéines à centre Fe-S et l'homéostasie du fer.

A ce jour, les mécanismes moléculaires et cellulaires associés à la perte neuronale de la frataxine ne sont pas connus. Aucune approche thérapeutique n'est de plus disponible pour l'AF.

Nous avons généré récemment dans le laboratoire un nouveau modèle murin par délétion conditionnelle qui reproduisent notamment les symptômes neurologiques associés à l'AF. Ces souris constituent un bon modèle pour étudier la neuropathophysiologie et tester des approches thérapeutiques de la pathologie mais restent néanmoins imparfaits avec notamment la survenue de crises d'épilepsie sévères à l'âge de 20 semaines, ce qui nous empêche d'étudier les animaux au delà de cet âge. L'objectif de ce projet est d'améliorer notre modèle afin de prévenir l'apparition des crises d'épilepsie, en réexprimant la protéine déficiente au moyen d'un vecteur adéno-associé (AAV), ce qui nous permettra ainsi d'étudier nos animaux plus tardivement. Une fois ce nouveau modèle caractérisé, nous souhaitons de plus évaluer l'efficacité de l'approche thérapeutique développée en parallèle dans le laboratoire sur des souris à un stade avancé de la pathologie.

Notre laboratoire a d'ores et déjà démontré la possibilité de réexprimer de manière ciblée dans le cerveau la protéine déficiente, mais aussi à un stade précoce de la pathologie de corriger l'atteinte sensitive développée par les souris.

Le but de l'expérience est de déterminer si l'expression de la frataxine humaine dans le cortex cérébral à l'aide d'un vecteur viral (AAV) permet de prévenir les crises d'épilepsie des souris et ainsi de maintenir ce modèle jusqu'à 50 semaines d'âge contrairement aux 20 semaines actuelles et ainsi de pouvoir étudier les différents mécanismes moléculaires et cellulaires faisant suite à la perte de frataxine dans les neurones sensitifs. Notre projet se divisera en différentes phases, tout d'abord une étude préliminaire sur un petit groupe d'animaux de manière à évaluer si nos conditions d'injection permettent de prévenir la survenue des crises d'épilepsie. La deuxième phase du projet permettra d'analyser à différents temps les mécanismes moléculaires et cellulaires, tout en évaluant l'évolution des capacités motrices des souris. Enfin, la dernière phase du projet consistera à évaluer l'efficacité du traitement que nous avons développé récemment sur des souris à un stade très avancé de la pathologie.

Un nombre total de 540 souris sera utilisé sur ce projet, correspondant au nombre minimum de souris nécessaire afin de mener des analyses statistiques pour nos résultats.

2967. Les maladies atopiques, incluant la dermatite atopique (également appelée eczéma), l'asthme, la rhinite allergique et les allergies alimentaires, sont des maladies inflammatoires complexes, impliquant différents sites du corps, avec des caractéristiques communes. Le terme "marche atopique" fait référence à la séquence naturelle des manifestations atopiques, qui montre que la dermatite atopique précède le développement des autres maladies atopiques, et que la sévérité de la dermatite atopique influence le cours de l'allergie respiratoire. Une meilleure compréhension des mécanismes de la marche atopique est cruciale afin de développer des stratégies de préventions efficaces et le traitement des maladies atopiques.

Nous avons développé dans notre laboratoire deux modèles murins mimant les caractéristiques de la marche atopique:

Le premier modèle met en œuvre une rupture mécanique de la barrière cutanée (élimination de la couche superficielle de l'épiderme par application de ruban adhésif) sur une zone d'environ 1 cm² sur le dos de l'animal, suivie de l'application d'un allergène (l'ovalbumine). Cette étape va générer un phénotype présentant différentes caractéristiques propres à la dermatite atopique et va provoquer une sensibilisation de l'animal à l'ovalbumine. 4 semaines après la sensibilisation, nous allons

effectuer des instillations intra-nasales d'ovalbumine, ce qui va générer une réponse allergique au niveau des poumons des animaux, similaire à un phénomène asthmatique.

Dans le deuxième modèle, la rupture de la barrière cutanée est obtenue par la mutation d'un gène codant pour une protéine nécessaire à l'établissement de cette barrière. La mutation du gène est suivie par l'application de l'allergène (l'ovalbumine). Comme précédemment, cette étape va générer un phénotype présentant différentes caractéristiques propres à la dermatite atopique et va provoquer une sensibilisation de l'animal à l'ovalbumine. 4 semaines après la sensibilisation, la génération d'une réponse allergique au niveau des poumons des animaux, similaire à un phénomène asthmatique, va être obtenue en procédant à l'instillation intra-nasale d'ovalbumine.

Une analyse des animaux sera effectuée après la sensibilisation: l'expression des gènes, l'infiltration de cellules immunitaires et la production de molécules inflammatoires seront analysés au niveau de la peau traitée ainsi qu'au niveau des ganglions lymphatiques drainants. Un autre groupe d'animaux sera analysé après la génération de l'asthme expérimental: les mesures seront alors effectuées au niveau des poumons.

Ce protocole expérimental d'induction d'un phénomène de marche atopique sera appliqué à 7 lignées de souris génétiquement modifiées afin d'identifier les rôles de différentes molécules et cellules de la réponse immunitaires. Nous espérons identifier ainsi des cibles thérapeutiques potentielles qui permettraient de prévenir le phénomène de marche atopique.

Remplacement: Les phénomènes à l'œuvre dans la marche atopique mettent en jeu différents organes et des réseaux impliquant plusieurs types cellulaires. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences in vivo pour comprendre ce phénomène et identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques.

Réduction: Ce protocole sera appliqué à un total de 7 lignées de souris génétiquement modifiées afin d'identifier les rôles de différentes molécules et cellules de la réponse immunitaires. Chaque lignée sera constituée au maximum de trois groupes de 12 animaux, et nous utiliserons 12 animaux contrôles non traités pour déterminer les niveaux basaux des paramètres mesurés, pour un total de 264 animaux. Un groupe servira à l'analyse de l'expression des gènes dans les ganglions lymphatiques et au niveau des zones d'applications de l'allergène après la phase de sensibilisation. Ces animaux permettront également d'effectuer une analyse histologique de la peau. Les deux autres groupes permettront d'évaluer la réponse asthmatique après l'instillation intra-nasale de l'allergène. L'effectif de 36 animaux par groupe est l'effectif minimal qui nous permettra d'avoir des résultats statistiquement interprétables pour les différentes phases de la réponse allergique étudiées et pour les différents paramètres mesurés.

Raffinement: La rupture de la barrière épidermique et l'application topique de l'ovalbumine nécessite simplement une anesthésie gazeuse légère. La mesure de l'évaporation de l'eau à travers l'épiderme permet de suivre le processus d'altération de la barrière cutanée, et permet ainsi d'éviter les lésions de la peau. L'instillation intra-nasale de l'allergène s'effectue sous anesthésie générale légère, ce qui nécessite une injection intra-péritonéale de la solution d'anesthésie. Après l'instillation, les animaux dorment durant une quinzaine de minutes, allongés sur le dos sur un plan incliné, et sont surveillés jusqu'au réveil.

2968. Le Psoriasis est une maladie de la peau qui affecte 2% de la population mondiale caractérisée par une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme et une inflammation de la peau. Les mécanismes de la pathogénèse du psoriasis restent peu connus. Dans notre laboratoire, nous avons à notre disposition un modèle murin mimant la pathologie du psoriasis que nous souhaitons utiliser pour étudier la pathogénèse de cette maladie.

Dans ce but, nous souhaitons induire une inflammation de la peau similaire à celle observée dans le psoriasis par une application cutanée d'Aldara. L'Aldara est une crème utilisée chez l'Homme pour le traitement de différentes maladies de la peau, dont le principe actif est l'imiquimod, un ligand de récepteurs cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire. Le calcipotriol est un analogue à la vitamine D qui est utilisé chez l'Homme pour le traitement des plaques de psoriasis. Au laboratoire, nous utilisons le calcipotriol dans le cadre de l'étude d'un modèle murin de dermatite atopique.

Dans l'objectif de mieux comprendre les mécanismes immunitaires à l'œuvre dans le psoriasis et dans le traitement de cette maladie par l'application de calcipotriol, de l'Aldara et du calcipotriol seront appliqués au niveau de l'oreille des animaux tout les deux jours, puis les échantillons seront collectés après 5 jours de traitement, et la réponse immunitaire sera caractérisée au niveau cellulaire et moléculaire. Ce projet nous permettra d'identifier les événements impliqués dans les différentes phases de la réponse immunitaire. Nous analyserons l'expression des gènes et les compositions cellulaires au niveau de l'épiderme et du derme de l'oreille, ainsi qu'au niveau des ganglions drainants.

Remplacement: Les phénomènes à l'œuvre dans ces réactions immunitaires mettent en jeu différents organes et des réseaux impliquant plusieurs types cellulaires. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences in vivo pour comprendre cette réponse inflammatoire et identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques.

Réduction: Ce protocole sera appliqué à un maximum de 7 lignées de souris génétiquement modifiées afin d'identifier les rôles de différentes molécules et cellules de la réponse immunitaires. Chaque lignée sera constituée au maximum de quatre groupes de 6 animaux, pour un total de 168 animaux. Deux groupes serviront à l'analyse de l'expression des gènes dans les ganglions lymphatiques et au niveau des oreilles des animaux. Ces animaux permettront également d'effectuer une analyse histologique de la peau. Les deux autres groupes seront utilisés pour caractériser les population de cellules présentes dans ces organes. L'effectif de 24 animaux par groupe est l'effectif minimal qui nous permettra d'avoir des résultats statistiquement interprétables pour les différents paramètres mesurés.

Raffinement: l'administration de l'imiquimod et du calcipotriol se fait par application cutanée, ce qui nécessite simplement une anesthésie gazeuse légère. Au jour 5, aucune différence n'est notée au niveau des oreilles des animaux.

2969. La dermatite atopique (DA) est une maladie de la peau pouvant être associée à d'autres affections telles que l'asthme ou la rhinite allergique. La DA, caractérisée par du prurit et de l'eczéma, affecte 10% à 20% des enfants et 1% à 3% des adultes. Les patients présentent une inflammation de la peau et des niveaux d'immunoglobulines dans le sang anormaux. Afin de mimer cette maladie, nous utilisons un modèle d'application cutanée d'une substance allergène (l'isothiocyanate de fluorescéine, FITC) qui génère une hypersensibilité de contact.

Une hypersensibilité est une activation exagérée et potentiellement dommageable du système immunitaire.

Dans ce projet, nous souhaitons poursuivre l'utilisation de ce modèle murin de dermatite atopique afin de déchiffrer physiologiquement le réseau immunitaire à l'origine de la réponse induite par l'application cutanée de cet allergène. L'identification et la caractérisation des cellules impliquées dans ces processus pourraient permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Après l'application du FITC au niveau des oreilles des animaux, les échantillons seront collectés et la réponse immunitaire sera caractérisée aux niveaux cellulaires et moléculaires. Nous analyserons l'expression des gènes et l'infiltration des cellules immunitaires au niveau des oreilles des animaux, ainsi qu'au niveau des ganglions lymphatiques drainants.

Remplacement: Les phénomènes à l'œuvre dans ces réactions immunitaires mettent en jeu différents organes et plusieurs types cellulaires.

Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences in vivo pour comprendre cette réponse inflammatoire et identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques.

Réduction: Ce protocole sera appliqué à un total de 8 lignées de souris génétiquement modifiées afin d'identifier les rôles de différentes molécules et cellules de la réponse immunitaire.

Chaque lignée sera constituée au maximum de quatre groupes de 6 animaux transgéniques et 6 animaux contrôles, pour un total de 384 animaux. Deux groupes serviront à l'analyse de l'expression des gènes au niveau des oreilles et des ganglions des animaux. Ces animaux permettront également d'effectuer une analyse histologique de la peau. Les deux autres groupes seront utilisés pour caractériser la population de cellules présentes dans ces organes. L'effectif de 24 animaux par groupe est l'effectif minimal qui nous permettra d'avoir des résultats statistiquement interprétables pour les différents paramètres mesurés.

