



**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 (32)

3201. *Escherichia coli* est la bactérie responsable de la majorité des cas d'infections urinaires, l'une des infections bactériennes le plus couramment rencontrées chez l'Homme. Ces infections induites par les *E. coli* uropathogènes (UPEC) sont la cause majeure des bactériémies, et dont l'issue est fréquemment fatale. Elles représentent donc en matière de santé publique un intérêt majeur en terme de gravité et de coût financier. Bien que *E. coli* soit un membre de la microflore intestinale normale de l'homme, les souches uropathogènes se différencient par la présence de nombreux facteurs de virulence. Un problème majeur pour le système immunitaire de l'hôte infecté dans sa relation avec l'agent pathogène est la détection des microbes virulents par rapport aux microbes avirulents constituant sa microflore normale. Nous nous intéressons à deux facteurs de virulence des UPEC, CNF1 et HLYA ayant des effets opposés. CNF1 induit la production de molécules de défense par le système immunitaire de l'hôte infecté en vue d'éliminer la bactérie pathogène. HLYA est une toxine induisant la mort des globules blancs de l'hôte infecté et donc une destruction de ses systèmes de défense. Ces deux facteurs de virulence sont situés dans la même zone du génome de *E. coli* (appelée îlot de pathogénicité) et sont co-régulés.

Le but de ce projet est la recherche de nouveaux moyens thérapeutiques préventifs contre les infections urinaires à *E. coli*. Pour cela, il a été montré qu'un fragment de HLYA (peptide WR, n'ayant aucune activité toxique en lui-même) possédait des propriétés protectrices contre l'effet toxique de HLYA *in vitro*. Nous nous proposons donc d'étudier les effets protecteurs contre l'infection par des UPEC, d'un prétraitement avec ce peptide WR *in vivo*, dans un modèle murin, en fonction de la présence ou non des deux facteurs de virulence CNF1 et HLYA.

Sur la base de nos travaux précédents, et afin de garantir l'obtention de résultats significatifs, des groupes de 10 souris seront traitées avec différentes doses (4 doses + groupe contrôle non traité) de peptide WR, en fonction des données de la littérature, préalablement à une infection par 4 souches d'UPEC : 1) la souche sauvage exprimant les 2 facteurs de virulence CNF1 et HLYA, 2) la souche mutante exprimant seulement CNF1, 3) la souche mutante exprimant seulement HLYA, ou 4) la souche mutante ne possédant aucun des 2 facteurs de virulence.

Afin de mimer la bactériémie induite par les infections urinaires, cette infection sera réalisée par voie intraveineuse à une dose déterminée antérieurement pour ne pas induire a priori de douleur chez l'animal et permettant de suivre l'évolution de la bactériémie. Un suivi du nombre de bactéries présentes dans le sang au cours du temps sera donc effectué par un prélèvement de 5 microlitres de sang à 4h, 24h, 48h et 72h post infection.

Une expérience préliminaire sera réalisée, permettant de tester la toxicité *in vivo* éventuelle des doses de peptide WR utilisées ; 2 souris par doses seront utilisées pour ce test préalable. A l'issue de ce test, après euthanasie, une collection d'organes sera récupérée pour une analyse histopathologique en vue d'un éventuel futur dossier de soumission d'essai clinique. Enfin, au cas où toutes les doses testées seraient toxiques pour les animaux traités, le projet ne serait pas réalisé.

Le projet utilisera donc un maximum de 608 souris Balb/C, chaque expérience étant réalisée en triplicat pour des raisons de validité statistique. Les animaux seront maintenus en cage de 5 dans un environnement enrichi (igloo et tiges en papier), à raison de 5 par cages, conformément aux conditions de l'arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles NOR : AGRG1238753A. Ils seront surveillés quotidiennement par le personnel animalier et à chaque intervention (infection et prélèvements à 4h, 24h, 48h et 72h post infection) par le personnel en charge de l'expérimentation. A la moindre apparition de signes de souffrance (points limites définis dans la grille de score en annexe) le ou les animaux concernés seront euthanasiés.

Ce projet pourrait permettre une meilleure prévention des infections urinaires et des bactériémies induites qui tuent chaque année plus de 10 millions de personnes dans le monde. Egalement, si un effet protecteur était mis en évidence *in vivo*, un nouveau projet serait mis en place pour étudier l'effet curatif d'un traitement par le peptide WR.

3202. Très peu d'instruments sont actuellement disponibles pour la fermeture de pleine épaisseur du tube digestif après résection de tumeur maligne par endoscopie flexible, pour le traitement des fistules ou pour la fixation d'endoprothèse. Il existe des systèmes de clips hémostatiques endoscopiques, des systèmes de clips "over-the-scope" appliqués via des endoscopes flexibles ou encore un système de suture applicable par endoscopie flexible.

Les clips hémostatiques (Figure 1) ont été initialement conçus pour mettre fin à tout saignement par suture mécanique des vaisseaux sanguins. Ces clips sont relativement adéquats pour réaliser une hémostase. Ils sont toutefois difficiles à appliquer sur des brèches de muqueuses. Ils sont fragiles et disposent d'une capacité singulière facilement délogeables, pouvant provoquer une déhiscence tissulaire ou une reprise d'hémorragie.

Les clips "over-the-scope" (Figure 2) appliqués via des endoscopes flexibles sont composés de matériaux à mémoire de forme (Nitinol), montés et placés dans le tube digestif sur l'extrémité de l'endoscope flexible. Ces clips sont solides et larges, mais ils se limitent à refermer des brèches muqueuses de pleine épaisseur pouvant aller jusqu'à 2 cm. Leur application se fait à moitié à l'aveugle et leur contrôle sur la profondeur de pénétration tissulaire est difficile ; de plus, leur retrait est souvent très compliqué.

Il existe un système de suture flexible endoscopique (Figure 3) disponible sur le marché qui permet de refermer de larges brèches muqueuses ainsi que des lésions de pleine épaisseur de la paroi du tube digestif. Ce dispositif est monté sur l'extrémité d'un endoscope flexible, manipulé par une poignée. Le désavantage de cet instrument vient du fait que sa manipulation nécessite une grande expertise et la visibilité au cours de la suture est souvent très limitée, ce qui le rend difficile à utiliser.

Comment vérifier la présence de brèches ou de fistules dans la paroi du tube digestif après une endoscopie flexible interventionnelle ou après une chirurgie par approche laparoscopique? Voici une autre question soulevée par rapport au champ opératoire d'endoscopie flexible qui demeure sans réponse. Il n'existe pas de dispositif sur le marché qui puisse fournir une réponse claire et fiable.

Notre groupe a récemment développé deux systèmes solides et faciles d'emploi pour réaliser hémostases et fermetures de la paroi du tube digestif. Le premier système se dénomme Taurus. (Figure 4) Les résultats obtenus à partir d'études ex vivo et in vivo en utilisant les premiers prototypes ont été très prometteurs. Nous avons également développé un système servant à indiquer la présence de fistules de la paroi digestive, pouvant survenir lors d'une chirurgie endoscopique flexible et ce système se dénomme NOLeak. (Figure 5) En théorie, ce dispositif a la capacité de détecter des fistules de la paroi du tube digestif, comme il a été démontré dans une étude expérimentale en phase aiguë sur modèle animal.

L'objectif de ces séries d'études sur modèle animal consiste à valider les prototypes industriels des dispositifs dans différentes situations cliniques de simulation et à les comparer aux solutions existantes avant la première étude clinique chez l'homme.

Le projet SEAL GAPS remplit les conditions des 3R :

\* Remplacement : Pour tester l'efficacité des dispositifs à l'étude destinés à obtenir une fermeture étanche de la paroi gastro-intestinale, le recours à l'animal vivant est nécessaire. Le porc est un modèle de choix, par sa taille, permettant de tester des dispositifs de taille adaptée à l'homme, et par conséquent, il permet un transfert de technologie plus rapide vers l'application en clinique.

\* Réduction : Ce projet rassemble une série d'applications. Pour chacune d'entre elles, un calcul de l'échantillon nécessaire et suffisant nous a permis d'établir le nombre de cochons par groupe et par application, nous permettant d'obtenir des résultats significatifs. Le total de sujets nécessaires est de 309 porcs au maximum.

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

3203. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant de lutter contre les principales maladies psychiatriques classées dans le groupe des troubles de l'humeur, notamment la dépression et les troubles anxieux. Certaines procédures peuvent également s'avérer utiles comme modèles en lien avec les troubles psychotiques et autistiques.

L'ensembles des procédures utilisées dans ce projet ont été caractérisées de façon extensive dans la littérature scientifique et sont mises en œuvre à grande échelle au sein des laboratoires de psychopharmacologie.

Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substance pharmacologiques sur le comportement animal de façon à prédire leur efficacité clinique. Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre de rongeurs qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 16 500.

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

3204. Les zones côtières sont écologiquement hautement productives mais subissent des pressions environnementales. Parmi ces pressions anthropiques l'hypoxie et la contamination au pétrole sont toutes deux présentes en milieu côtier. Cependant peu d'études jusqu'ici ont montrés l'impact de ces deux pressions anthropiques combinées sur les écosystèmes marins. Notre projet s'attachera à démontrer, chez le bar commun *Dicentrarchus labrax*, l'impact de ces deux pressions anthropiques sur (i) les processus de décontamination, (ii) le stress oxydant, et (iii) au niveau individuel sur le comportement et la capacité métabolique. Ce projet sera donc divisé en 4 tâches :

Tâche 1 : Caractérisation de la cinétique de décontamination, en hypoxie, chez des bars préalablement contaminés au pétrole. Cette phase vise à mettre en avant une prolongation de la contamination dans les écosystèmes hypoxiques.