Raffinement: l'administration du FITC se fait par application cutanée, ce qui nécessite une anesthésie gazeuse légère. Suite à l'application du FITC, on observe une rougeur des oreilles qui peut être accompagnée de légères démangeaisons pouvant durer jusqu'à deux jours.

2970. Des prélèvements sanguins chez la souris sont effectués dans de nombreux projets de recherche. Le sang collecté permet de réaliser des analyses biologiques (hématologie, biochimie, immunologie,...) afin d'évaluer de multiples fonctions métaboliques. De nombreuses bases de données ont été établies avec du sang prélevé au sinus retro-orbitaire, technique permettant d'obtenir des échantillons de qualité et en quantité suffisante pour réaliser un bilan biologique complet. Cependant cette technique de prélèvement est actuellement controversée et nous voulons tester la méthode de prélèvement à la mandibule, technique moins traumatique et moins douloureuse pour l'animal et ne nécessitant pas d'anesthésie afin de raffiner la procédure de prise de sang habituellement utilisée. Ainsi, ce projet ne peut être réalisé que chez l'animal et ne peut être remplacé par une méthode alternative.

Une cohorte de 72 souris sera utilisée pour cette étude afin d'étudier l'influence éventuelle du mode de prélèvement ainsi que de l'anesthésie sur les paramètres sanguins hématologiques et biochimiques courants; ces souris seront réparties en 3 groupes: 12 mâles et 12 femelles prélevées en retro-orbital avec anesthésie, 12 mâles et 12 femelles prélevées en submandibulaire avec anesthésie et 12 mâles et 12 femelles prélevées en submandibulaire sans anesthésie.

Réduction: Etant donné la variabilité inter-individu des paramètres sanguins chez la souris un nombre de 12 animaux par groupe est nécessaire afin d'effectuer des analyses statistiques et d'évaluer s'il existe une différence entre les 3 types de prélèvement. Par ailleurs les mâles et les femelles n'ayant pas les mêmes données physiologiques il est nécessaire d'utiliser les 2 sexes.

Cette étude nous permettra de valider si la technique de prélèvement mandibulaire fournit des échantillons sanguins suffisants et de bonne qualité afin d'effectuer des dosages biologiques et également si ces résultats sont comparables ou corrélables à ceux de nos bases de données existantes. Par la suite une technique de prélèvement moins traumatique et ne nécessitant pas d'anesthésie de l'animal pourrait être adoptée en vue d'un raffinement de la technique.

2971. En Ecole Vétérinaire, l'apprentissage de techniques chirurgicales dites de convenance (interventions réalisées quotidiennement en pratique courante dans un cabinet vétérinaire) nécessite :

- un enseignement théorique sous forme de cours présentant et expliquant les différentes techniques ;
- un enseignement pratique en TP afin de réaliser les gestes en plaçant l'étudiant dans un contexte proche de la réalité ;
- un enseignement clinique visant à placer l'étudiant en situation réelle face à des patients.

Cette dernière étape ne doit en aucun cas survenir avant que les étudiants n'aient pu, au préalable, être sensibilisés et guidés dans la réalisation pratique et réelle de chaque geste.

Afin de préparer les étudiants à cette activité professionnelle, l'enseignement pratique vise à mettre l'étudiant en situation proche du réel : stérilisation d'une femelle vivante, activité chirurgicale réalisée quotidiennement en clientèle vétérinaire. L'étudiant est alors confronté à un patient anesthésié, à la réalisation des gestes dans la règle de l'art, à la gestion d'éventuels saignements afin d'acquérir les bons réflexes.

Néanmoins, pour limiter au maximum le nombre d'animaux, l'enseignement pratique nécessite le sacrifice d'une lapine pour 2 étudiants soit l'équivalent d'un ovaire par étudiant dans toute sa scolarité. L'effectif d'une promotion étant aux environs de 160, cela représente 8 séances de 10 binômes par an sur 5 ans soit 400 lapines sur 5 ans.

2972. La capacité de garder en mémoire une expérience est essentielle pour la survie des organismes supérieurs. Cette capacité est en partie assurée par une structure cérébrale appelée hippocampe. Les neurones de cette structure sont capables de modifier leurs connexions en fonction des informations qu'ils reçoivent, autrement dit, ils sont capables de « plasticité synaptique ». Ce mécanisme joue un rôle dans le stockage de la mémoire. De plus, l'hippocampe est divisé en plusieurs sous-régions, connues pour jouer différents rôles dans la mémoire. La sous-région CA3 (subdivision 3 de la corne d'Ammon), est impliquée dans la mémoire des événements vécus dans leurs contextes. Des modélisations numériques de cette sous-région ont permis d'émettre l'hypothèse qu'elle serait particulièrement importante pour développer la représentation instantanée d'un contexte.

Cependant, le fonctionnement in vivo des circuits de neurones du CA3, et le rôle joué par la plasticité synaptique n'ont pas encore été testés. Le projet propose d'étudier le fonctionnement des circuits du CA3 in vivo, à l'aide d'enregistrements de neurones chez la souris éveillée. Grâce à une technique appelée « optogénétique », il sera possible d'activer ou de rendre silencieuse une population de neurones en les éclairant avec un laser. Ces manipulations permettront d'enregistrer la réponse de certains neurones après activation et/ou inhibition d'autres neurones, et donc de comprendre le fonctionnement des circuits du CA3 intacts.

Pour mener à bien ce projet, il est nécessaire de pouvoir manipuler l'hippocampe dans son ensemble, et donc d'étudier l'animal entier. J'utiliserai la souris car c'est une espèce de choix pour les études sur le système nerveux central des Vertébrés. L'organisation du système central de cette espèce est assez proche de celle de l'homme, ce qui permet une extrapolation des résultats obtenus chez cette espèce à l'espèce humaine pour mieux comprendre les mécanismes synaptiques à une échelle moléculaire. A ce jour, il n'existe pas de modèle permettant de remplacer entièrement le recours à l'animal pour ce type de projet. De plus, ce projet tend à étudier les circuits du CA3 de la manière la plus physiologique possible. C'est pourquoi il est nécessaire d'effectuer les expériences chez la souris éveillée, capable d'effectuer une tâche comportementale, de manière à pouvoir analyser réellement les différents mécanismes de plasticité et de transmission synaptiques, et ce sans l'effet délétère de l'anesthésie. Cependant, il est important de souligner que j'analyserai et tiendrai compte de chaque résultat obtenu, de manière à raffiner le nombre d'animaux nécessaire au bon déroulement du projet (nombre d'animaux prévus : 600). Dans chaque expérience, des précautions seront prises pour diminuer l'impact stressant et douloureux des procédures expérimentales (utilisation d'analgésiques locaux, suivi post-opératoire, régulation thermique, contrôle de la fonction respiratoire...). Si l'animal se révèle trop stressé ou en état de souffrance, les expériences seront arrêtées (critères d'interruption).

2973. Chez les mammifères, la famille des interleukines-17 (IL-17) est constituée de six membres : IL-17A (ou IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (également nommée IL-25) et IL-17F. La cytokine la plus connue de la famille de l'IL-17 est l'IL-17A et son rôle dans les maladies auto-immunes et inflammatoires a été largement étudié. Cependant, son implication dans le développement tumoral reste controversée. Quant aux autres cytokines, peu d'études ont été menées concernant leur rôle dans le cancer.

In vitro, nous avons démontré que l'IL-17A et l'IL-17B stimulent la prolifération, la migration et induisent une chimiorésistance au Docétaxel de cellules humaines du cancer du sein. Ces effets sont neutralisés par l'utilisation d'anticorps dirigés contre ces cytokines. De plus, dans une cohorte de patients, il a été montré que l'IL-17A ainsi que l'IL-17B sont de mauvais facteurs de pronostic dans le cancer du sein. Ces diverses données font de ces cytokines de potentielles cibles thérapeutiques dans le cancer du sein.

Les objectifs du projet sont :

- 1- de confirmer in vivo le rôle pro-tumoral de l'IL-17A et l'IL-17B,
- 2- de valider les anticorps anti-IL-17A et anti-IL-17B comme candidat pour l'immunothérapie anti-tumorale par neutralisation de ces cytokines.

Pour cela, des lignées humaines du cancer du sein surexprimant ou non l'IL-17A ou l'IL-17B seront injectées en sous-cutanée à des souris immunodéficientes. Ces animaux seront surveillés quotidiennement dans le but de :

- suivre le développement de la tumeur, celle-ci ne devant pas excéder 10% du poids normal de l'animal,
- détecter le moindre signe de souffrance et/ou de détresse de l'animal (exigence de raffinement).

Le nombre d'animaux sera réduit au minimum tout en ayant un nombre suffisant pour obtenir un résultat statistiquement significatif (exigence de réduction).

Après cette première série d'expériences, nous testerons in vivo les effets neutralisant de différents anticorps anti-IL-17A et anti-IL-17B, préalablement validés dans des tests in vitro. Comme précédemment, le nombre d'animaux sera réduit au minimum tout en ayant un nombre suffisant et les souris seront suivies quotidiennement. Nous utiliserons pour l'ensemble de ce projet 780 souris.

2974. Ce projet a pour but principal d'étudier si l'exposition à un entraînement cognitif peut avoir des conséquences positives sur l'addiction. Cette hypothèse de travail est basée sur des recherches récentes chez les rongeurs qui montrent que l'exposition à un milieu riche et stimulant est capable de diminuer l'addiction. Dans ce projet, nous allons tester si des rats qui ont la possibilité de pratiquer un entraînement cognitif avant et/ou après avoir accès à la cocaïne développent moins

d'addiction que des rats qui n'ont pas ce type d'entraînement. Toutes les expériences auront 3 procédures communes et une 4ème procédure qui changera en fonction des mesures réalisées.

La procédure 1 correspond à une chirurgie permettant l'implantation d'un système de connexion qui permettra à l'animal d'être relié à un ressort métallique dans la cage de comportement pendant les sessions d'entraînement au comportement opérant de prise de nourriture.

La procédure 2 correspond à l'apprentissage du comportement opérant (appuis sur un levier) pour obtenir une récompense (morceau de nourriture).

La procédure 3 correspond à une chirurgie qui permettra l'implantation d'un cathéter chronique dans la veine jugulaire des rats.

La procédure 4 correspond à l'auto-administration (grâce à ce cathéter) d'une drogue dans des cages opérantes en concomitance avec deux types d'entraînement cognitif.

Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner). Ce type de recherche, visant à comprendre les bases d'une maladie psychiatrique telle que l'addiction, peut uniquement être menée sur un animal vivant (remplacer). Nous minimiserons le nombre d'animaux utilisés par des méthodes expérimentales validées et reproductibles. Et nous utiliserons des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA qui nous permettront de faire des comparaisons multiples et de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduire). Les animaux subissant une chirurgie (procédures 1 et 3) seront traités pour de possibles douleurs post-opératoires (raffiner). Nous avons calculé que pour cette étude 768 rats seront nécessaires pour obtenir des données qui soient analysables statistiquement.

Cette recherche est innovante et a le potentiel de fournir des informations critiques pour la compréhension de l'addiction, informations qui peuvent amener à une meilleure prise en charge de cette maladie chez l'homme.

2975. Dans les élevages ovins et caprins, les parasites, et notamment les nématodes gastro-intestinaux (NGIs), peuvent causer des troubles sanitaires considérables (amaigrissement, diarrhée, anémie, mortalité), et être à l'origine de pertes économiques marquées.

La maîtrise des parasitoses a longtemps reposé sur l'emploi de molécules anthelminthiques (AH) de synthèse. Cependant, les résistances à ces AHs chez les populations de vers rendent aujourd'hui ces traitements de plus en plus inopérants. Par ailleurs, la demande sociétale est forte pour réduire les intrants chimiques en élevage et limiter leur impact sur l'environnement, ce qui se traduit par des contraintes réglementaires de plus en plus sévères. Cette situation impose de chercher des solutions alternatives à la vermifugation par les AHs.