Tâche 2 : Caractérisation des effets à un niveau sub-individuel via l'étude du stress oxydant et des réponses antioxydantes, en hypoxie, chez des bars préalablement contaminés au pétrole.

Tâche 3 : Caractérisation de la réponse comportementale anti-prédateur chez des bars préalablement contaminés au pétrole.

Tâche 4 : Caractérisation de la capacité métabolique chez des bars préalablement contaminés au pétrole.

Ce projet prendra en compte la règle des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement). En ce qui concerne la règle de remplacement, ce projet nécessite l'utilisation de poissons vivants aux vues des phénomènes biologiques étudiés (cinétique de décontamination, tâche 1), de l'approche visée (physiologie intégrative du stress oxydant, tâche 2) et des niveaux d'organisation biologique étudiés (niveau individuel, tâche 3 et 4). Concernant la règle de réduction, ce projet nécessite un minimum de 394 animaux. En dessous de ce nombre, les résultats ne sont plus exploitables du fait de la forte variabilité interindividuelle des paramètres biologiques qui seront mesurées. L'espèce choisie est le bar commun *Dicentrarchus labrax*, un poisson dont la biologie et la zootechnie sont bien connues et qui est fréquemment utilisé en expérimentation. Pour respecter la règle de raffinement, l'ensemble du projet se déroulera dans des locaux dédiés et isolés, dans des conditions d'élevage respectant les besoins physiologiques des poissons et en utilisant des protocoles qui auront pour objectif de répondre à la question scientifique posée tout en limitant autant que possible le mal-être des animaux.

3205. L'utilisation de greffes de cellules productrices d'insuline est une alternative intéressante pour le traitement du diabète. A l'heure actuelle, des greffes de cellules bêta, productrices d'insuline, provenant de donneurs humains sont déjà utilisées en clinique pour le traitement de patients diabétiques. Toutefois, il y a un manque aigu de donneurs humains, rendant impossible l'utilisation d'une telle thérapie à grande échelle. C'est à ce titre que l'utilisation de cellules bêta issues de pancréas de porcs constitue une alternative intéressante. Un programme de recherche et de technologie a été développé avec succès pour obtenir des cellules bêta productrices d'insuline à partir de porcelets néonataux donneurs. Sur la base de ces résultats positifs, un nouveau projet démarre dans le but : i) de développer un matériau source de haut statut sanitaire à partir de porcs exempts d'organisme pathogène spécifiés (EOPS), conformément aux directives de l'Union Européenne, ii) de comparer le matériau source issu de porcs EOPS avec celui issu de porcs conventionnels, iii) de développer la culture des cellules suivant les Bonnes Pratiques de Fabrication (référence EUDRALEX de l'Union Européenne), iv) de déterminer le meilleur milieu de transport et de conservation pour le matériau source initial (pancréas de porcelets néonataux), et v) de mettre en place des essais précliniques de phase II avec un matériau source de haut statut sanitaire. Ces actions sont prévues afin d'obtenir une approbation d'essai clinique, nécessaire pour une autorisation des premiers tests sur des patients humains d'ici 2018.

Le présent projet a pour but de fournir les cellules de porcelets néonataux pour les études précliniques. Pour ce faire, un maximum de 2000 porcelets sera prélevé à la naissance. Cet effectif a été calculé sur la base d'essais antérieurs pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés en permettant la mise au point d'un produit utilisable. Ces porcelets seront issus par césarienne de 130 truies et mis à mort après anesthésie juste avant le prélèvement des pancréas. Les truies seront opérées sous anesthésie, surveillées à tout moment de l'opération puis euthanasiées avant le réveil. Autant pour les porcelets que pour les truies, les procédures expérimentales ne seront pas source de souffrance puisque les animaux seront anesthésiés lors des manipulations. Dans l'état actuel des connaissances, les cellules bêta ne peuvent être cultivées et doivent provenir de porcelets en raison de la grande similitude entre l'insuline porcine et humaine.

3206. La dourine est une maladie parasitaire contagieuse (transmission par voie sexuelle) qui atteint les équidés avec un taux de mortalité très élevé (en moyenne de 50%). Elle est causée par le parasite *Trypanosoma equiperdum*. Chez un animal atteint de dourine, les symptômes suivants peuvent-être observés : fièvre, œdèmes locaux des organes génitaux et des glandes mammaires, éruptions cutanées, incoordination, paralysie faciale, lésions oculaires, anémie et cachexie. Les signes cliniques de dourine évoluent par exacerbation et rechutes périodiques, et peuvent conduire à la mort de l'animal. A ce jour, il n'existe pas de traitement officiel ni de vaccin pour la dourine et il est préconisé par l'OIE (Organisation Mondiale de la Santé Animale) d'euthanasier les animaux atteints.

*T. equiperdum*, l'agent infectieux de la dourine est très proche au niveau génétique et phénotypique du parasite *Trypanosoma evansi* qui est l'agent infectieux du surra, maladie transmise par des insectes piqueurs pouvant atteindre de nombreuses espèces animales. La question de la différenciation de ces parasites est extrêmement importante du point de vue sanitaire, puisqu'il existe un traitement officiel pour le surra, contrairement à la dourine.

Au niveau du diagnostic de la dourine, les trypanosomes n'étant présents dans le sang qu'à certains moments et en petit nombre, leur identification directe s'avère incertaine. Toutefois, les anticorps dirigés contre *T. equiperdum* sont présents dans le sang des animaux infectés, qu'ils manifestent ou non des signes cliniques. Ainsi, le diagnostic de la dourine repose sur la recherche sérologique d'anticorps dirigés contre *T. equiperdum* par le test de fixation du complément (TFC). Ce test est prescrit par l'OIE, comme unique test pour la détection de *T. equiperdum* dans le cadre d'échanges internationaux. Le manuel terrestre de l'OIE décrit les modalités de réalisation de ce test ainsi que les méthodes de préparation des réactifs biologiques nécessaires à sa mise en place et plus spécialement, la méthode de préparation des antigènes à partir de parasites *T. equiperdum* sur rats. Ainsi, il est nécessaire de disposer d'antigènes de *T. equiperdum* produits à partir de rats pour réaliser le diagnostic de la dourine en suivant les recommandations officielles internationales.

Brièvement, la procédure de production de *T. equiperdum* sur rat consiste à :

i) Inoculer un rat avec *T. equiperdum* ;

- ii) Une fois le maximum de la parasitémie atteint et avant l'apparition de symptômes (3 à 5 jours), euthanasier l'animal et recueillir son sang pour qu'il serve d'inoculum aux autres rats ;
- iii) Inoculer 20 rats à l'aide du sang recueilli sur le premier animal ;
- iv) Mesurer la parasitémie et une fois le maximum de la parasitémie atteint et avant l'apparition de symptômes (après 3 à 5 jours), euthanasier les animaux et recueillir leur sang pour ensuite procéder à la purification des parasites qui serviront à préparer les antigènes.

Ainsi, cette demande d'autorisation à expérimenter sur animaux vivants porte sur la production de parasites Trypanosomes sur rats selon cette procédure afin de :

- produire les antigènes de *T. equiperdum* nécessaires à la réalisation du test officiel de diagnostic de la dourine en vue de leur mise à disposition auprès des laboratoires d'analyse français, européens et mondiaux
- produire des parasites du genre *Trypanosoma* dans le cadre de projets de recherches ayant pour vocation à améliorer les outils de diagnostics de la dourine et à améliorer les connaissances sur la différenciation de *T. equiperdum* et *T. evansi*.

Nous effectuons cette demande pour une durée de 5 ans et pour un maximum de 4 procédures par an. A raison de 21 rats par procédure cela correspond à un maximum de 420 rats sur l'ensemble de la demande. Le nombre de procédures réalisées par an sera déterminé en fonction des besoins en antigènes formulés par les laboratoires d'analyse ainsi que par les besoins de production de Trypanosomes dans le cadre des activités de recherche et d'amélioration du diagnostic menées par notre laboratoire. Si la production de parasites n'est pas nécessaire pour réaliser ces activités, le nombre de procédures ainsi que le nombre de rats utilisés seront réduit d'autant. Dans un souci de raffinement, l'euthanasie des rats a lieu quand le nombre de parasites comptés dans le sang de l'animal a atteint son niveau maximum et avant que les animaux ne développent de signes cliniques. Tout animal présentant le moindre signe d'affaiblissement devra être aussitôt euthanasié.

Le développement d'une méthode de production de parasites *in vitro* est actuellement en cours au sein d'un laboratoire de l'UE mais ces travaux ne sont, à ce jour, pas assez avancés pour permettre leur utilisation dans le cadre légal du diagnostic de la dourine, le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire.

3207. La directive européenne 2005/32/CE et les règlements européens 244/2009, 245/2009 et 1194/2012 incitent à l'amélioration des performances énergétiques de l'éclairage domestique et professionnel. De ce fait, la plupart des lampes à incandescence disparaîtront en 2016 et seront remplacées par des lampes plus efficaces incorporant des diodes électroluminescentes (LED). En 2010 l'ANSES a remis un rapport (Saisine 2008SA0408) indiquant le besoin d'études expérimentales sur la question de la phototoxicité rétinienne de ces dispositifs. En effet, la production de lumière blanche résulte du traitement et de la réémission d'un rayonnement de courte longueur d'onde exposant l'individu à une lumière bleue-violette.

Nous avons montré dans des études antérieures que ces dispositifs sont beaucoup plus nocifs pour la rétine que les anciens systèmes d'éclairage, justifiant expérimentalement les réticences de l'ANSES. Récemment, une nouvelle génération de LEDs blanches dites «GaN sur GaN» est apparue. Ces LEDs utilisent une source dont une partie du spectre se situe dans les UV. En conséquence, aux dangers de la lumière bleue-violette, s'ajoutent ceux des UV résiduels. Le but de ce travail est d'étudier les effets rétinien de la lumière bleue-violette émise par ces LEDs, sur des rétines normales en recherchant essentiellement des lésions de l'épithélium pigmentaire.

Pour ce projet, nous envisageons de soumettre des groupes expérimentaux de 6 rats à plusieurs intensités lumineuses et à plusieurs compositions spectrales et d'étudier sur ces animaux l'effet toxique de l'exposition lumineuse ainsi que la récupération fonctionnelle de la rétine. Ces études porteront à la fois sur les effets toxiques histopathologiques et biochimiques. Ce projet utilisera au total 312 rats wistar mâles.

Des efforts particuliers ont été pris pour le respect de la règle des 3R: il est absolument impossible d'évaluer un effet toxique sur un organe aussi complexe que l'oeil humain autrement qu'en utilisant des mammifères. Toutefois, le nombre d'animaux par groupe expérimental est aussi réduit que possible pour produire des résultats probants sur le plan de la sécurité des sources lumineuses testées. L'inconfort lié à l'exposition lumineuse dans les flux d'énergie considérés est considéré comme léger.

3208. L'allergie alimentaire est devenue un sujet de première importance dans le domaine de la sécurité alimentaire, illustré notamment par l'augmentation importante du nombre d'articles publiés chaque année sur les thèmes «science des aliments» et «nutrition humaine». Malgré cela, les approches intégrant la réponse immunitaire et la transformation des aliments au cours de l'allergie sont absentes. Ce projet aura pour but d'identifier précisément les mécanismes gouvernant le développement et l'orientation de la réaction allergique en relation avec la transformation industrielle du blé et de l'œuf. Les mécanismes de l'allergie ont été étudiés mais des lacunes persistent au niveau des connaissances sur les étapes précoces de la mise en place de la réponse immune dans l'allergie. Il est donc indispensable de déterminer comment les protéines alimentaires, en particulier les protéines de blé et d'œuf (constituants majeurs de notre alimentation), influent sur l'orientation du système immunitaire et la physiopathologie de l'allergie. Ces travaux aideront ensuite à l'élaboration de stratégies visant à réduire l'allergénicité des protéines alimentaires. L'objectif de ce projet est donc de définir de manière précise les mécanismes immunologiques impliqués dans la mise en place de l'allergie et leurs interactions avec les protéines alimentaires chez la souris. Pour ce faire, notre travail nous amènera donc à étudier les mécanismes immunologiques impliqués dans la phase de sensibilisation et de challenge aux allergènes de blé et d'œuf *in vivo*. Ainsi, le projet suivra de façon longitudinale la réaction immunologique : à la 1ère, 2ème, 3ème sensibilisation systémique et au 1er et 2ème challenge oral en

utilisant du blé non transformé (natif), modifié chimiquement par un processus largement utilisé en industrie agro-alimentaire (désamidé), modifié de façon enzymatique (hydrolysé), de l'œuf non transformé (natif) et de l'œuf modifié (agrégé). Le but étant de comprendre comment un processus industriel peut modifier le potentiel allergique de la protéine alimentaire d'œuf ou de blé et créer de nouvelles allergies afin de mieux contrôler la sécurité alimentaire. Ainsi l'utilisation de modèles murins sera nécessaire pour obtenir un modèle approprié permettant d'étudier in vivo et de façon intégrée la maladie humaine. Au cours de cette étude, le principe des 3R sera appliqué afin de réduire, remplacer ou perfectionner l'utilisation de l'expérimentation animale. Il est impossible de reproduire efficacement les systèmes biologiques très complexes et en particulier le système immunitaire uniquement par des systèmes in vitro ou in silico. Les modèles animaux d'allergie alimentaire (au blé et à l'œuf) ont été soigneusement conçus et évalués pour fournir des informations directement pertinentes pour l'application future à l'homme. De plus, ces modèles étant bien établis, ils possèdent alors l'avantage de permettre de réduire au maximum le nombre d'animaux du fait de la connaissance et la précision des paramètres observés. Au cours de ce projet de 5 ans, nous effectuerons des analyses immunologiques et physiologiques à chaque étapes de l'allergie (1, 2 et 3 sensibilisations, 1 et 2 challenges) et pour les 5 allergènes cités (blé natif, blé désamidé, blé hydrolysé, œuf natif et œuf agrégé). Ainsi, pour chaque expériences, 12 souris seront nécessaires : 5 pour les analyses de perméabilité intestinale, 5 pour les analyses immunologiques au niveau intestinale et 2 pour les expériences de visualisation in situ (moins sujette à variations). Par conséquent, nous utiliserons 12 souris/groupes aux 5 étapes de l'allergie avec 5 allergènes soit 300 souris (cf tableau en annexe). Les souris contrôles (non sensibilisées mais challengées avec l'allergène natif) seront regroupées par allergène (1 groupe contrôle pour le blé et un groupe contrôle pour l'œuf) soit 2 groupes de 12 souris avec 5 étapes donc 120 souris. Soit un total de 420 souris. Ces exigences visent à s'assurer que les procédures nécessaires à l'élevage et à l'expérimentation seront exécutées efficacement, avec les soins appropriés afin de minimiser la souffrance des animaux. Vu la quantité d'analyses et le nombre de souris par groupes, le nombre de protocole a été adapté de façon à ce que cela soit réalisable de manière correcte. Ainsi, chaque expérience est réalisée sur 3 souris/groupes et les expériences sont répétées. Néanmoins au vu de la durée de chaque protocole (environ 2 mois plus les analyses), une période de 5 ans à été sélectionnée. Les animaux seront logés dans un environnement avec une humidité relative, une température contrôlée et bénéficieront d'un enrichissement.

3209. Dans les pays occidentaux, l'accident vasculaire cérébral (AVC) est une cause majeure de handicap acquis de l'adulte, la deuxième cause de démence après la maladie d'Alzheimer et la troisième cause de mortalité. L'AVC est souvent responsable de séquelles qui affectent la qualité de vie des patients. Les atteintes peuvent être motrices, sensibles, sensorielles et cognitives (avec notamment des troubles de la mémoire). En outre, les dépressions sont fréquentes. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement de l'AVC en dehors de la thrombolyse et des traitements administrés en prévention secondaire. L'AVC fait donc l'objet de travaux de recherche afin d'évaluer les thérapies potentielles permettant d'en diminuer les conséquences. L'objet de cette procédure est de présenter la technique d'induction de l'AVC par la méthode du filament à des étudiants (pharmacie, science) lors de séances de travaux pratiques prévus dans leur cursus. Le modèle enseigné est un modèle d'AVC par introduction par voie endoluminale d'un filament. Le nombre d'animaux utilisé pour ces enseignements sera maintenu au minimum et un soin particulier sera pris pour vérifier l'absence de douleur chez les animaux, tout signe de douleur entraînant l'injection d'anesthésiques ou le sacrifice de l'animal. Le nombre maximal d'animaux prévu pour ce projet est de 50. Ces enseignements ne peuvent être réalisés en utilisant des méthodes in silico.

3210. La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie chronique inflammatoire pulmonaire. Elle est principalement liée au tabagisme et touche 3,5 millions de français dont 100 000 sont atteints de formes sévères nécessitant une oxygénothérapie. Elle constitue un véritable problème de santé publique et l'OMS estime que d'ici 2020, la BPCO représentera la 3ème cause de mortalité dans le monde. La BPCO se caractérise par une obstruction lente et progressive des voies aériennes (bronchite chronique) et par une destruction des parois alvéolaires (emphysème). L'évolution de la maladie est ponctuée de phases d'aggravation aiguës dénommées exacerbations d'origine virale (grippe par ex) ou bactérienne. Plusieurs protéases provenant des cellules inflammatoires semblent impliquées dans le développement de certains dommages pulmonaires de la BPCO. Les cellules épithéliales des voies aériennes sécrètent une série de protéases de la famille des kallikréines (KLK) dont la fonction demeure inconnue. Notre hypothèse est que certaines de ces protéases pourraient participer à la BPCO. Diverses altérations biologiques observés lors de la BPCO peuvent être reconstitués chez la souris en la soumettant à des expositions aiguës ou chroniques à la fumée de cigarette (modèle de BPCO stable) combinées ou non à des infections virales ou bactériennes (modèle de BPCO exacerbée). Lors d'une étude précédente utilisant ces modèles, nous avons identifié deux kallikréines KLK1 et KLK14 dérégulées après exposition à la fumée de cigarette ou à des infections. Le projet actuel vise à déterminer quels rôles délétères ou protecteurs pourraient jouer ces KLKs dérégulées. Comme les différents agents environnementaux (fumée de cigarette, pathogènes) intervenant dans la pathogenèse de la BPCO ont des modes d'action différents, il est nécessaire d'étudier le rôle des KLKs dans chaque contexte. Cela représente un lourd travail expérimental réparti sur plusieurs années. La planification des expérimentations a été réalisée selon la règle des "3R". Réduire: Le nombre d'animaux pour obtenir des résultats interprétables a été calculé à partir des résultats de notre précédente étude et en intégrant des améliorations réalisées dans nos méthodes d'analyse (mesure de multiples paramètres sur les mêmes échantillons). Les souris utilisées, sauvages et déficientes homozygotes pour une Klk (1 ou 14) seront essentiellement des femelles car il existe un dimorphisme sexuel pour les paramètres étudiés. Nous estimons au maximum à 2812 la progéniture nécessaire à l'obtention des 1072 souris femelles entrant dans le cadre des expérimentations. Raffiner: les instillations par voie intranasale d'agents infectieux ou biochimiques pouvant entraîner une gêne chez les animaux

s'effectueront sous anesthésie générale. Des mesures d'enrichissement sont également prévues afin de garantir au mieux le bien-être des animaux (cabanes, buchettes à ronger, papiers). Remplacer: A la différence des modèles murins qui miment la plupart des symptômes observés chez l'homme, les systèmes in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la maladie. Par contre, nous utiliserons au maximum de tels systèmes pour décrypter les mécanismes d'action des KLKs sur des processus précis identifiés au préalable chez l'animal.