Dans le cadre de cette démarche, le recours à des végétaux riches en tanins a rapidement été identifié comme une alternative crédible à l'utilisation des AHs ; l'emploi de légumineuses fourragères telles que le sainfoin ou le sericea lespedeza en tant que nutriments a d'ailleurs été validé de manière répétée. En outre, depuis quelques années, il est apparu que des coproduits agro-industriels (coproduits de l'industrie des noix, caroube ...) pouvaient aussi être valorisables en raison de leurs propriétés antiparasitaires potentielles.

Les données expérimentales obtenues précédemment par notre équipe suggèrent que l'activité anthelmintique des tanins serait dépendante de leur concentration dans la ration et de la durée pendant laquelle ils sont apportés. L'objectif principal de ce projet est donc de tester cette hypothèse in vivo puisqu'il n'existe pas actuellement de méthode in vitro permettant de reproduire le cycle de vie complet des NGIs des petits ruminants. L'essai sera réalisé chez des caprins, car, dans cette espèce, la capacité à développer une réponse immunitaire contre les NGIs est faible et les éleveurs se retrouvent souvent sans solution de traitements antiparasitaires. Trente chèvres, répartis en 3 lots de 10 animaux et élevés dans des conditions classiques, seront ainsi infestés expérimentalement par 2 espèces de NGIs (*Haemonchus contortus*, parasite de la caillette, et *Trichostrongylus colubriformis*, parasite de l'intestin), à des niveaux comparables à ceux observés en élevage, et nourries avec des rations contenant respectivement 0 (lot témoin), 4 et 6 % de tanins. Le degré d'infestation des animaux sera principalement évalué par coproscopie. En outre, une surveillance clinique quotidienne et la réalisation de prélèvements sanguins hebdomadaires pour mesure de l'hématocrite permettront d'évaluer l'état sanitaire des animaux et, le cas échéant, de retirer de l'essai et de vermifuger les individus trop sévèrement atteints.

Au bout de 10 semaines, les animaux seront euthanasiés par injection et des prélèvements de contenus digestifs seront effectués post-mortem pour comptage des populations de vers et mesure de leur fertilité.

2976. Le but de ce projet est de tester de nouvelles molécules à visée thérapeutique pour rétablir la production de glucose par le foie dans le cadre d'une maladie rare orpheline, la glycogénose de type 1 (GSD1). Cette maladie rare se caractérise par des hypoglycémies sévères lors de jeûnes courts et de pathologies associées à l'accumulation de glycogène et de lipides dans le foie et les reins. Nous disposons d'un modèle de souris viables car le gène *G6pc* a été muté uniquement dans le foie. Ainsi, ces souris sont capables de réguler leur glycémie au cours du jeûne même en absence de production hépatique de glucose (grâce à l'induction de la production de glucose par les reins et l'intestin). De plus, elles développent aussi toute la pathologie hépatique caractéristique de la GSD1. L'accumulation de glycogène due à la perte de l'activité glucose-6 phosphatase dans le foie n'entraîne pas de souffrance ou mal-être chez les animaux jeunes qui seront étudiés (<6 mois). Ce modèle animal nous permettra de tester l'efficacité de nouvelles molécules à visée thérapeutique de la GSD1 en étudiant l'utilisation des stocks de glycogène au cours d'une nuit de jeûne. Pour analyser leur effet thérapeutique, ces molécules doivent être injectées chez l'animal avant de proposer de nouvelles perspectives de traitement aux patients. La non toxicité de ces molécules a été vérifiée préalablement in vivo chez des souris non transgéniques.

Pour réaliser ce projet, nous avons respecté la règle des 3R.

Remplacement :

L'efficacité des molécules à tester a été validée in vitro en cellules mais seul le traitement des animaux atteints de GSD1 permettra de valider leur efficacité sur le tissu ciblé, c'est à dire le foie, après leur injection dans la circulation sanguine.

Réduction :

Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances de la pathologie dans ce modèle animal et du métabolisme glucidique (utilisation des stocks de glycogène du foie, régulation de la glycémie au cours du jeûne). Afin de pouvoir faire une analyse statistiques, des groupes de 8 souris analysées. Les souris femelles transgéniques non utilisées dans ce projet seront utilisées pour la reproduction. Ce projet nécessitera l'obtention de 64 souris au total.

Dans un souci de raffinement des méthodes, les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les animaux sont manipulés régulièrement, observés quotidiennement et pesés toutes les semaines pour suivre leur prise de poids. La connaissance du modèle animal permet de définir des points limites. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever les organes d'intérêt. Cette étude pilote a été limitée à une seule injection de molécule à tester pour vérifier son efficacité avant de poursuivre un traitement plus long. Les molécules seront injectées par voie intraveineuse et les animaux seront mis à mort après 24h.

En conclusion, ces premières expériences pilotes réalisées in vivo pourraient permettre de proposer une nouvelle approche thérapeutique dans le cadre de la GSD1. La durée de l'étude est limitée à 6 mois et dépend du délai d'obtention des souris transgéniques.

Les réactions d'hypersensibilité induites par des médicaments sont fréquentes chez l'homme. Dans le développement d'un produit pharmaceutique issu des biotechnologies, ou dans l'évaluation des potentielles allergies croisées entre différents composés biologiques, une évaluation de l'hypersensibilité immédiate peut être requise.

L'évaluation de l'hypersensibilité immédiate prend en compte le potentiel allergène du produit testé, et peut également donner des informations quand à un défaut d'activité biologique du produit test en cas de réaction immune anti-médicament (via une modification de la pharmacodynamie ou de la pharmacocinétique par exemple). A ce jour il n'existe pas de méthode alternative validée permettant de réaliser ce type d'évaluation in vitro.

La réalisation de tests d'hypersensibilité immédiate n'est pas recommandée en systématique pour tout les produits issus des biotechnologies, tel que décrit dans la ligne directrice ICH S6, mais peut être mise en oeuvre dans l'évaluation de produits humanisés ou d'évaluation de réactions croisées par exemple. Il concerne les protéines pouvant être allergènes par elles-même, et également les petites molécules pouvant se lier aux protéines intrinsèques, et les adjuvants de vaccins comme décrit dans la ligne directrice CHMP/BEG/134716/2004. Ce projet permet donc la détection de réactions allergiques et pseudo-allergiques.

2977. Ce projet se résume à l'administration par voie sous-cutanée, intradermique ou intrapéritonéale du produit test à des groupes de cobaye à deux occasions (jour 1 et jour 8). Chaque groupe comporte 5 (groupes contrôle et témoin positif) ou 10 individus (produit test). L'administration au Jour 1 est complétée par l'administration conjointe d'un adjuvant afin de potentialiser la possible réaction allergique.

Après une période de repos de quelques jours, les animaux reçoivent à nouveaux le produit test par voie intraveineuse et sont observés cliniquement en continu pendant l'heure suivant l'administration afin de détecter tout signe d'hypersensibilité immédiate. Un analgésique local est utilisé avant injection intraveineuse dans le but de limiter l'inconfort des animaux.

Les concentrations utilisées lors des administrations des phases d'induction et de challenge auront préalablement été testées pour vérifier qu'elles sont bien tolérées sur chaque voie d'administration utilisée. Cette évaluation préalable est réalisée sur 2 groupes de 4 cobayes lors d'un essai préliminaire.

Il est également possible, lors de l'évaluation de réactivité croisée entre différents allergènes, d'inclure des groupes additionnels de 10 cobayes afin d'évaluer la réponse obtenue après induction par chacun des allergènes étudiés.

Le cobaye est généralement l'espèce de choix puisqu'il a la capacité de rapidement développer des réactions d'hypersensibilité immédiate. Il est également reconnu que les poumons sont des organes extrêmement sensibles chez cette espèce, et impliqués lors de chocs analyphactiques consécutifs à une réaction d'hypersensibilité immédiate sévère.

Le nombre d'animaux est défini à minima afin d'obtenir des résultats robustes en limitant tout biais lié à une variation inter-individuelle et ainsi d'atteindre les objectifs de l'étude sur un nombre optimisé d'animaux.

Les animaux dont l'état de santé est contrôlé tous les jours sont hébergés individuellement avec enrichissement. L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée.

Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet de 5 ans peut être estimé à 1500.

2978. Le projet, réalisé dans un cadre réglementaire et consistant en deux procédures, a comme objectif d'évaluer ou de donner de premières informations sur les effets indésirables de produits sur des fonctions de reproduction et/ou sur le développement pré- et post-natal de la descendance et/ou sur la santé des individus, évaluation qui peut être requise par les autorités pour les demandes de mise sur le marché de médicaments ou d'enregistrement de produits chimiques (REACH)...

Ce projet se résume en l'administration répétée (quotidienne en général) d'un produit pharmaceutique, chimique, vétérinaire... chez le rat pendant la phase de pré-accouplement, pendant les accouplements, et pendant les premiers stades de

la gestation ou pendant la gestation puis la lactation. La voie d'administration est généralement soit celle prévue chez l'homme (produit pharmaceutique), soit orale (produit chimique).

Le rat est l'espèce recommandée par les autorités internationales et couramment utilisée dans les études de toxicologie. Le nombre d'animaux utilisés au maximum dans ce projet est estimé à 23050 (adultes traités + petits naissant suite aux accouplements dans une des 2 procédures). Le nombre d'animaux traités par groupe/sexe (permettant d'obtenir des résultats robustes et d'atteindre les objectifs des études) et les doses initiales utilisées (choisies en vue d'éviter toute toxicité excessive) suivent les recommandations des lignes directrices OCDE ou ICH.

L'hébergement des animaux est individuel afin de protéger les gestations et empêcher les agressivités entre mâles, et peut être recommandé pour certaines voies d'administration (expl: voie dermale pour éviter la contamination entre animaux et garantir la dose administrée sur la peau). Les dimensions des cages sont conformes à la Directive 2010/63 et une attention particulière est apportée à l'enrichissement environnemental.

Lors des études, l'état de santé des animaux est contrôlé régulièrement (observation des animaux et enregistrement des signes cliniques tous les jours, suivi poids corporel et/ou consommation alimentaire au moins une fois par semaine) et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter tout inconfort ou souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance de l'animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptable.

Des prélèvements comme pour analyses hématobiochimiques et/ou urinaires peuvent être réalisés et une anesthésie est faite avant les prélèvements de sang selon la méthode utilisée. Des prélèvements d'organes pour analyse histopathologique ou des paramètres de sperme sont réalisés après euthanasie et/ou après anesthésie profonde juste avant euthanasie.

Les volumes d'administration des produits et les volumes de prélèvements sanguins sont en accord avec les recommandations EFPIA/ECVAM.

Il n'existe pas de méthode alternative in vitro pour ces types de procédure en raison de la complexité que représentent un organisme vivant et celle des processus de développement des concepti et des échanges dynamiques entre mère et descendance.

2979. L'objectif de ce projet est d'évaluer les possibles effets toxiques locaux suite à l'administration du produit test via sa voie d'administration clinique mais aussi via d'autres voies mimant une mauvaise administration.

Ce projet se résume par l'administration systémique du produit test par voie intraveineuse, périverneuse, intra-artérielle, sous-cutanée et intramusculaire chez le lapin. Les voies d'administration sont choisies en fonction des caractéristiques d'expositions prévues chez l'homme.

L'espèce animale choisie est le lapin, couramment utilisé pour ce type d'essai du fait de sa sensibilité et de la bonne accessibilité du réseau artério-veineux auriculaire superficiel permettant une évaluation facilitée des réactions locales chez les individus albinos. De par sa taille le lapin permet également d'évaluer différentes voies d'administration chez un même animal sans compromettre l'évaluation des réactions locales.

Le lapin New Zealand white est habituellement accepté et autorisé par les autorités réglementaires.