3211. Le paludisme est la maladie parasitaire la plus meurtrière au monde, et reste aujourd'hui sans vaccin efficace et avec de nombreuses résistances aux traitements. Le meilleur moyen de combattre la maladie reste la lutte anti-vectorielle qui passe par l'identification des populations de moustiques ainsi que la détermination de leur statut infectieux quant au Plasmodium (agent causal du paludisme). Les méthodes actuelles d'identification des arthropodes et de détection des agents pathogènes sont longues, nécessitent des connaissances entomologiques et restent coûteuses. Le MALDI-TOF est une technologie de routine pour l'identification des bactéries et a maintenant émergé pour l'identification des arthropodes ainsi que la détection directe de leurs pathogènes associés. Dans ce projet, nous voulons évaluer la capacité du MALDI-TOF à différencier des moustiques infectés ou non par Plasmodium berghei. Les moustiques seront nourris sur des souris rendues parasitémiques.

Les animaux seront hébergés dans des cages appropriées, eau et aliments à volonté. Pour le confort des souris, un enrichissement sera mis en place à l'aide d'igloos et du matériel de nidification pour réduire toute angoisse. Le gorgement des moustiques sera effectué sur des souris sous une anesthésie générale. Les animaux seront surveillés jusqu'à leur réveil. Le statut infectieux des moustiques sera contrôlé par biologie moléculaire et leurs spectres MALDI-TOF seront comparés. Ce projet nécessitera au total 56 souris.

3212. La leucémie lymphoïde chronique (LLC) et le lymphome sont deux maladies du sang. La LLC est la leucémie la plus commune dans le monde occidental, elle affecte principalement des patients âgés et elle est encore incurable sans la transplantation allogénique de cellules souches.

Les lymphomes représentent, quant à eux, le 6ème rang par ordre fréquence des cancers survenant chez les hommes et les femmes ainsi que le 7ème en terme de cause de décès par cancer en France. On diagnostique en France 11 000 nouveaux cas chaque année et près d'un patient sur deux atteint d'un lymphome décède de sa maladie.

Le développement de nouveaux traitements est donc nécessaire. Parmi ceux-ci, les peptides pénétrants (CPP) sont des molécules qui peuvent entrer dans les cellules sans causer de dommages de la membrane, ce qui conduit à leur utilisation proposée à la fois comme vecteurs de délivrance des produits thérapeutiques mais également comme molécule thérapeutique de part leurs propriétés anti-tumorales. L'utilisation de ces CPP est devenue l'une des techniques les plus efficaces pour parvenir à l'accès intracellulaire et compte tenu de leur faible taille, il présente une faible toxicité et un faible effet immunogène. Plusieurs peptides pénétrants qui atteignent le cytoplasme et le noyau ont déjà été identifiés.

Parmi ceux-ci, un CPP a été évalué in vitro sur des cellules tumorales de LLC et de lymphomes ainsi qu'in vivo chez la souris. Les résultats in vivo obtenus ont montré des bénéfices thérapeutiques dans les deux maladies. L'objectif de ce projet d'étudier l'activité thérapeutique de ce CPP. Les modèles animaux utilisés seront soit des modèles de LLC ou de lymphomes humains xénotransplantés chez la souris SCID et la souris nude. Le nombre d'animaux utilisés sera de 96 souris réparties en 60 souris SCID et 36 souris BALB/c nude; afin d'avoir tous les contrôles nécessaires pour valider l'activité thérapeutique du CPP.

L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, de réduction et de raffinement. En effet, les molécules ont été évaluées in vitro dans un premier temps sur cellules fraîches de patients atteints de LLC et sur lignées cellulaires immortalisées (principe de remplacement), le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction) et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux (principe de raffinement).

3213. L'accident vasculaire cérébral (AVC) représente la troisième cause de mortalité et la première cause de handicap acquis de l'adulte dans les pays industrialisés. Il survient à la suite de l'obstruction ou de la rupture d'un vaisseau sanguin et provoque la mort des cellules nerveuses par privation d'oxygène et des éléments nutritifs essentiels à leurs fonctions. A la suite d'un accident ischémique (AIC), deux zones apparaissent dans le cerveau : une zone définitivement nécrosée et une zone moins endommagée, la pénombre dans laquelle les processus de dégradation restent réversibles jusqu'à environ 48h après l'AIC selon les individus. A ce jour les seules solutions thérapeutiques d'urgence en cas d'AIC sont la thrombolyse et la thrombectomie. Cependant cette stratégie thérapeutique ne permet qu'une fenêtre d'intervention limitée à 6 heures post AVC. Passée cette période en absence de recanalisation, la zone de la pénombre devient totalement nécrosée, faute d'afflux sanguin. L'objectif principal de ce projet est de proposer une nouvelle stratégie thérapeutique permettant de ralentir la dégénérescence et de préserver les fonctionnalités des cellules nerveuses de la pénombre afin d'augmenter la fenêtre d'intervention thérapeutique. Parmi les mécanismes impliqués dans la dégénérescence des cellules de la pénombre, une réactivation de certaines enzymes impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire telles que les cyclin-dépendant-kinase (CDK) a été identifiée. Des essais précliniques d'un inhibiteur de la CDK5 ont récemment montré un effet neuroprotecteur à court terme (72 heures) sur les cellules de la pénombre dans un modèle d'ischémie focale transitoire chez le rat par introduction d'un monofilament dans l'artère cérébrale moyenne. Cette étude s'inscrit dans la continuité de ce projet et vise à évaluer les effets de ce traitement à long terme, afin de pouvoir tester cette molécule en phase clinique de développement. Pour cela, nous avons choisi d'évaluer les effets de ce traitement sur un plan fonctionnel, tissulaire et moléculaire dans ce même modèle d'étude. En accord avec les exigences de remplacement, des tests in vitro ont permis de sélectionner la molécule et de définir

une gamme étroite de concentrations à tester in vivo. Une étude pilote réalisée chez l'animal a préalablement permis d'ajuster la dose et de tester différentes voies d'administration en vue de réduire le nombre d'animaux utilisés. Afin de limiter le stress et la douleur des animaux, une période d'acclimatation d'une semaine sera respectée à leur arrivée. Ils seront hébergés collectivement, en milieu enrichi avec un tunnel en PVC. Afin de pallier à la douleur occasionnée par la chirurgie provenant essentiellement de l'incision faite au niveau du cou, de la lidocaïne sous forme de gel sera appliquée.

Une expérience préliminaire réalisée sur 50 rats permettra la mise en place du modèle au laboratoire et l'optimisation du mode de délivrance de la molécule. Pour l'étude d'efficacité de cette molécule sur un plan fonctionnel, 120 rats seront nécessaires afin d'obtenir des données statistiques fiables. 72 rats supplémentaires permettront ensuite d'apporter des éléments d'explication des mécanismes biochimiques et moléculaires impliqués dans les potentiels effets neuroprotecteurs de cette molécule. Au total 242 animaux seront inclus dans ce projet.

Si un effet neuroprotecteur à long terme est avéré in vivo, ce traitement pourra être envisagé comme une solution thérapeutique de l'ischémie cérébrale.

3214. La dépression est la pathologie mentale la plus fréquente. Elle nécessite une prise en charge très longue et sera, en 2030, au plan mondial, une des pathologies les plus importantes en termes de santé et société. En plus du stress chronique, la douleur chronique est un facteur déterminant dans son apparition puisque la co-morbidité douleur chronique/dépression atteint 50%. Nous faisons l'hypothèse que des modifications de la neuroplasticité du cortex cingulaire antérieur (CCA), sous-tendent la dépression induite par la douleur chronique. La douleur chronique sera induite chez les animaux d'expérience par l'insertion unilatérale d'un manchon en polyéthylène autour du nerf sciatique, une méthode classiquement utilisée dans la littérature pour modéliser la douleur neuropathique périphérique chronique. Nous proposons une étude génomique pour rechercher chez l'animal des modifications au niveau moléculaire dans le CCA. Le projet nécessitera 480 souris de 2 lignées génétiquement modifiées: (1) la lignée Thy1-Cre, et (2) la lignée Dlx5/6-Cre, dans lesquelles il est possible de manipuler, respectivement, les neurones excitateurs pyramidaux ou les interneurons inhibiteurs. Le projet sera conduit en respectant la règle des 3R visant réduire chaque fois que possible le nombre d'animaux ainsi qu'à optimiser les procédures. En effet, les expériences seront réalisées en réduisant autant que possible le nombre d'animaux par condition expérimentale mais aussi dans l'optique d'obtenir le maximum d'informations scientifiques par test. Pour cette raison, une même cohorte d'animaux sera étudiée et caractérisée aux niveaux comportemental et émotionnel, puis fera l'objet d'investigations moléculaires. En fin d'expérimentation le CCA sera prélevé chez les animaux sacrifiés pour analyser les modifications au niveau moléculaire. Pour pouvoir raffiner les protocoles, les animaux seront observés tous les jours et leur comportement sera suivi afin de déceler tout signe d'inconfort ou de stress.

Au regard des données de la littérature et de la variabilité phénotypique inter-individuelle, les groupes expérimentaux explorant les comportements anxio-dépressifs liés à la douleur neuropathique seront constitués de 20 souris. Ce projet comporte 6 procédures expérimentales, mais certaines d'entre elles font partie d'un enchaînement et utilisent les mêmes animaux ce qui limite considérablement leur nombre. Seules des souris mâles seront étudiées dans le cadre de ce projet, mais nous prévoyons de conduire une analyse dédiée spécifiquement aux souris femelles dans un futur proche.

3215. La leucémie lymphoïde chronique (LLC) et le lymphome sont deux maladies du sang. La LLC est la leucémie la plus commune dans le monde occidental, elle affecte principalement des patients âgés et elle est encore incurable sans la transplantation allogénique de cellules souches.

Les lymphomes représentent, quant à eux, le 6ème rang par ordre fréquence des cancers survenant chez les hommes et les femmes ainsi que le 7ème en terme de cause de décès par cancer en France. On diagnostique en France 11 000 nouveaux cas chaque année et près d'un patient sur deux atteint d'un lymphome décède de sa maladie.

Le développement de nouveaux traitements est donc nécessaire. Parmi ceux-ci, les peptides pénétrants (CPP) sont des molécules qui peuvent entrer dans les cellules sans causer de dommages de la membrane, ce qui conduit à leur utilisation proposée à la fois comme vecteurs de délivrance des produits thérapeutiques mais également comme molécule thérapeutique de part leurs propriétés anti-tumorales. L'utilisation de ces CPP est devenue l'une des techniques les plus efficaces pour parvenir à l'accès intracellulaire et compte tenu de leur faible taille, il présente une faible toxicité et un faible effet immunogène. Plusieurs peptides pénétrants qui atteignent le cytoplasme et le noyau ont déjà été identifiés.

Parmi ceux-ci, un CPP a été évalué in vitro sur des cellules tumorales de LLC et de lymphomes ainsi qu'in vivo chez la souris. Les résultats in vivo obtenus ont montré des bénéfices thérapeutiques dans les deux maladies. L'objectif de ce projet est triple: Confirmer les résultats nos précédentes études qui démontrent que le CPP a bien une activité thérapeutique; comparer deux doses thérapeutiques du CPP; comparer deux voies d'administration du CPP. Les modèles animaux utilisés seront soit des modèles de LLC ou de lymphome xéno greffés chez la souris SCID et la souris nude. Le nombre d'animaux utilisés sera de 112 souris SCID, réparties en 14 groupes de 8 souris et 72 souris BALB/c nude réparties en 6 groupes de 12 souris afin d'avoir tous les contrôles nécessaires pour valider l'activité thérapeutique du CPP.

L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, de réduction et de raffinement. En effet, les molécules ont été évaluées in vitro dans un premier temps sur cellules fraîches de patients et sur lignées cellulaires immortalisées (principe de remplacement), le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction) et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'anxiété des animaux (principe de raffinement).

3216. La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la leucémie la plus commune dans le monde occidental et affecte principalement des patients âgés. La LLC est encore incurable sans la transplantation allogénique de cellules souches. Le développement de nouveaux traitements est donc nécessaire. Parmi ceux-ci, les peptides pénétrants (CPP) sont des molécules qui peuvent entrer dans les cellules sans causer de dommages de la membrane, ce qui conduit à leur utilisation proposée à la fois comme vecteurs de délivrance des produits thérapeutiques mais également comme molécule thérapeutique de part leurs propriétés anti-tumorales. L'utilisation de ces CPP est devenue l'une des techniques les plus efficaces pour parvenir à l'accès intracellulaire et compte tenu de leur faible taille, il présente une faible toxicité et un faible effet immunogène. Plusieurs peptides pénétrants qui atteignent le cytoplasme et le noyau ont déjà été identifiés.

Parmi ceux-ci, un CPP a été évalué *in vitro* sur cellules tumorales de LLC et *in vivo* chez la souris. Les résultats préliminaires *in vivo* ont démontré un bénéfice de survie des animaux puisque 62.5% des souris sont en vie un mois après l'inoculation de la maladie.

L'objectif de ce projet est triple:

- Confirmer les résultats de la première étude et démontrer que le CPP a bien une activité thérapeutique
- Comparer deux doses thérapeutiques du CPP
- Comparer deux voies d'administration du CPP

Le modèle animal utilisé sera un modèle de leucémie lymphoïde xénogreffée chez la souris SCID. Le nombre d'animaux utilisés sera de 34 souris SCID, réparties en 6 groupes de 4-8 souris afin d'avoir tous les contrôles nécessaires pour valider l'activité thérapeutique du CPP. L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, de réduction et de raffinement. En effet, les molécules ont été évaluées *in vitro* dans un premier temps, (principe de remplacement), le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction) et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'anxiété des animaux (principe de raffinement).

3217. Le diabète est une maladie chronique caractérisée par un taux de glucose élevé dans le sang, l'hyperglycémie. Des hyperglycémies répétées et prolongées entraînent à long terme une altération des nerfs et des vaisseaux sanguins présents dans tout le corps. Ce sont les complications du diabète qui peuvent se traduire par une cécité, des atteintes des pieds pouvant conduire à des amputations, des infarctus et des accidents vasculaires cérébraux, des dysfonctions urinaires ou une insuffisance rénale.

Dans le cadre de notre activité, nous nous intéresserons aux dysfonctions urinaires et à l'insuffisance rénale provoquées par le diabète. Plus de 80% des patients souffrant de diabète présentent des dysfonctions urinaires et plus de 40% des patients diabétiques développent au cours de leur vie une néphropathie diabétique (pathologie multifactorielle).

L'objectif de ce projet sera d'évaluer, chez le rat diabétique, l'effet de candidats médicaments sur les dysfonctions urinaires et sur le développement de la néphropathie diabétique afin de prévenir et/ou traiter les complications rénales et vésicales du diabète. Actuellement, les méthodes alternatives *in vitro* et *ex vivo* permettant d'étudier la pathologie diabétique dans son ensemble (évaluation de la fonction vésicale et/ou rénale) sont inexistantes ; c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est nécessaire.

Il existe différents modèles animaux permettant d'étudier cette pathologie : nous avons choisi l'induction du diabète par injection intraveineuse de streptozotocine, un agent alkylant causant une insuffisance pancréatique chimio-induite (mort des cellules bêta et de toutes les cellules porteuses du transporteur du glucose GLUT2 (cellules du rein, et du foie)). Pour accélérer le développement et l'installation de la néphropathie diabétique et ainsi réduire la durée de l'expérimentation, certains animaux pourront être soumis à une néphrectomie unilatérale une semaine avant l'administration de streptozotocine. Cette procédure fera l'objet d'une mise au point spécifique.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 2280 rats en raison 12 rats par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de 8 animaux inclus), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. En effet, l'induction du diabète provoque une mortalité estimée à 10%. Les animaux seront surveillés pendant toute la durée de l'étude et s'ils montraient un comportement atypique tel que :

- comportement douloureux (prostration, isolement, vocalisation ...)
  - perte de poids élevée (supérieure à 12% mais inférieure à 20% par rapport à son poids initial),
- Ils seraient placés en cage individuelle. De plus, un enrichissement sera mis dans le milieu d'hébergement des animaux qui seront classiquement hébergés 3 par cages.

Nous avons établi une stratégie d'expérimentation nous permettant dans la mesure du possible, d'une part de mesurer la valeur basale de chaque animal (l'animal est son propre contrôle dans le cas de non prétraitement) et d'autre part, d'évaluer avec des cages à métabolisme la fonction rénale et parfois vésicale en récoltant l'urine à différentes temps de façon non invasive pendant toute la durée de l'expérimentation.

Notre stratégie permet donc de réduire sensiblement le nombre d'animaux par groupe et ainsi de réaliser ce projet selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement). Dans le cas de prétraitements, un nombre minimum d'animaux sera utilisé pour réaliser l'étude en respectant la règle des 3 R.

De plus ce projet devra subir une évaluation rétrospective étant donné qu'au moins une des procédures est classée en sévère.

Notre environnement nutritionnel est caractérisé par l'abondance et par la réduction de la dépense énergétique, et nous sommes confrontés à l'émergence de pathologies : obésité, dyslipidémies, diabète etc. Une des réponses à ce challenge est de définir un cadre nutritionnel plus propice au maintien ou au rétablissement d'une santé optimale pour le consommateur.

3218. En France, l'obésité représente une cause importante de maladies cardio-vasculaires (MCV). L'obésité résulte de nombreuses interactions génétiques, comportementales, physiologiques et biochimiques. Elle est associée à une espérance de vie réduite et constitue un facteur de risque indépendant de MCV, principales causes de décès dans le monde. En outre, les patients obèses ont un risque plus élevé d'intolérance au glucose et d'altération de la glycémie à jeun qui évolue souvent vers l'insulino-résistance (IR) et le diabète de type 2. Obésité et IR sont fréquemment associées à l'hypertension, l'hyperhomocystéinémie, la dyslipidémie, la stéatose hépatique d'origine non-alcoolique (NAFLD) et l'inflammation chronique. Ces troubles métaboliques, ainsi que l'obésité, sont regroupés sous le terme de Syndrome Métabolique (MetS). Ils sont influencés par des facteurs génétiques et environnementaux (nutritionnels et/ou hormonaux), qui peuvent être étudiés sur des modèles animaux.