A ce jour il n'existe aucune méthode alternative in vitro réglementaire permettant de réaliser une évaluation de la tolérance locale après injection intraveineuse, périverneuse, intra-artérielle, sous-cutanée et intramusculaire. Conformément à la ligne directrice CPMP/SWP/2145/00, la réalisation de ce projet est indispensable afin de garantir la sécurité d'utilisation chez l'homme.

Le nombre d'animaux est fixé à 6 du même sexe par groupe et constitue un nombre minimal permettant d'avoir une représentation moyenne des réponses locales non influencé par la variabilité individuelle. Chaque animal est traité via différentes voies d'administration de manière à garantir l'utilisation d'un nombre restreint d'animaux tout en ne compromettant pas la validité de l'étude.

Le nombre total d'animaux utilisés pour ce projet de 5 ans peut être estimé à un total de 300 lapins.

Le nombre d'animaux est défini à minima afin d'obtenir des résultats robustes et ainsi d'atteindre tous les objectifs de l'étude en procédant à toutes les analyses sur un nombre d'animaux optimisé pour évaluer la tolérance locale à chaque site d'injection.

L'hébergement des lapins est effectué dans des cages conformes à la Directive 2010/63 avec enrichissement. L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée.

2980. L'objectif de ce projet est de garantir la sécurité d'utilisation de produits biologiques (pharmaceutiques à visée humaine ou vétérinaire) avant leur libération pour utilisation chez l'homme ou l'animal. Ce projet se place dans le cadre de validation de lots de produits biologiques humains décrits dans la pharmacopée européenne, ainsi que dans la libération de lots de produits biologiques vétérinaires. L'objectif est de démontrer l'absence de différents types de contaminant dans le nouveau lot produit. Ce projet peut également être mis en œuvre dans la délivrance d'un certificat de fabrication pouvant être requis pour la préparation de produits destinés à une administration par voie parentérale.

La validation d'un lot de médicament humain, tel que décrit dans la pharmacopée européenne, peut être réalisée sans avoir recours à l'utilisation d'un test sur animal. Cette approche est mise en œuvre par le biais de tests in vitro tels que par exemple des tests de stérilité, une recherche d'endotoxines et un test de pyrogénicité. La validation du procédé de fabrication selon les

Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), et l'établissement de contrôles qualité à chaque libération de lot constituent également des éléments permettant d'assurer l'innocuité du nouveau lot fabriqué sans faire appel aux tests sur animaux.

La ligne directrice VICH GL50 relative aux validations de lots de vaccins inactivés à utilisation vétérinaire, établit les critères nécessaires à l'évaluation de l'innocuité d'un lot sans recours à l'animal de laboratoire.

Pour autant, un fabricant peut être dans l'obligation de réaliser un test de toxicité anormale afin de satisfaire aux exigences d'agences réglementaires en dehors de l'Europe.

Ce projet se résume à une administration systémique du produit d'étude chez des souris ou des cobayes. La voie d'administration est choisie en fonction du type de produit à tester (intrapéritonéale pour immunosérum/vaccin versus intraveineuse pour hormones/enzymes/antibiotiques). Chaque administration est suivie d'une période d'observation allant de 24h à 7 jours. L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours entre l'administration et la fin de période d'observation (entre jour 2 et jour 8), et est évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée.

La souris et le cobaye sont les espèces de choix tel que décrit dans la pharmacopée européenne.

Le nombre d'animaux est également défini dans la pharmacopée européenne.

Les animaux dont l'état de santé est contrôlé tous les jours sont hébergés en groupe avec enrichissement. Le nombre d'animaux dans le cadre de ce projet de 5 ans est estimé à 375.

2981. La fibrose du foie est une conséquence majeure des maladies hépatiques chroniques telles que les hépatites, les maladies métaboliques (stéatose hépatique, obésité) ou encore l'alcoolisme. La fibrose peut évoluer en cirrhose puis en cancer du foie - l'un des cancers les plus mortels. A ce jour, il n'existe pas de traitement standard pour traiter la fibrose ou la cirrhose hépatique. Cependant, un effort constant de la recherche a permis de mieux comprendre les mécanismes de développement de la fibrose, mettant en évidence différents facteurs biologiques responsables de la maladie qui peuvent être utilisés comme cibles dans de nouveaux traitements.

L'objectif de notre projet est de développer des médicaments pour traiter la fibrose hépatique. Pour cela nous mettrons en place un modèle de fibrose hépatique chez la souris afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique de différents médicaments sur l'évolution de la maladie.

Après avoir déterminé les systèmes thérapeutiques les plus efficaces in vitro, ceux-ci devront être testés chez l'animal. La souris est un excellent modèle animal pour les pathologies hépatiques et notamment pour la fibrose car les caractéristiques de la maladie développée chez la souris sont proches de la maladie humaine. Ce modèle animal récapitule toutes les étapes du développement et les potentielles variabilités de la maladie à l'échelle de l'organisme entier. Un tel niveau d'information ne peut pas être obtenu à l'aide d'un modèle in vitro uniquement.

Pour leur faire développer une fibrose, les souris seront soumises à un régime alimentaire particulier (ne contenant pas certains acides aminés) pendant une durée maximale de 12 semaines. Ce régime pouvant entraîner une légère perte de poids des animaux, leur état sera surveillé quotidiennement. Après le développement de la fibrose, les nouveaux agents thérapeutiques seront injectés aux souris afin de déterminer quel médicament s'avère le plus efficace. Pour pouvoir atteindre les objectifs de ce projet, prévu sur 5 ans, un total de 403 souris au maximum sera nécessaire.

Les procédures expérimentales nécessaires à ce projet ont été élaborées et réfléchies afin de minimiser le nombre d'animaux tout en permettant de réaliser une étude statistique valable. Le modèle de fibrose que nous avons choisi consiste uniquement en l'apport d'une alimentation spécifique, il a l'avantage de refléter le plus fidèlement la pathologie humaine, et entraîne beaucoup moins de mortalité que les modèles les plus courants basés sur l'injection de composés toxiques.

Les résultats de ce projet nous permettront à la fois de mieux comprendre les mécanismes de la fibrose hépatique mais également de déterminer les agents thérapeutiques intéressants pour le traitement de cette maladie chez l'homme. Nous espérons que cette étude sera un premier pas vers la découverte de nouveaux médicaments pour soigner la fibrose et la cirrhose hépatiques, actuellement incurables.

2982. Les anomalies congénitales du rein et le tractus urinaire (CAKUT) font partie des malformations les plus importantes à la naissance et sont la cause prédominante de défaillance rénale chez les enfants. Les maladies CAKUT peuvent avoir différents degrés de variabilité uni ou bilatéral, allant d'une absence totale du rein en passant par des reins polycystiques ou encore défaut du branchement, urètres multiples, obstruction urinaire, hypoplasie rénale, ... etc. Si elles ne sont pas létales à la naissance, elles peuvent l'être pendant l'enfance ou l'adolescence. Chez les adultes, les maladies CAKUT engendrent des pathologies rénales chroniques associées au diabète et une hypertension artérielle qui sont les premières causes de mortalité chez ces patients. Malgré cet important impact de santé publique, dans 80% des maladies CAKUT, aucun gène n'a été à ce jour identifié. Notre but est de comprendre les mécanismes moléculaires qui aboutissent au développement normal du rein et par conséquent d'identifier des gènes dont la mutation aboutit aux maladies CAKUT. L'identification de ces gènes permettra également un diagnostic prénatal.

L'utilisation de la technologie moderne de séquençage "Next Generation Sequencing NGS" sur une large cohorte de patients atteints des CAKUT (anomalies congénitales du rein et du tractus urinaires) permet l'identification de multiples variantes génétiques. Cette vaste opération est lancée par un consortium international d'étude de maladies rénales. La part de contribution de notre laboratoire au sein de ce consortium est d'introduire des mutations identifiées chez les patients dans le génome de souris et de reproduire ainsi des modèles murins des pathologies rénales.

Dans cette demande d'autorisation d'expérimentation animale, nous envisageons de créer 8 différents modèles de souris transgéniques à partir de 5 gènes pouvant être impliqués dans le développement du rein.

En parallèle, dans un souci de réduire le nombre de souris subissant des expérimentations, nous envisageons de réaliser, des expériences sur des cultures ex-vivo du rein isolé à partir des embryons sauvages du premier et deuxième tiers de gestation (Réduction). Dans certaines étapes clé de nos investigations, nous remplaceront le modèle vivant par des reins organoïdes que nous sommes sur le point de générer in vitro (Remplacement). Nous portons une attention particulière à la survenue de tout phénotype dommageable qui nous dictera la fin de notre expérimentation (Raffinement).

Pour réaliser ce projet, nous envisageons d'utiliser 1267 souris pour créer des modèles murins des pathologies rénales et vérifier une éventuelle présence du phénotype dommageable.

Chez la souris, pendant la vie intra-utérine, le rein n'a pas une fonction vitale. Par conséquent, toute malformation rénale sévère n'est létale qu'à la naissance. Nous allons donc restreindre nos analyses chez l'embryon. Si nous ne détectons aucune anomalie rénale chez l'embryon, nous laissons les animaux naître. Les modifications génétiques apportées sont ciblées aux pathologies rénales et ne devraient impacter d'autres organes ou systèmes. Cependant, les souriceaux seront observés et examinés tous les jours et les points limites seront appliqués selon notre grille de surveillance. Dans une perspective de réduire le nombre de souris utilisées, nous regrouperons nos expérimentations sur les échantillons prélevés. Dès que nous atteindrons le nombre suffisant d'échantillon pour conclure nos résultats de façon significative, nous arrêterons nos expérimentations.

2983. Le mélanome est un cancer de la peau extrêmement agressif du fait de sa capacité à se disséminer dans tout l'organisme sous la forme de métastases.

Récemment deux nouvelles options thérapeutiques ont vu le jour améliorant considérablement les chances des patients atteints d'un mélanome pour lesquels il n'existait auparavant qu'une chimiothérapie très peu efficace. L'arsenal thérapeutique consiste aujourd'hui en: -D'une part les thérapies ciblant spécifiquement des protéines dérégulées dans les tumeurs et qui entraînent leur prolifération anarchique. Ces thérapies dites ciblées sont efficaces à court terme chez environ 50% des patients mais tous les patients développent rapidement une résistance au traitement;

-D'autre part, des thérapies visant à mobiliser les défenses immunitaires du patient contre les cellules cancéreuses, appelées immunothérapies. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec immunothérapie bloquant l'interaction entre PD1/PDL1. En effet, afin d'échapper au système immunitaire, les cellules de mélanome vont exprimer une protéine appelé PDL1 qui va se lier à une protéine appelé PD1 sur les cellules immunitaires entraînant leur inhibition. Ce traitement est efficace chez 30% des patients avec une régression tumorale à plus long terme. Le challenge actuel est de mieux comprendre la façon dont sont régulées PD1 et PDL1 afin d'améliorer les réponses à ce traitement.

Dans ce cadre nous souhaitons nous intéresser à l'implication d'un complexe multi-protéique appelé eIF4F (dont l'activation est liée à une prolifération anarchique des cellules) dans la régulation de PDL1 dans les cellules de mélanome et de PD1 dans les cellules immunitaires.

Dans un souci de remplacement, des expériences préliminaires in vitro ont été menées et ont permis de montrer que des inhibiteurs du complexe eIF4F bloquent l'expression par les cellules tumorales de la protéine PD-L1, le partenaire immunosuppresseur du récepteur lymphocytaire PD1, laissant présager un effet bénéfique sur l'immunité anti tumorale d'un patient. Cependant ces expériences in vitro ne permettent pas de prendre en compte toute la complexité des interactions qui existe entre une tumeur et le système immunitaire et à l'heure actuelle et à notre connaissance il n'existe pas de modèle alternatif pertinent permettant l'étude des interactions tumeur-système immunitaire. Il est donc maintenant indispensable de confirmer ces résultats chez la souris.