Dans ce contexte, des composés naturels, susceptibles de présenter une activité contre le développement du MetS, peuvent influencer sur l'obésité, la résistance à l'insuline et la NAFLD. Parmi ces composés se trouvent les spirulines enrichies en silicium (Sp-Si). Elles possèdent des effets bénéfiques à plusieurs niveaux puisque elles agissent comme agents cardio-protecteurs, antioxydants et hypo-lipidémisants chez le hamster Syrien doré soumis à un régime athérogène (Etude CIFRE précédente).

Nous proposons donc d'utiliser dans ce projet deux modèles d'animaux pour des études préventive et curative de la Sp-Si. Tout d'abord le rat Wistar (40 animaux utilisés) soumis à un régime obésogène comme modèle préventif. Les animaux présentent au bout de 12 semaines des symptômes qui définissent le MetS humain. Puis le rat Zucker obèse (30 animaux utilisés) comme modèle curatif, recevant un régime standard. Ce modèle génétique d'obésité présente les mêmes caractéristiques que le rat Wistar sur régime obésogène.

Cette étude comportera 7 groupes, composés de 10 animaux chacun, ce qui est la quantité minimale pour avoir des données analysables statistiquement.

Les animaux recevront quotidiennement par gavage intra-gastrique soit de l'eau, soit de la spiruline brute, soit de la Sp-Si. Les animaux seront placés dans des cages en polyuréthane, à raison de 2 rats par cage (40 x 40 cm; 1600 mm<sup>2</sup>), avec de la litière enrichie en copeaux et morceaux de bois ainsi que de la nourriture et eau de boisson ad libitum.

Tous les animaux seront euthanasiés par injection de pentobarbital sodique à la fin des 12 semaines d'expérience, dans le but de réaliser les différents prélèvements tissulaires.

3219. On diagnostique en France 11 000 nouveaux cas de lymphomes chaque année. Les lymphomes représentent par ordre de fréquence des cancers le 6ème rang survenant chez les hommes et les femmes ainsi que le 7ème en terme de cause de décès par cancer en France.

Près d'un patient sur deux atteint d'un lymphome décède de sa maladie. Le développement de nouveaux traitements est donc nécessaire. Parmi ceux-ci, les peptides pénétrants (CPP) sont des molécules qui peuvent entrer dans les cellules sans causer de dommages de la membrane, ce qui conduit à leur utilisation proposée comme vecteurs de délivrance des produits thérapeutiques.

L'utilisation de ces CPP est devenue l'une des techniques les plus efficaces pour parvenir à l'accès intracellulaire et compte tenu de leur faible taille, il présente une faible toxicité et un faible effet immunogène. Plusieurs peptides pénétrants qui atteignent le cytoplasme et le noyau ont déjà été identifiés. Parmi ceux-ci, un CPP a démontré une activité in vitro sur cellules tumorales de lymphomes B humain.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer in vivo l'activité de ce CPP thérapeutique bifonctionnel qui cible spécifiquement les cellules tumorales dans deux modèles de lymphome B humain xénotransgénés chez la souris.

Le nombre d'animaux utilisés sera de 36 souris, 12 souris SCID et 24 souris BALB/c nude, réparties en 6 groupes de 4-8 souris afin d'avoir tous les contrôles nécessaires pour valider l'activité thérapeutique de ce CPP. L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, de réduction et de raffinement. En effet, l'activité de ce peptide a été évaluée in vitro dans un premier temps (principe de remplacement), le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction) et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux (principe de raffinement).

3220. Les tissus périphériques tels que la peau, les intestins, les poumons renferment un réseau complexe de cellules hématopoïétiques parmi lesquelles les cellules phagocytaires mononucléées qui comprennent les cellules dendritiques (DCs), les monocytes et les macrophages. Dans nos précédentes études, nous avons caractérisé phénotypiquement les différentes populations de cellules dendritiques, de monocytes et de macrophages présents dans le derme et le parenchyme intestinal mais les fonctions biologiques de ces différentes cellules restent à découvrir. La diversité de ces populations ne peut pas être générée in vitro. En effet, il est possible de générer des cellules dendritiques à partir de précurseurs in vitro mais souvent leur signature génétique varie drastiquement par rapport aux « vraies » cellules extraites des tissus. Le but du projet est de comprendre les fonctions de ces cellules immunitaires des tissus afin de mieux comprendre les facteurs qui participent à l'immunité périphérique dans l'objectif d'utiliser cette connaissance pour améliorer les traitements et les stratégies vaccinales. Une étude équivalente chez l'homme nécessiterait l'accès à des échantillons d'individus immunodéprimés et nécessiterait des prélèvements invasifs (peau, ganglions drainant la peau). Dans l'impossibilité d'acquérir ce type d'échantillons, l'utilisation de modèles animaux est cruciale pour répondre à nos questions scientifiques. Dans le laboratoire,

nous avons choisi de travailler sur la souris comme modèle animal car nous pouvons facilement les manipuler génétiquement et nous pouvons ainsi développer des modèles animaux dans lesquels nous pouvons contrôler l'expression de certains gènes dans certaines de ces populations de cellules dendritiques, nous pouvons aussi déléter spécifiquement l'une ou l'autre des populations et ainsi mimer des situations d'immunodépressions observées chez l'homme.

A défaut de remplacer l'utilisation du modèle animal, nous réduirons son utilisation au nombre minimal possible. Des groupes de maximum 6 animaux seront utilisés afin de générer des résultats validés statistiquement. Les études seront aussi raffinées dans le sens où une étude donnant un résultat significatif sera reproduite 2 fois afin de valider sa relevance et sa reproductibilité pour une publication tandis que les expériences ne donnant pas de résultats significatifs seront arrêtées. Au total, nous avons estimé que moins de 2500 animaux seront nécessaires pour finaliser l'étude décrite dans le projet.

En fonction de leur statut génétique, les souris seront suivies scrupuleusement par rapport à leur poids, leur comportement et l'aspect de leur peau. Pour toute expérience nécessitant une manipulation de l'animal, ceux-ci seront anesthésiés avec les méthodes autorisées. Lorsque le système immunitaire sera compromis, les souris seront traitées avec des antibiotiques (Bactrim) et des anti-douleurs (ibuprofène).

3221. Ce projet s'inscrit dans un programme de recherche et de développement de molécules ayant pour but de traiter les maladies de peau.

La peau est une barrière anatomique vivante entre le corps et l'environnement extérieur. Elle doit faire face à de nombreuses agressions physiques et chimiques, elle est la première ligne de défense biologique de l'organisme.

La peau est aussi un système de défense immunitaire qui regroupe des acteurs résidents (kératinocytes, cellules de Langerhans, fibroblastes, mastocytes, cellules endothéliales) ou recrutés (leucocytes) et une grande variété de médiateurs (chimiokines et cytokines). Le système immunitaire cutané maintient l'homéostasie, il est responsable de l'activation et de la régulation de réactions inflammatoires normales et pathologiques.

En cas d'agression ou de certaines pathologies cet équilibre peut être rompu et se produisent alors des réactions normales de défense de l'organisme où interviennent les cellules du système immunitaire et des phénomènes inflammatoires aigus ou chroniques s'installent au niveau cutané.

Par sa nature, la peau agit comme une barrière naturelle qui protège de la pénétration d'agents extérieurs nocifs, mais aussi de ceux qui ont une action curative.

Les pathologies de la peau engendrent elles-mêmes des modifications de structure des différentes couches qui constituent la peau (épiderme, derme et hypoderme) favorisant ou interdisant la pénétration d'un principe actif appliqué de manière à endiguer une réaction inflammatoire par exemple.

Le projet décrit ici a donc pour objectif de détailler des procédures expérimentales de pharmacocinétique et de pharmacodynamie préalables au développement des molécules innovantes dans le traitement des maladies de peau.

Pour être efficaces, les molécules doivent pouvoir atteindre leur cible, une fois administrées, les molécules subissent une métabolisation ou une dégradation puis une élimination, les études d'ADME-PK (Admission Distribution Métabolisation Elimination PharmacoKinetic) sont destinées à la caractérisation de ces étapes.

En dermatologie, elles sont communément administrées localement par application de pommades, gels, crèmes, émulsions, ou sprays. Ces différentes formulations sont adaptées en formes et compositions pour faciliter et favoriser la pénétration du principe actif dans la partie de la peau où il sera le plus actif et le plus efficace.

Les natures physico-chimiques des molécules pouvant à terme devenir des médicaments ont conduit les équipes de recherches spécialisées à mettre au point des modèles ex-vivo (à base de biopsies de peau animale : le porc) ou in vitro (à l'aide de peau reconstituée) qui vont mimer le phénomène de passage de la barrière dermatologique pour tester les efficacités des agents de formulation, et par conséquent d'en appréhender l'efficacité des molécules.

Cette étape préalable à l'expérimentation animale au sens strict, réduit considérablement le nombre d'animaux utilisés pour ces développements, ceci en respect de la règle des 3R's qui dicte l'expérimentation animale

Pour approfondir l'évaluation des caractéristiques des produits, l'étape suivante consiste à réaliser l'essai sur un modèle de peau vivante, qui est saine dans le cas d'études de pharmacocinétique (au cours desquelles les effets délétères potentiels sont détectés).

A des points de cinétique « post-doses » pertinents, les animaux seront euthanasiés dans les conditions humaines en vue du recueil de la peau qui sera ultérieurement analysés par des méthodes classique d'histologie ou par des méthodologies innovantes d'imagerie par spectrométrie de masse réalisée sur des coupes histologiques. Ces techniques appliquées à des petits rongeurs (rats et souris dans notre cas) nécessiteront l'emploi de 700 animaux (200 rats et 500 souris) pour la durée de 5 années que couvre ce projet.

3222. Les troubles autistiques sont des troubles développementaux entraînant des perturbations comportementales telles qu'un déficit de communication, des interactions sociales inappropriées et la présence d'une rigidité comportementale. L'étiologie de cette maladie reste encore à déterminer : de nombreux gènes seraient impliqués dans l'autisme et l'expression de cette pathologie est caractérisée par une grande variabilité.

Parmi les modèles murins transgéniques des troubles autistiques, le modèle de l'X fragile, présentant une délétion du gène FmR1 a retenu notre attention. Les travaux réalisés dans l'équipe ont mis en évidence des troubles comportementaux sur le plan social, cognitif et émotionnel associés à des altérations neurobiologiques au niveau dendritique et synaptique, impliquant les canaux BK-Ca. Ces différentes études ont été réalisées sur des animaux élevés dans des conditions standard de laboratoire, sans matériel spécifique pour la nidification qui est considérée comme un environnement positif. Or nous avons montré une

influence importante des interactions gènes x environnement chez nos animaux.. Dans le cadre de nos travaux sur les interactions gènes environnement, nous nous sommes alors penchés sur l'importance de la nidification. En effet, il est possible que la présence de matériel permettant aux souris de construire un nid crée un environnement modifiant le phénotype de nos animaux. L'objectif de notre projet est donc d'étudier l'impact de la présence de matériel permettant la construction du nid (Nestlets, Plexx) dès la détection de la gestation jusqu'à l'âge adulte de la progéniture. Cette évaluation comprendra à la fois les aspects comportementaux et mécanistiques décrits précédemment.

Ce projet comprendra une étude comportementale longitudinale (adolescent et adulte) couplée à une évaluation neurobiologique chez les mâles et les femelles des 2 phénotypes et une étude pharmacologique (BMS-204352, un agent déclenchant l'ouverture des canaux BKCa) chez les mâles des 2 phénotypes. Sur une base de 15 animaux par groupe pour permettre une analyse statistique fiable des données comportementales, on peut estimer qu'il faudra 120 animaux (60 mâles et 60 femelles) pour l'étude comportementale initiale et 120 mâles pour l'étude pharmacologique. Néanmoins, il ne peut être exclu qu'un lot supplémentaire d'animaux doivent être utilisé pour étudier els paramètres neurobiologiques à l'adolescence si nos résultats le justifient (120 animaux). Pour obtenir ces animaux, nous utiliserons des reproducteurs (48 femelles et 24 mâles) et pour réaliser les tests d'interaction sociale, nous utiliserons 40 femelles NMRI (très sociable, blanche et peu vocalisante). Cela représente un total de 472 animaux dont 360 sujets expérimentaux, 40 femelles tests et 72 reproducteurs (le comportement maternel pourra être étudié).

L'étude longitudinale et la réalisation de plusieurs tests sur le même animal permet de réduire considérablement les effectifs dans ce projet.

Par définition, une étude comportementale nécessite l'utilisation d'animaux vivants capables de se comporter. Il n'est donc pas possible dans ce projet de remplacer l'animal par un autre modèle.

Afin de leur assurer les conditions de vie les meilleures possibles, les animaux sont placés dans un environnement calme (peu de bruit, lumière faible...) afin d'éviter tout stress de l'environnement qui perturberait les animaux et donc leur réponse comportementale. Dans le même objectif de la sérénité des animaux, les souris sont manipulées en douceur régulièrement pour les habituer à l'expérimentateur et au test. Aucun des tests réalisés n'est douloureux pour l'animal. L'environnement du test peut être anxiogène et tout est mis en œuvre pour réduire cette anxiété (silence, lumière faible, manipulation, habituation...). Des paramètres comportementaux et physiques ainsi que les points limite correspondants ont été définis, qui permettront d'évaluer au jour le jour le confort et le bien être animal, et d'apporter le cas échéant une réponse adaptée et immédiate, soit par une modification du protocole ou des conditions d'hébergement, soit par l'euthanasie de l'animal.

3223. Ce projet s'inscrit dans le cadre du développement de méthodes de diagnostic et de contrôle des infections à mycoplasmes chez les ruminants causées par *Mycoplasma bovis* et *Mycoplasma agalactiae*. Ces deux organismes sont des pathogènes majeurs responsables de pathologies graves et de pertes économiques considérables en élevage de ruminants à l'échelle mondiale. Malgré cela, les méthodes de diagnostic et de contrôle sont insuffisantes ou inefficaces. Les approches classiques sont en effet confrontées à la grande capacité de variation antigénique de ces organismes. Des données récentes de protéomique et de génomique permettent de proposer une approche innovante basée sur la production de vaccins sous-unitaires et l'utilisation de protéines hautement conservées chez ces organismes. Une stratégie commune peut être envisagée pour ces deux pathogènes qui sont étroitement apparentés d'un point de vue phylogénétique et ont longtemps été considérés comme des variants d'une même espèce. Pour atteindre cet objectif, il est nécessaire de comparer l'antigénicité des protéines identifiées et produire des réactifs sérologiques qui permettront d'étudier l'expression de ces protéines au cours de l'infection chez l'hôte naturel. A l'heure actuelle, il n'existe malheureusement pas d'alternative à l'animal pour tester l'antigénicité d'une protéine et la production de réactifs sérologiques. Afin de réduire la variabilité entre animaux et ainsi le nombre d'animaux nécessaires, une lignée de souris consanguines sera utilisée pour la production de sérums polyclonaux. La procédure d'immunisation utilisée respectera les procédures classiques établies pour cette espèce animale. Afin de produire un volume de sérum suffisant pour la réalisation du projet, le nombre d'animaux prévu pour chaque antigène est de 4 souris (le nombre total d'antigènes à tester est de 30). Le protocole d'immunisation ne génère pas de souffrance chez l'animal. Les prélèvements sanguins sur l'animal vivant seront réalisés sous anesthésie générale. Les animaux seront hébergés dans le respect des normes spécifiées par le décret 2013-118 du 1er février 2013. L'eau et les aliments seront fournis sans restriction. La manipulation des animaux sera réalisée par du personnel qualifié et un suivi clinique sera réalisé par le vétérinaire responsable de l'étude.

3224. L'épilepsie temporale est la forme épileptique la plus fréquente chez l'adulte et elle affecte l'hippocampe, une structure du cerveau qui joue notamment un rôle majeur dans la mémoire et l'orientation spatiale. Les patients souffrant d'épilepsie temporale ont des problèmes cognitifs sévères et le taux de suicide est 25 fois plus élevé chez ces personnes que dans la population générale. Il n'existe aucun traitement à l'heure actuelle.

Notre hypothèse, soutenue par des études précédentes, est qu'une prolifération précoce anormale (astrocytes, cellules souches) est responsable des manifestations épileptiques à long terme. Notre projet a pour objectif d'étudier la possibilité d'utiliser l'irradiation comme approche thérapeutique pour bloquer cette prolifération anormale et améliorer les conséquences à long terme.

Les protocoles mis en jeu ici requièrent un modèle préclinique chez l'animal car aucune méthode alternative (modèle in vitro ou simulation informatique) n'existe à ce jour pour modéliser la complexité du cerveau et l'épilepsie. Le rongeur a été retenu pour ce projet car la neurogenèse chez le rongeur présente de nombreuses similarités avec celle de l'ensemble des mammifères et un modèle d'épilepsie a été établi pour cet animal.

Nous utiliserons un modèle d'épilepsie chez le rongeur adulte. Une injection intracérébrale de kainate, molécule qui a la capacité d'agir comme le glutamate, naturellement libéré dans le cerveau pour stimuler les neurones, provoque des crises épileptiques chez l'animal. L'irradiation du cerveau sera délivrée à faibles doses à l'aide d'un irradiateur médical.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'un élevage agréé. Leur nombre (180 pour 5 ans) déterminé par un test statistique, a été réduit au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences.

L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe garantissent leur bien-être. Leur état de santé sera surveillé tout au long de l'étude, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance.

Une structure de Bien Etre Animal a en charge le suivi et la mise en place d'enrichissement de milieu dans chaque cage d'hébergement pour améliorer les conditions de vie des animaux.

3225. Les personnes accueillies à l'hôpital suite à un traumatisme crânien développent très fréquemment des pneumonies (infections nosocomiales) suite à une baisse transitoire des défenses de l'organisme (système immunitaire). Il est connu que le système nerveux module et influence les capacités de défense de l'organisme mais le(s) mécanisme(s) est (sont) inconnu(s).

Les cellules dendritiques (CDs) sont des cellules de l'immunité ayant un rôle primordial dans le contrôle de l'état d'activation du système immunitaire. Afin d'éviter un emballement de notre système de défense et éviter ainsi l'apparition de maladies inflammatoires chroniques, les CDs ont la capacité d'éteindre l'activation des cellules de l'immunité (rôle anti-inflammatoire).

Suite à un traumatisme crânien, la réponse inflammatoire systémique est suspectée d'induire une modification de l'activité des CDs vers une fonction anti-inflammatoire excessive. Cette réponse anti-inflammatoire excessive pourrait être à l'origine de l'incapacité des malades dans les services de réanimation, à réagir contre une contamination bactérienne expliquant ainsi l'augmentation de leur susceptibilité à l'infection.