Afin de réduire au minimum le nombre de souris utilisées dans cette étude sans compromettre la validité de nos résultats, nous réaliserons une première expérience avec des groupes de 10 souris par condition puis le nombre de souris par groupe sera éventuellement revu à la baisse dans la suite du projet si moins de 10 souris sont nécessaires et suffisantes pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre maximal estimé de souris nécessaire pour ce projet est de 690.

Par souci de raffinement, les cellules cancéreuses greffées aux souris ont été modifiées in vitro pour exprimer la luciférase, une enzyme qui produit de la lumière en présence de son substrat: la luciférine et en présence d'ATP. Ceci permet le suivi de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses injectées aux souris par imagerie bioluminescente à plusieurs temps de l'expérience en évitant la multiplication du nombre d'animaux pour pouvoir les sacrifier à différents temps de l'expérience.

2984. Pour le développement de nouveaux médicaments, il est nécessaire d'étudier le devenir de la substance active dans l'organisme, déterminer l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination du composé (ADME), des propriétés qui vont influencer la posologie du médicament (dose administrée et fréquence d'administration).

L'objectif de ce projet est la mesure de la biodisponibilité de produits pharmacologiques en cours de développement, molécules actives ou candidats-médicaments, chez la souris et le rat.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, nous utiliserons la souris ou le rat, car ces espèces animales sont les plus utilisées dans le développement de médicaments. A ce jour, aucun modèle alternatif n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre d'évaluer la biodisponibilité d'une molécule, qui met en jeu les mécanismes de dégradation, de transport et d'élimination des composés susceptibles d'affecter l'activité des molécules. Pour cette raison, une approche in vivo est nécessaire pour déterminer la biodisponibilité des nouveaux candidats-médicaments avant de poursuivre leur développement.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance. La souris et le rat étant des animaux sociaux, les souris seront maintenues par groupes de 8 et les rats par groupe de 3, dans des cages de grande taille enrichies de tubes en carton. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, de la nourriture et de l'état des animaux.

La douleur liée aux injections est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'administration des candidats-médicaments pour visualiser tout signe de toxicité imprévue qui nécessiterait la mise à mort de l'animal.

Réduire

Nous avons montré que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet une mesure efficace de la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. Les résultats sont exploités sous la forme de courbes cinétiques. Aucune comparaison statistique n'est requise. La réalisation des procédures par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet ainsi de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Les mesures de pharmacocinétique seront réalisées à l'aide de 3 souris par temps et 8 temps sur une durée de 24h et 2 voies d'administrations, soit 48 souris par composé. Chez le rat, le volume sanguin plus important nous permet de réaliser 3 prélèvements chez le même animal, soit une mesure de la pharmacocinétique d'un candidat-médicament effectuée à l'aide de 16 rats.

Il est prévu de mesurer la biodisponibilité de 25 candidats-médicaments par an chez la souris (1200 souris) et 2 chez le rat (32 rats) sur une période de 5 ans, soit un total de 6000 souris et 160 rats.

2985. Ce projet propose de tester l'implantation d'un dispositif de pancréas artificiel pour évaluer les modalités techniques chirurgicales et sa fonctionnalité chez un modèle de mini-porcs diabétique.

Le MAILPAN (MAcroencapsulation of PANcreatic Islets) est un prototype de pancréas bioartificiel dédié au traitement des patients diabétiques de type 1. C'est un dispositif médical implantable dédié à encapsuler des cellules sécrétrices d'insuline afin de rétablir, de façon physiologique et sans immunosuppresseur, une glycémie normale chez ces patients.

Afin d'amener ce prototype chez l'homme, il est nécessaire de réaliser des études de faisabilité d'implantation, de sécurité et de fonctionnalité du MAILPAN en phases précliniques, c'est-à-dire chez l'animal (remplacement).

Dans une première phase de l'étude pré-clinique, nous avons réalisé l'implantation du MAILPAN et évalué l'impact de ce dernier sur le plan d'intégration fonctionnelle et histologique. Il est nécessaire, dans une deuxième phase de tester sa fonctionnalité sur un modèle diabétique.

Il s'agit d'un modèle expérimental bien connu réalisé par injection d'un médicament (streptozotocine) qui provoque une disparition des cellules pancréatiques sécrétrices d'insuline. Les animaux devenus diabétiques recevront l'implant pancréatique et un suivi clinique sera effectué sur 2 mois au terme desquels l'animal sera mis à mort dans le respect de la directive 2010/63/UE.

Le modèle animal choisi est le minipig (38 animaux utilisés).

Son intérêt réside dans son rapport âge/stabilité pondérale (15mois ; 60Kg), en adéquation avec une prise en charge expérimentale et une étude longitudinale évitant les biais dus à la croissance pondérale chez l'espèce sus scrofa standard.

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum garantissant des résultats exploitables (réduction). Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu : balle de jeu, enfouissement de la nourriture), de soins (le point limite le plus important à contrôler est l'hypoglycémie) et les méthodes utilisées (anesthésie générale, analgésie contrôlée, soins post-opératoires) sont les plus appropriées pour réduire la douleur, le stress ou tout autre dommage intercurrent (raffinement).

2986. Le projet de l'équipe est basé sur l'étude des mécanismes qui causent de l'autisme et des déficiences intellectuelles associées à des changements du nombre de copie dans le matériel génétique humain. L'objectif ultime est de développer des stratégies thérapeutiques pour aider à améliorer les capacités cognitives des patients. Ces maladies rares induisent des pertes d'autonomie importante avec des conséquences pour les familles et la société.

Nous nous intéressons particulièrement au syndrome associé à une déficience intellectuelle correspondant à une micro-suppression de la région génétique déterminée 16p11 comprenant une trentaine de gènes. La variabilité symptomatique de ce type des syndromes chez l'homme rend son étude très difficile. Par ses similitudes du point de vue génétique, physiologique et moléculaire, la souris constitue un modèle de choix pour l'étude des relations entre la présence ou l'absence de gènes et l'apparition d'un caractère phénotypique. Nous avons généré in vivo le modèle murin porteur de cette altération génétique dans la région homologue du génome qui mime les défauts comportementaux humains. Les études réalisées laissent entrevoir une piste d'intervention avec une drogue que nous avons déjà utilisée dans une autre maladie rare avec déficience intellectuelle. Nous avons donc prévu un protocole pour déterminer si cette drogue administrée par voie orale pouvait restaurer des capacités cognitives dans notre modèle souris.

Nous avons réduit le nombre d'animaux utilisés dans ce protocole (120 au total) tout en gardant un nombre suffisant pour une bonne analyse statistique de nos résultats. Le raffinement des expériences va permettre d'éviter au maximum la souffrance des souris. La souris demeure l'animal le plus proche de l'homme comme modèle des maladies génétiques humaines. Cette étude sur les animaux est nécessaire pour déboucher potentiellement sur un nouveau traitement pour cette maladie rare.

2987. Le projet de l'équipe est de comprendre les mécanismes physiopathologiques des déficiences intellectuelles associées à des changements du nombre de copie (par exemple : trisomie 21 ou syndrome de Down) ou autres syndromes (ex : Ring14)

ainsi que des mutations sur des gènes associés à des déficiences intellectuelles. Ces maladies rares induisent des pertes d'autonomie importante avec des conséquences pour les familles et la société.

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 600-800 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. Pour l'étude de ce syndrome nous avons choisi le modèle murin parce que la souris partage beaucoup de systèmes physiologiques avec l'homme.

Au niveau génomique, les gènes portés par le bras long du chromosome 21, se trouvent sur 3 régions de syntenie réparties sur 3 chromosomes différents chez la souris. On retrouve la plus large région sur le chromosome murin16, puis une petite région sur le 17 puis finalement une région sur le chromosome 10. Nous avons généré in vivo 7 modèles murins porteurs de différentes trisomies partielles tout au long du chromosome 16.

Tous ces modèles sont analysés de manière systématique du point de vue morphologique, cognitif et physiologiques afin de mettre en évidence des phénotypes présents dans les pathologies humaines.

Les objectifs sont de:

- 1) Trouver les gènes associés aux différentes pathologies
- 2) Comprendre les origines physiologiques et développementales des pathologies.
- 3) Identifier les voies moléculaires perturbées
- 4) Utiliser ces modèles pour tester des traitements afin d'améliorer les capacités cognitives des patients.

Chaque modèle créé passe dans une série des tests comportementaux allant du moins stressant au plus stressant afin de minimiser le nombre de souris utilisées. Ces tests sont choisis en fonction des phénotypes décrits dans la pathologie humaine associée au modèle. Les souris commencent le premier test à l'âge de 12-13 semaines. Entre 5 et 10 tests sont réalisés pendant une période allant de 5 à 10 semaines. En général, 2 cohortes 30 souris mâles (15 transgéniques et 15 contrôles) sont requises par modèle pour une analyse comportementale complète et 2 cohortes de 30 femelles sont requises afin de répéter les tests dans lesquels un phénotype a été vu afin de valider ce phénotype. La totalité de ces expériences nécessiteront donc l'utilisation de 840 animaux (7 lignées x 120 souris par lignées).

L'ensemble des tests comportementaux n'entraîne pas de stress ou souffrance sévère pour l'animal et les animaux feront l'objet d'un suivi permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur santé. Les animaux présentant des signes de douleur suivant l'échelle de l'expression faciale seront euthanasiés car impropres à une étude comportementale.

La statistique utilisée sera un test ANOVA avec tukey test en post hoc. Notre expérience nous permet d'évaluer à 15 animaux par groupe pour avoir un résultat significatif (30 animaux au total par expérience).

2988. Les pathologies valvulaires aortiques (insuffisance, sclérose ou calcification aortique) représentent la troisième cause de pathologie cardiovasculaire dans les pays occidentaux. Longtemps perçues comme une conséquence du vieillissement et de l'usure mécanique des sigmoïdes, la dégénérescence valvulaire et la calcification aortique sont actuellement considérées comme des pathologies plurifactorielles, comportant un déterminisme génétique indiscutable mais peu caractérisé. Ces pathologies conduisent sur le long terme à une insuffisance cardiaque pouvant être mortelle. A l'heure actuelle, le seul traitement efficace consiste en une réparation ou un remplacement des valves. Ces chirurgies sont des procédures à cœur ouvert, lourdes pour le patient et présentant un fort taux de complications.

Notre étude a pour objectifs de mieux comprendre l'étiologie des valvulopathies en utilisant la souris comme modèle animal d'étude. Pour cela, nous utiliserons des souris ayant une inactivation ou une surexpression d'un facteur de transcription. Nous avons récemment montré que cette protéine était exprimée dans les valves au cours du développement embryonnaire et dans les valves des souris adultes.

Grâce au développement de différentes lignées transgéniques, nous pourrions modifier l'expression de ce gène à des temps spécifiques ou dans des cellules cibles.

Nous analyserons les valves de ces souris au niveau histologique, transcriptomique et protéomique au cours du développement mais également chez la souris adulte. Afin d'étudier la fonction des valves, nous réaliserons des échocardiographies sur les souris adultes grâce à un échographe à haute définition (Vevo 2100) Cet examen d'imagerie médicale est indolore mais est réalisé sous anesthésie générale afin d'assurer l'immobilité de la souris.

Nous espérons que notre étude apportera une meilleure compréhension du développement normal et pathologique des valves et qu'elle permettra de développer des thérapeutiques ciblées qui sont pour le moment inexistantes.

Notre étude se base sur l'analyse de la morphologie et de la fonction valvulaire. Nous utiliserons 10500 souris au cours de notre travail. Nous ne pouvons pas nous passer de l'utilisation d'un modèle animal mais durant l'ensemble de notre étude, nous appliquerons une démarche éthique et respecterons la règle des 3R.

- Les souris utilisées seront hébergées dans un établissement utilisateur agréé et manipulées par du personnel compétent.

- Durant la durée du projet, afin de respecter leur instinct grégaire, les souris seront stabulées par groupe de 5-6 dans des cages dont l'environnement sera enrichi à l'aide de maisonnettes en carton.

- Le développement des techniques d'imagerie à haute définition telles que l'échocardiographie nous permet d'étudier la fonction cardiaque de la souris. Au même titre que ce qui est réalisé chez l'Homme, l'échocardiographie de la souris est totalement indolore. Elle nécessite cependant une anesthésie afin d'assurer l'immobilité de l'animal tout au long de la procédure.

- Chez l'homme, les valvulopathies évoluent vers une insuffisance cardiaque pouvant être létale. Au cours de notre étude, nous ne souhaitons pas suivre les souris jusqu'à l'apparition de signes d'insuffisance cardiaque. Nous suivrons donc quotidiennement nos animaux. L'apparition de signes d'inconfort ou de souffrance (perte d'appétit, prostration, plaies...) nous conduira à sortir l'animal de l'étude et de l'euthanasier.

2989. Ce projet relève de la recherche fondamentale. La transmission inter-espèces de pathogènes au sein du réservoir animal et vers l'homme constitue un risque majeur d'émergence avec un impact important en santé animale et santé publique. Dans la famille des Orthomyxoviridae, le genre Influenzavirus A était jusqu'ici le seul à regrouper plusieurs sous-types de virus ayant des hôtes réservoirs non humain. Des études récentes aux USA et nos travaux préliminaires en France ont permis l'identification d'un nouveau Genre nommé pour l'instant Influenza D qui semble se répliquer chez les bovins réservoirs de ce virus.

La protéine Mx présenterait une activité antivirale vis-à-vis du genre A, qui ne se réplique pas efficacement chez les bovins, à la différence du genre D. Chez la souris et chez l'Homme, Mx interagit avec la nucléoprotéine du virus influenza A.

Nous avons pour hypothèse que l'activité antivirale de Mx1 bovine est plus faible contre le virus influenza D que contre le genre A, ce qui expliquerait la répllication du virus influenza D chez les bovins. L'objectif de ce protocole est de mettre au point un modèle murin pour l'étude du virus influenza D en comparant la susceptibilité de plusieurs lignées de souris. Ce travail permettra de déterminer l'implication de la protéine Mx dans la réponse anti-influenza D, actuellement inconnue, en évitant l'utilisation du modèle animal « naturel » : le bovin.

Au total nous pensons utiliser 165 souris pour cette étude : 90 souris (6 groupes de 15 souris : 10 souris infectées et 5 non-infectées) pour une étude de susceptibilité et 75 souris pour les calculs de dose létale 50 (3 lots avec 25 animaux par lot : 5 souris par dilution de virus, 5 dilutions de virus). Nous n'anticipons pas de signes cliniques importants lors des procédures. Ces animaux seront euthanasiés en fin de projet.

Nous mettrons en œuvre des mesures d'acclimations, d'enrichissement ainsi qu'un suivi quotidien des animaux pour favoriser le bien-être des animaux. Une meilleure compréhension de la réponse de l'hôte face au virus influenza va à terme permettre d'adapter les mesures de prévention et de contrôle de la maladie.

2990. Dans le cadre d'une pathologie attaquant la rétine (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age), les traitements actuels utilisent des anticorps empêchant l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins, par injections intraoculaires. Malheureusement, certains patients s'avèrent résistants et de nouvelles biothérapies doivent être développées.

De plus, il est nécessaire de développer des traitements plus efficaces, permettant d'espacer les injections intraoculaires chez les patients, pour le confort du patient, la diminution des risques d'endophtalmie (0,03% par injection, 0,7% pour un traitement de 24 injections) et la baisse du coût du traitement.

Notre partenaire développe de nouveaux anticorps susceptibles de présenter une efficacité accrue et un effet thérapeutique chez des patients résistants.

Pour tester leur effet thérapeutique chez l'animal, nous allons exposer des souris à de fortes concentrations d'oxygène. Ce modèle reproduit l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins, observée dans la maladie cible.

Le but de ce travail est donc d'évaluer l'effet de différents types d'anticorps pour sélectionner le plus efficace et adapté à un développement clinique.

Dans ce projet, deux étapes sont planifiées : une étude pilote puis une étude de plusieurs anticorps développés par notre partenaire.

L'étude pilote servira à mettre en place le modèle d'exposition à l'oxygène puis réduire l'apparition des nouveaux vaisseaux sanguins à l'aide d'un traitement de référence dont l'effet a été publié à plusieurs reprises.

Dans ce modèle largement utilisé pour cette thématique de recherche, les animaux âgés de 7 jours seront exposés à un taux de 75% d'oxygène pendant 5 jours consécutifs.

Par la suite, ils seront placés de nouveau en conditions normales et recevront une injection dans l'humeur vitrée (compartiment de l'œil compris entre la rétine et le cristallin) sous anesthésie, du composé ou de son véhicule. Après 5 jours, ils seront mis à mort pour pouvoir étudier les nouveaux vaisseaux formés au niveau de la rétine.

Afin de nous former à la technique d'injection intra-vitréenne, nous utiliserons 60 souris pour mettre en place cette compétence de manière robuste.

Si cette étude pilote ne permettait pas de conclure, une nouvelle étude pourrait être envisagée, et ferait l'objet d'un amendement à ce protocole.

Si les résultats sont concluants, les différents anticorps seront testés selon un protocole similaire, afin de mettre en évidence leur capacité à inhiber l'apparition de nouveaux vaisseaux observée dans ce modèle.

Le nombre d'animaux testés lors de chaque protocole sera défini suite à l'étude pilote, afin d'avoir un maximum d'animaux dans la même étude pour réduire le nombre de groupes contrôles

10 anticorps sont prévus dans ce projet, avec 3 doses pour chacun, afin de caractériser de manière approfondie leurs possibilités thérapeutiques.

La voie intra-péritonéale pourra être utilisée pour comparer 1 à 2 anticorps présentant le meilleur profil, et connaître leur efficacité entre les deux voies d'administrations (intra-vitréenne ou péritonéale). En effet, s'il s'avérait possible de traiter les patients par une voie systémique, cela représenterait un gain de confort immense pour les malades.

Des effectifs de 10 animaux par conditions seront ciblés afin d'obtenir des résultats probants et robustes.

Cet effectif correspond au nombre minimum d'animaux nécessaire à obtenir une conclusion statistiquement fiable, au vu de la variabilité documentée pour ce modèle.

Néanmoins, si au cours du protocole, nous constatons une faible variabilité, nous essaierons de réduire le nombre d'animaux expérimentaux autant que possible, afin de suivre les règles des 3R en vigueur, notamment en termes de raffinement et de réduction.

Cette seconde partie pourra ainsi nécessiter l'utilisation d'un nombre maximal théorique d'environ 500 animaux, notamment du fait des groupes contrôles nécessaires en parallèle, pour valider la mise en place de la rétinopathie. Ainsi, le total du projet se fera avec un maximum de 560 animaux.

2991. La trisomie 21 (ou syndrome de Down) est l'anomalie chromosomique la plus fréquente chez l'homme; Cette erreur de répartition du patrimoine génétique conduit à une surexpression des gènes du chromosome 21 humain (Hsa21), perturbant de nombreux systèmes physiologiques, morphologiques et biochimiques. Ces dérégulations se font de manière directe via l'augmentation de la production de protéines du Hsa21, ou indirecte à travers une multitude d'interactions de ces protéines sur l'ensemble du génome. Des modèles murins ont été générés dans le but d'étudier le rôle des différentes régions du Hsa21 impliquées dans les différents symptômes des personnes porteuses de la trisomie 21. Un de ces modèles, la lignée Ts1Yah, présente des altérations de mémoire dans des tests de performance cognitive. Parmi les gènes candidats à ces déficits, le gène codant pour la protéine Cystathionine Beta Synthase (CBS) a été choisi comme gène à plus fort potentiel: des mutations de ce gène sont impliquées dans un retard mental plus ou moins sévère chez l'homme; les voies métaboliques associées à la CBS sont à l'origine de fonctions très importantes dans la cellule. Par des expériences d'effets de dose du gène CBS chez le modèle de souris Ts1Yah, il a été démontré que ce gène était impliqué dans la fonction de mémoire à court terme. Un second modèle surexprimant seul le gène de la CBS a décrit les mêmes déficits de mémoire et d'apprentissage que les souris Ts1Yah, confortant l'hypothèse du rôle prépondérant de la CBS. Le but de notre étude est de trouver des molécules potentiellement inhibitrices de cette protéine qui permettraient de réduire l'activité du surdosage de la CBS dans les tissus, et principalement dans le cerveau. Nous souhaitons, par un traitement chronique, restaurer les performances des souris possédant 3 copies du gène Cbs. Nous avons 2 molécules (Le disulfiram, le clioquinol) dont les effets ont été prouvés par des expériences de croissance in vitro chez des modèles de levure transformées génétiquement (collaboration université de Brest). Ces molécules sont déjà sur le marché et sont préconisées dans le traitement de pathologies du cerveau (Alcoolisme, maladies neurodégénératives).

Nous ne pourrions pas remplacer l'utilisation de modèle animal; Il est nécessaire d'utiliser une espèce capable de mémorisation dans notre projet. Nous testerons chacune des 2 molécules sur 2 lignées de souris référencées dans l'étude de la trisomie 21; nous utiliserons 2 cohortes de 60 animaux, pour chaque lignée de souris, et pour chaque molécule testée. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, la 2e cohorte d'animaux transgéniques ne sera générée que si la 1ere cohorte démontre une activité de mémorisation au cours des tests d'évaluation. Nous générerons donc potentiellement 480 animaux afin de couvrir l'ensemble de l'étude.

Enfin, en termes de raffinement, aucun dommage particulier n'est attendu pour ce projet. Néanmoins, les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien et des points limites éthiques seront appliqués afin d'éviter tout stress ou souffrance.

2992. Malgré une recherche intensive, les glioblastomes sont des tumeurs cérébrales fatales. Le nombre de thérapies efficaces est encore très limité, ceci se traduisant pour les patients par une survie très courte après les premiers symptômes. Ainsi, en dépit d'un traitement conventionnel associant la résection chirurgicale, la chimiothérapie et la radiothérapie, la médiane de survie des patients atteints d'un glioblastome (GBM) ne dépasse pas 15 mois. La résistance aux traitements (chimiothérapies et radiothérapie) de ces tumeurs s'explique en partie par l'action du microenvironnement tumoral (hypoxie et inflammation) des GBM en relation directe avec une vascularisation très hétérogène spatialement mais aussi entre les patients eux-mêmes. Ce constat clinique amène à optimiser ces stratégies thérapeutiques conventionnelles en tenant compte des caractéristiques hypoxiques, inflammatoires et vasculaires des tumeurs. Ainsi, dans la recherche sur l'optimisation des thérapies standards ou dans le développement de nouvelles cibles thérapeutiques, il est nécessaire d'avoir des modèles de glioblastomes précliniques capables de présenter au mieux les caractéristiques de ce microenvironnement tumoral retrouvé chez les patients (niveaux d'oxygénation, d'inflammation et de vascularisation) et ce, afin de mieux comprendre les différences de réponses thérapeutiques observées en clinique.

L'objectif de notre étude est de caractériser par imagerie multimodale (TEP et IRM) l'hypoxie, l'inflammation et la vascularisation, de trois modèles de GBM humains et de confirmer ces résultats d'imagerie en immunohistologie. Après cette caractérisation, des traitements de chimio- et de radiothérapie seront effectués sur les 4 modèles afin d'observer si les différences d'oxygénation, d'inflammation et de vascularisation entre les modèles ont un impact sur la réponse aux traitements. Pour évaluer l'effet de ces traitements sur ces composantes, les imageries seront effectuées avant et après application des traitements. Les études immunohistologiques seront aussi effectuées avant et après applications des traitements. Le nombre d'animaux nécessaire par groupe est de 6 pour l'imagerie et de 6 pour les études en immunohistologie multiplié par les 4 modèles et les 4 groupes de traitement, ainsi le nombre total d'animaux nécessaire est de 192. Le choix du rat immunodéprimés (nude) se justifie par l'utilisation de cellules de GBM humain. La nécessité de l'utilisation du rat dans notre étude vient du fait de l'utilisation de l'imagerie TEP qui ne saurait être réalisée avec un cerveau de souris, celui-ci étant trop petit. Toujours dans un souci de respect de la règle des 3R, l'utilisation de l'imagerie notamment IRM nous permet de pouvoir définir des critères d'arrêt du protocole pour les animaux sans atteindre de signe de souffrance ou de douleur. Ainsi, aucun point limite n'est atteint.

2993. La transgénèse additive est la méthode par laquelle un gène ou un fragment de gène est ajouté au génome d'un organisme vivant. Notre demande concerne la production de lapins génétiquement modifiés produits par addition de gènes permettant la production de protéines fluorescentes dans des cellules particulières de l'organisme. Ces protéines, naturellement produites par des organismes marins (méduses, coraux), n'ont aucun effet délétère. En revanche, leur fluorescence permet de repérer facilement dans l'animal les cellules qui les produisent soit dans les organes prélevés post mortem, soit chez l'animal vivant par des sondes spécifiques posées à la surface de l'organe.

Deux gènes seront ajoutés de façon indépendante dans des animaux distincts. Il est attendu que l'un de ces 2 gènes marque les cellules germinales (futurs gamètes) des gonades et l'autre marque les cellules cibles de l'acide rétinoïque (cellules jouant un rôle important mais encore mal connu dans la différenciation et la croissance de tout organe en développement). Ces marquages permettront de suivre l'évolution de ces cellules au fur et à mesure de la différenciation de l'organe pendant le développement du fœtus pour mieux comprendre les mécanismes de formation des gonades, et donc l'origine de certains défauts observés chez l'animal d'élevage ou chez l'humain. Des souris transgéniques pour ces deux gènes ont déjà été produites par d'autres laboratoires, et n'ont présenté aucun symptôme délétère. Nous devons faire cette expérimentation chez le lapin, car la souris n'est pas un bon modèle pour l'étude des mécanismes de différenciation des gonades et des cellules sensibles à l'acide rétinoïque.

Chaque gène sera ajouté par injection d'ADN dans des embryons unicellulaires récupérés par lavage des voies génitales prélevées après abattage de femelles traitées par traitement de superovulation. 40 femelles "donneuses" seront ainsi euthanasiées pour récupérer 600 embryons. Après injection, les embryons seront transférés dans les voies génitales de femelles "receveuses" traitées hormonalement pour développer une gestation. 40 femelles receveuses seront ainsi utilisées.

Dix à quinze jours après la naissance, les lapereaux seront génotypés; les animaux génétiquement modifiés seront conservés pour générer chacun une lignée par croisement avec d'autres lapins. Les animaux non génétiquement modifiés seront euthanasiés rapidement.

Pour chaque lignée, des embryons et/ou du sperme seront congelés pour conserver la lignée.

Nous prendrons soin à utiliser le plus petit nombre d'animaux en suivant les procédures décrites ici:

- 1- Le traitement de superovulation des femelles permet d'augmenter le nombre d'embryons produits par femelle et donc d'euthanasier le moins de femelles "donneuses" possible.

- 2- Notre objectif est d'obtenir au moins 3 lapereaux génétiquement modifiés pour chaque gène injecté. Dès que ces trois lapereaux seront obtenus, la collecte d'embryons sera arrêtée et aucune femelle ne sera ni traitée hormonalement, ni euthanasiée, ni opérée pour des transferts d'embryons.

- 3- Chaque femelle receveuse pourra recevoir 30 embryons par transfert, nombre classiquement adopté pour cet acte, qui permet d'utiliser peu de femelles tout en obtenant un bon taux de gestation.

Enfin, nous prendrons soin à effectuer les opérations chirurgicales de transfert embryonnaire en raffinant les procédures opératoires (anesthésie, analgésie, soins post opératoires). Le suivi de tous les animaux sera régulier pour détecter toute souffrance.

Les animaux seront tous hébergés dans une animalerie agréée pour cet usage.

2994. La maladie d'Alzheimer est une maladie liée au vieillissement caractérisée par des déficits importants de différents types de mémoire (mémoire à long terme, topographique, épisodique, spatiale, mémoire de travail, etc.). Elle résulte notamment de la perte accélérée de cellules nerveuses, les neurones, et de leurs connections, les synapses, dans les régions cérébrales comme l'hippocampe et le cortex, impliquées dans la mémoire et les fonctions intellectuelles. La neurotoxicité du peptide amyloïde est centrale dans la perte synaptique et neuronale précoce de la maladie. La prévalence actuelle de cette pathologie ne peut qu'augmenter puisqu'aucune solution thérapeutique réellement efficace n'a encore été validée pour préserver ou restaurer les capacités cognitives. L'étude des phénomènes de mémoire nécessitent l'utilisation d'animaux.

Pour ce projet, nous voudrions faire la preuve d'efficacité d'un candidat médicament par immunisation, sur la mémoire de la souris injectée intra-cérébralement avec le peptide amyloïde, produisant une perte permanente de la mémoire. Les animaux seront injectés deux fois (à 15 jours d'intervalle avec soit l'adjuvant soit le composé SYN-021B) par voie sous cutanée. La dernière immunisation se faisant 15 jours avant l'injection cérébrale du peptide -amyloïde. L'injection cérébrale est effectuée en conditions aseptiques et sous anesthésie (raffinement). Suivant une période de rémission, les animaux seront testés dans un test évaluant la mémoire spatiale de travail (labyrinthe en Y) et un test évaluant la mémoire spatiale à long terme (labyrinthe aquatique, dit piscine de Morris). Cette étude comprend 6 groupes d'animaux contenant chacun 12 individus, soit un total de 72 animaux. Nous y ajouterons 3 souris supplémentaires pour palier à la perte potentielle d'animaux lors de la chirurgie. Ce nombre d'animaux est suffisant pour obtenir des résultats exploitables statistiquement, tout en s'assurant de la nonutilisation d'animaux surnuméraires (réduction). Les animaux sont hébergés en cage individuelle après l'injection intracérébrale pour éviter la réouverture de la plaie lors de jeux ou de bagarre dans la cage. Les cages contiennent de l'enrichissement environnemental (raffinement). Ce candidat médicament a été préalablement testés sur la même souche de souris, aux mêmes doses et suivant la même durée de traitement par notre client pour l'évaluation des effets indésirables et n'est donc pas toxiques pour l'animal. Tous les animaux seront mis à mort à la fin de cette étude. Les enjeux socio-économiques du projet sont évidents tant le développement de de la MA impacte les sociétés occidentales. La découverte et la validation de thérapies pour la MA est un des enjeux majeurs pour la communauté scientifique (publique et privée).

2995. La maladie d'Alzheimer est une maladie liée au vieillissement caractérisée par des déficits importants de différents types de mémoire (mémoire à long terme, topographique, épisodique, spatiale, mémoire de travail, etc.). Elle résulte notamment de la perte accélérée de cellules nerveuses, les neurones, et de leurs connections, les synapses, dans les régions cérébrales comme l'hippocampe et le cortex, impliquées dans la mémoire et les fonctions intellectuelles. La neurotoxicité du peptide β -amyloïde est centrale dans la perte synaptique et neuronale précoce de la maladie. La prévalence actuelle de cette pathologie ne peut qu'augmenter puisqu'aucune solution thérapeutique réellement efficace n'a encore été validée pour préserver ou restaurer les capacités cognitives. L'étude des phénomènes de mémoire nécessitent l'utilisation d'animaux.

Pour ce projet, nous voudrions faire la preuve d'efficacité d'un candidat médicament ajouté à la nourriture, sur la mémoire de la souris injectée intra-cérébralement avec le peptide β -amyloïde, impliqué dans la maladie d'Alzheimer et produisant une perte permanente de la mémoire. Les animaux seront nourris avec un aliment standard contenant le composé dix jours avant l'injection cérébrale du peptide β -amyloïde et pendant 15 jours après celle-ci. L'injection cérébrale est effectuée en conditions aseptiques et sous anesthésie (raffinement). Suivant une période de rémission, les animaux seront testés dans un test évaluant la mémoire spatiale de travail (labyrinthe en Y) et un test évaluant la mémoire spatiale à long terme (labyrinthe aquatique, dit piscine de Morris). Cette étude comprend 6 groupes d'animaux contenant chacun 12 individus, soit un total de 72 animaux. Nous y ajouterons 3 souris pour palier à la perte potentielle d'animaux lors de la chirurgie. Ce nombre d'animaux est suffisant pour obtenir des résultats exploitables statistiquement, tout en s'assurant de la non-utilisation d'animaux surnuméraires (réduction).

Les animaux sont hébergés en cage individuelle après l'injection intracérébrale pour éviter la réouverture de la plaie lors de jeux ou de bagarre dans la cage. Les cages contiennent de l'enrichissement environnemental (raffinement). Ce candidat médicament a été préalablement testés sur la même souche de souris, aux mêmes doses et suivant la même durée de traitement par nos clients pour l'évaluation des effets indésirables et n'est donc pas toxiques pour l'animal. Tous les animaux seront mis à mort à la fin de cette étude.

Les enjeux socio-économiques du projet sont évidents tant le développement de de la MA impacte les sociétés occidentales. La découverte et la validation de thérapies pour la MA est un des enjeux majeurs pour la communauté scientifique (publique et privée).

2996. Les infections aux virus de l'herpès HSV-1 et HSV-2 sont très répandues chez les populations humaines et provoquent des infections persistantes et latentes. HSV-1 est généralement responsable d'infection Oro-faciales tandis que HSV-2 cause des lésions génitales.

HSV-1 et HSV-2 sont des virus connus depuis longtemps. Ils peuvent infecter l'homme sans danger pendant toute une vie en restant sous forme dormante (latente) dans les ganglions nerveux. De l'autre côté, ils peuvent se manifester dans les organes génitaux et faciaux puis se propagent facilement chez les sujets ayant des contacts intimes.

La virulence de la primo infection dépend aussi du type d'herpès ainsi que de sa souche mais aussi de l'âge de l'hôte et de son statut immunitaire. Ainsi la primo-infection est plus spécialement asymptomatique chez le jeune enfant. Normalement, la primo-infection est asymptomatique et est un élément crucial dans la limitation de la réplication du virus ce qui permet généralement l'évitement des symptômes. Cependant, quelques individus peuvent expérimenter une infection primaire avec des vésicules d'herpès gingivales et stomacales. Généralement, l'infection par l'herpès génital, qui peut elle aussi être asymptomatique, peut présenter des lésions génitales ulcéreuse accompagnées ou non de symptômes généralisés tels que fièvre et maux de tête. Une infection herpétique peut mener à un herpès cornéen.

Les infections herpétiques se propagent rarement vers d'autres organes. Généralement, seuls les patients immunodéprimés ou les femmes enceintes peuvent présenter des complications plus graves telles que par exemple une méningite. Dans les cas de l'herpès (HSV-1) ou communément appelé herpès labial, les manifestations sont fréquentes sur le pourtour de la bouche ou autour des narines, mais également à l'intérieur de la bouche, au fond de la gorge, sur les gencives, sur les joues ou sur le front, voire les yeux. Pour l'herpès génital (HSV-2), les manifestations se situent principalement près des organes génitaux. Cependant, il est possible de voir une infection au HSV-1 sur les organes génitaux et une infection HSV-2 dans la région faciale. De plus, la persistance du virus est définitive, on reste porteur du virus dans les ganglions sensitifs jusqu'à la mort.

À cet égard, plusieurs approches ont été entreprises pour essayer de trouver de nouveaux traitements antiviraux.

Les analogues de nucléoside tels que l'acyclovir et le ganciclovir sont considérés comme des traitements de choix contre des infections aux HSV. Tandis que la thérapie aux nucléosides est tout à fait efficace contre les infections primaires et les infections muco-cutanées récurrentes.

Les médicaments actuels ne sont pas efficaces pour des infections d'herpès nucléoside-résistantes et surtout pour les individus immunodéprimés.

L'utilisation abondante d'acyclovir et d'autres traitements antiviraux pour la prophylaxie et le traitement des infections de HSV exerce une pression continue sur les populations HSV. Mais, la résistance à l'aciclovir évolue assez rapidement, particulièrement chez les patients immunodéprimés ainsi que chez les patients ayant subi une greffe de la moelle osseuse ou une transplantation d'organes de même que les patients atteints du SIDA. Les formes résistantes sont le plus souvent des virus ayant subi une mutation de leur thymidine kinase ou de leur ADN polymérase.

Par conséquent, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est fortement espéré.

Notre projet s'engage à développer des thérapies antivirales innovantes contre les virus HSV-1 & HSV-2 de l'Herpès. Des études précliniques sont nécessaires et indispensables sur des animaux de laboratoire pour démontrer leurs efficacités et leurs activités biologiques. Nous proposons d'effectuer cette étude d'efficacité sur le modèle de souris BALB/C.

La présente étude est divisée en deux parties :

1. Recherche de la dose maximale tolérée (DMT). Le nombre total de souris utilisées dans ce projet est de 30 souris par essai, pour deux essais par an, donnant ainsi 300 souris sur 5 ans.

2. Etude thérapeutique. Le nombre total de souris utilisées dans ce projet est de 75 souris par essai, pour deux essais par an, donnant ainsi 750 souris sur 5 ans.

Au total, 1050 souris sur 5 ans pour les deux procédures.

Ce projet expérimental permet d'évaluer l'efficacité de nouvelles thérapeutiques. La complexité des mécanismes biologiques, fait que le modèle animal choisi ne peut être remplacé par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. Les molécules antivirales ont fait l'objet d'évaluations d'efficacité sur des lignées cellulaires in vitro avant les essais sur animaux décrits dans ce projet. Toutefois, l'évaluation du rapport entre la dose toxique et la dose efficace sur des virus nécessite le recours à des organismes modèles de l'Homme. Tout au long de ces études in vivo, nous allons respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous limitons aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal. Avant toute expérimentation, un protocole expérimental sera soigneusement rédigé avec des points limites et transmis aux personnels techniques. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de respecter leur bien-être.

2997. Lors de l'analyse transcriptomique entre des malades atteints de la maladie d'Alzheimer et des contrôles, certains gènes différentiellement exprimés ont été mis en évidence. Nous nous sommes particulièrement intéressés au gène Adam30. Adam30 code pour une metalloprotéase. Nous voulons déterminer le rôle d'Adam30 au niveau du tissu cérébral et sur la physiologie de l'animal. Chez l'homme ce gène a été retrouvé dans différentes GWAS de diabète de type 2. Aussi il est intéressant de déterminer le rôle d'Adam30 dans le cerveau chez l'animal. Adam30 fait partie d'une famille de protéine proche des désintégrines de venin de serpent. Ces protéines sont impliquées dans différents processus biologiques tels que les interactions cellulaires, la fertilisation, le développement musculaire et la neurogenèse. Cette étude portera sur un total de 400 animaux. Pour réduire le nombre des animaux nous étudierons les glycémies sur les 2 sexes. De plus nous avons mis au point certains protocoles nous permettant de travailler sur des cellules neuronales et des cellules de la microglie adulte. Pour raffiner nos expériences concernant les procédures 2 et 3, les animaux auront un entraînement une semaine avant la réalisation de l'expérience afin de réduire le stress lors de sa réalisation. Pour chaque procédure des points limites ont été définis. Les animaux sont observés régulièrement afin de vérifier les points suivants: perte de poids, piloérection, dos rond, hypoactivité, démarche anormale. Les observations suivantes: pâleurs des extrémités, automutilation, isolement, léthargie, vocalisation anormale. Nous prendrons des mesures afin de réduire la douleur en fonction de l'état de l'animal une analgésique postopératoire sera administrée si des signes de douleur ou de stress sont présents. Si une perte de poids de plus de 15% chez les jeunes et 20% chez les adultes est observée l'animal sera sacrifié.

2998. L'arthrose est une maladie des articulations synoviales qui, lorsqu'elle devient symptomatique, est responsable de douleur très invalidante tant chez l'homme que chez l'animal. Pourtant, il n'existe à ce jour aucune thérapie efficace, le traitement est uniquement symptomatique avec une prise en charge de la douleur. Par conséquent, il est primordial de développer des recherches innovantes dans ce domaine.

Dans la présente demande, nous allons étudier l'efficacité des nouveaux traitements contre l'arthrose chez les cobayes de souche albinos Hartley. Chez le cobaye albinos Hartley, on constate le développement d'une arthrose spontanée du compartiment médial du genou chez le mâle comme chez la femelle.

Le modèle spontané d'arthrose du genou chez le cobaye présente les mêmes caractéristiques morphologiques et épidémiologiques (l'obésité est un facteur prédisposant chez les deux espèces) que chez l'Homme.

Le présent projet consiste à évaluer l'efficacité ainsi que la tolérance envers le traitement contre l'arthrose chez les cobayes. Il complète un projet antérieur possédant déjà une validation in vitro. Des études in vivo sont indispensables pour caractériser les propriétés des médicaments testés dans les tissus vivants. Nous allons utiliser un modèle expérimental qui développe d'une manière spontanée de l'arthrose chez les cobayes. Afin d'obtenir des résultats statistiquement valables tout en réduisant au minimum le nombre d'animaux, nous allons utiliser 65 cobayes par essai incluant 5 groupes expérimentaux pour constituer un modèle d'étude, en raison de 4 essais au maximum par an, donnant un nombre total d'animaux de 260 animaux par an et 1300 sur 5 ans. Parmi les 5 groupes expérimentaux, il y aura un groupe contrôle qui ne reçoit pas le traitement et les groupes traités avec différentes doses. L'objectif est de déterminer l'effet thérapeutique des molécules testées des groupes traités versus le groupe contrôle. Les traitements seront appliqués par deux principales voies (intra-articulaire et orale). Des examens cliniques des cobayes (comportements, état de genoux, signes cliniques, etc.), Des prises de sang et des analyses histologiques seront effectuées.

Tout au long de ces études in vivo, nous allons respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous limitons aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal. Avant toute expérimentation, un protocole expérimental sera soigneusement rédigé avec des points limites et transmis aux personnels techniques. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Nous appliquons le même protocole et les mêmes règles d'éthiques sur tous les modèles animaux, que ce soit chez le cobaye ou chez d'autres modèles animaux.

2999. Dans la présente demande, nous allons étudier l'efficacité de traitements innovants contre les rongeurs nuisibles (principalement rats et souris).

Les rongeurs sauvages (rats souris) transmettent 70% des zoonoses transmises par ces animaux. Ils endommagent les récoltes, les câbles et les bâtiments et exigent des infrastructures adaptées et les réparations sont souvent onéreuses.

Le besoin de lutter contre la prolifération des rongeurs est clair, urgent et reconnu par la Commission Européenne. Malheureusement, les systèmes classiques (pièges et poisons) ne permettent pas actuellement de limiter le nombre de ces rongeurs nuisibles d'autant plus que ces systèmes représentent un danger potentiel pour l'homme, pour d'autres faunes non nuisibles (animaux de compagnie, oiseau, etc.) et détériorent l'environnement.

Par conséquent, le développement d'autres alternatives de lutte contre les rongeurs nuisibles est impératif.

Dans cette optique, notre stratégie fait usage d'un composé analogue de la vitamine D3 (Cholecalciferol) inoffensif sauf pour les petits rongeurs (rats et souris) afin de limiter leur présence et leur prolifération.

Le Cholecalciferol est un puissant rodenticide fortement toxique pour les petits rongeurs. Il est souvent utilisé comme substance active pour limiter les populations d'opossum dans la Nouvelle Zélande. L'objectif de notre projet est de tester l'efficacité d'un nouveau dispositif d'administration et de nouvelles formulations du produit aux rongeurs nuisibles.

La vitamine D3 est un traitement largement utilisé pour stimuler la croissance osseuse chez l'homme et représente un risque nul pour les humains et les animaux de compagnie.

Cette étude consistera à développer des dispositifs rodenticides innovants à base de Cholecalciferol qui respectent l'homme et l'environnement.

Pour chaque essai, il y aura 4 groupes expérimentaux de 20 animaux par groupes.

- Groupe 1 : 20 (10 males et 10 femelles) Sprague Dawley, traités par le véhicule.

- Groupe 2 : 20 (10 males et 10 femelles) Sprague Dawley, traités par la 1ère dose de molécules testées.

- Groupe 3 : 20 (10 males et 10 femelles) Sprague Dawley, traités par la 2ème dose de molécules testées.

- Groupe 4 : 20 (10 males et 10 femelles) Sprague Dawley, traités par la 3ème dose de molécules testées.

Donc, un essai comprendra 80 rats. Avec une fréquence de 2 essais par an, ce projet utilisera 800 rats sur 5 ans.

Avant une éventuelle mise sur le marché de ce dispositif, des études sont nécessaires sur des animaux de laboratoire pour démontrer leurs efficacités et leurs activités biologiques. Nous proposons de tester l'efficacité de ces nouveaux produits sur le modèle de rat Sprague Dawley dans ce projet étant donné que les méthodes alternatives n'existent pas.

Tout au long de ces études in vivo, nous allons respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous limitons aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal. Avant toute expérimentation, un protocole expérimental sera soigneusement rédigé et transmis aux personnels techniques. Les animaux seront suivis quotidiennement et des points limites appliqués.

3000. Les rongeurs sont régulièrement utilisés pour la recherche pré-clinique dans le domaine de la santé humaine. Ils sont notamment inclus dans des études de pharmacocinétique dont le but est de suivre la concentration d'un produit d'intérêt médical dans le sang au cours du temps.

En tant que sous-traitant de l'industrie pharmaceutique, nous proposons à nos clients de réaliser la phase expérimentale de leurs études. L'enjeu de ce projet est donc la réalisation des études de pharmacocinétique chez les rongeurs, en administrant aux animaux un traitement à tester et en pratiquant ensuite des prélèvements sanguins.

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement de reproduire l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination d'un produit dans l'organisme des animaux, il est indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier un produit.

Ce projet englobe plusieurs études et pour chacune le nombre d'animaux nécessaire sera calculé, il sera toujours réduit au minimum, en tenant compte de la variabilité des résultats attendus. Par ailleurs des études préliminaires aux études de pharmacocinétiques pourront permettre des mises au point de techniques dans le but de diminuer le nombre ou la quantité de prélèvements (par exemple: implantation de cathéter veineux ou techniques de microsampling).

Le mode d'administration des produits sera fonction du produit à tester mais toujours conforme aux recommandations en vigueur et aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les prélèvements sanguins seront toujours réduits au minimum. Ils pourront être réalisés soit sur animal anesthésié au préalable par ponction directe, soit vigile, via un cathéter ou par microsampling (technique permettant de faire des prélèvements de volume sanguin très faible et donc permettant de faire légèrement plus de prélèvements sur le même animal et donc de réduire le nombre total d'animaux utilisés).

Ce type de projet ne nécessitant pas d'hébergement individuel, les animaux seront en collectivité avec un enrichissement du milieu adapté, à l'exception des animaux ayant un cathéter en place (duodéal ou veineux). En effet, ces derniers nécessitent une surveillance plus poussée afin que les animaux ne s'arrachent pas le cathéter entre eux et pour une détection précoce de surinfection ou de douleurs post-opératoires anormales. Donc une attention particulière sera alors portée au raffinement et à l'enrichissement du milieu pour éviter l'ennui : contact visuel et olfactif entre congénères, surface suffisante de l'hébergement, présence de jouets ...

Au total, 10 000 animaux pourront être utilisés en 5 ans dans ce projet.