Le but de notre étude est de vérifier si la création de lésions cérébrales (retrouvées chez les traumatisés) conduit à l'apparition d'une activité anti-inflammatoire des CDs expliquant l'augmentation de susceptibilité des patients aux infections nosocomiales. Pour cela, 2614 souris seront utilisées au cours de ce projet qui se divise en 3 parties.

La 1ère partie consistera à valider qu'une lésion cérébrale inhibe les fonctions du système immunitaire. Dans la 1ère partie, les poumons, les ganglions lymphatiques, la rate et le sang des souris seront récupérés afin d'étudier le phénotype et les fonctions des NK et des CDs dans ces différents organes.

La 2ème partie évaluera la susceptibilité des souris traitées à l'induction d'une pneumopathie bactérienne. Dans la 2ème partie du projet, lors de l'induction de la pneumonie, les poumons, les organes lymphoïdes et la rate des souris seront prélevés (analyses bactériologiques et immunologiques).

La 3ème partie évaluera le rôle des médiateurs cytokiniques (IL-6 et IL-10) ou cellulaires (Tregs) dans ce phénomène d'immunodépression post-traumatique. Dans la 3ème partie du projet, des traitements déplétifs (anticorps, toxine diphtérique) seront injectés entre le traumatisme et l'induction de la pneumonie.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduite, Raffiner). L'étude de l'influence du système nerveux ne peut se faire que dans un organisme entier. Le nombre de souris a été réduit au minimum possible tout en permettant une analyse statistique fiable. Enfin, le bien-être des souris est surveillé tout au long de l'étude.

3226. Des études épidémiologiques et expérimentales ont conduit à proposer l'hypothèse de l'origine fœtale des maladies de l'adulte. Ainsi, il est aujourd'hui bien admis qu'un environnement fœtal défavorable entraîne une perturbation des fonctions cardiovasculaires.

L'épidémie actuelle d'obésité conduit à une augmentation du diabète maternel au cours de la grossesse. Afin d'étudier les conséquences d'une exposition in utero à un diabète maternel, des rates sont rendues diabétiques par injection de streptozotocine le premier jour de la gestation. Il s'agit d'une substance qui détruit les cellules  $\beta$  du pancréas (productrices d'insuline) et qui entraîne donc un diabète de type 1 chez ces femelles. Dans ce modèle, nous avons clairement identifié l'exposition in utero au diabète maternel comme facteur de risque du développement d'une hypertension artérielle à l'âge adulte. Pourtant nous n'observons aucun remodelage constrictif hypertrophique des vaisseaux en réponse à cette augmentation de pression (mécanisme nécessaire pour normaliser les contraintes subies par la paroi artérielle lorsque la pression augmente mais devenant néfaste à plus long terme : fatigue du cœur). Ceci pourrait refléter une adaptation du vaisseau suite à une reprogrammation de la fonction vasculaire affectant également les mécanismes de remodelage au cours de la vie fœtale.

Nous souhaitons étudier les mécanismes du remodelage artériel suite à l'exposition in utero au diabète maternel afin de mieux appréhender la reprogrammation vasculaire en réponse à des modifications d'environnement fœtal. Grâce à un modèle de variations chroniques de débit induites par microchirurgie vasculaire (de 7 jours à 1 mois), il est possible d'induire un remodelage soit excentrique (lorsque le flux augmente), soit constrictif (lorsque le flux diminue). Ainsi nous comparerons les effets des variations chroniques de débit chez les rats mâles et femelles âgés de 3 mois (stade pré-hypertensif) issus de mères contrôles (CMO) et diabétiques (DMO).

Les objectifs de ce projet sont de chercher :

- 1) à étudier les effets de l'exposition in utero au diabète maternel sur le remodelage vasculaire induit par des variations chroniques de débit sanguin dans les artères mésentériques et la carotide,
- 2) à étudier les modifications des voies de signalisation impliquées dans le remodelage vasculaire au cours de l'exposition in utero au diabète maternel (voie du monoxyde d'azote, induction des transglutaminases)

3) à rechercher des différences mâles/femelles (rôle des œstrogènes)

Notre modèle animal est le rat Sprague-Dawley. Pour l'expérimentation, nous utiliserons 220 animaux au total avec 12 groupes expérimentaux pour chaque durée de ligature (CMO et DMO mâles et femelles après 7 ou 21 jours de ligature des artères mésentériques ou 1 mois de ligature de la carotide) composés chacun de 12 animaux provenant d'au moins 4 mères différentes + 15% de mortalité + 33% pour combler le déficit de femelles / aux mâles observé lors de précédentes études (soit  $144+15\%+33\%=220$ ).

Pour l'accouplement, nous utiliserons 25 animaux au total avec 5 mâles et 20 femelles (en moyenne 2 portées par femelle, une portée CMO et une portée DMO).

Nous appliquons la règle des 3 R:

REMPACER

Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle in vitro

REDUIRE

Nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Le nombre d'animaux par groupe est de 12 (taux de décès d'environ 15%). Il reste donc un nombre minimal pour pouvoir obtenir des résultats statistiquement significatifs. Nous utiliserons le test de student

RAFFINER

Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 4) suivant l'âge et le poids des animaux de plus les cages sont enrichies par des jouets (rouleau sopalin, copeaux)

Les animaux sont surveillés au quotidien par le personnel de l'animalerie et le poids est suivi 2 fois par semaine

3227. Les pathologies cardio-vasculaires restent de loin la première cause de mortalité et le vieillissement de la population en accroît l'importance. Si les médicaments disponibles restent à visée essentiellement symptomatologique, c'est que peu d'études sont menées sur les territoires vasculaires impliqués, composés de microvaisseaux, les veines.

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes produites par une chaîne de réactions partant du cholestérol et constituées de 18 atomes de carbone. Chez les femelles, ces hormones sont secrétées principalement par les cellules de la granulosa des follicules ovariens, par le corps jaune et le placenta. Il a été mis en évidence que l'estrogène est impliqué dans le remodelage vasculaire.

Les veines sont le dernier segment du réseau vasculaire et ramènent au cœur le sang sortant des capillaires. Outre leur rôle de conduits du sang entre les tissus et le cœur, les veines ont aussi la fonction de réservoir de sang. Parce qu'elles sont capables de stocker du sang, on les appelle souvent des vaisseaux de capacitance.

Nous étudions in vitro et in vivo ces veines dans des modèles de rats. L'originalité de notre approche réside dans notre capacité à corréler la fonction (variations de diamètre ou de structure) aux activités enzymatiques (phosphorylation) et aux localisations de protéines impliquées dans les voies de transduction étudiées. Nos travaux visent à déterminer les voies de transduction impliquées dans la réponse des veines aux facteurs mécaniques, principalement le débit (force de cisaillement) ainsi que leur interaction avec les systèmes neuro-humoraux et immunologiques produits dans la paroi vasculaire stimulée par les forces de cisaillement. Nous augmenterons le débit sanguin au niveau de petit (veine mésentérique) et gros (veine jugulaire) calibres de façon chronique par micro chirurgie sur des rats Wistar mâles et femelles.

Soit 400 animaux au total:

-Remodelage veine mésentérique 1 mois: 10 mâles + 10 femelles contrôles + 10 femelles ovariectomisées + 10 femelles ovariectomisées et resupplémentées en E2

-Remodelage veine jugulaire 1 mois: 10 mâles + 10 femelles contrôles + 10 femelles ovariectomisées + 10 femelles ovariectomisées et resupplémentées en E2

-Remodelage veine mésentérique 1 semaine: 10 mâles + 10 femelles contrôles + 10 femelles ovariectomisées + 10 femelles ovariectomisées et resupplémentées en E2

-Remodelage veine jugulaire 1 semaine: 10 mâles + 10 femelles contrôles + 10 femelles ovariectomisées + 10 femelles ovariectomisées et resupplémentées en E2

-Réactivité veine mésentérique: 10 mâles + 10 femelles contrôles + 10 femelles ovariectomisées + 10 femelles ovariectomisées et resupplémentées en E2

-Réactivité veine jugulaire: 10 mâles + 10 femelles contrôles + 10 femelles ovariectomisées + 10 femelles ovariectomisées et resupplémentées en E2

-Expression protéique veine mésentérique: 10 mâles + 10 femelles contrôles + 10 femelles ovariectomisées + 10 femelles ovariectomisées et resupplémentées en E2

-Expression protéique veine jugulaire: 10 mâles + 10 femelles contrôles + 10 femelles ovariectomisées + 10 femelles ovariectomisées et resupplémentées en E2

-Expression génique veine mésentérique: 10 mâles + 10 femelles contrôles + 10 femelles ovariectomisées + 10 femelles ovariectomisées et resupplémentées en E2

-Expression génique veine jugulaire: 10 mâles + 10 femelles contrôles + 10 femelles ovariectomisées + 10 femelles ovariectomisées et resupplémentées en E2

Le nombre d'animaux par groupe est de 10 car les chirurgies peuvent induire des décès (taux de décès d'environ 25%). Il reste donc 7 animaux par groupe, nombre minimal pour pouvoir obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Le laboratoire est évalué tous les 4 ans par les instances compétentes (Inserm, CNRS...) sur les publications. Le projet en lui-même sera évalué pour publication par des revues à comité de lecture.

Le laboratoire est évalué tous les 4 ans par les instances compétentes (Inserm, CNRS...) sur les publications. Le projet en lui-même sera évalué pour publication par des revues à comité de lecture.

Nous appliquons la règle des 3 R:

**REPLACER**

Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle in vitro, car le remodelage vasculaire met en jeu le système immunitaire et hormonal

**REDUIRE**

Nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Le nombre d'animaux par groupe est de 10 car les chirurgies peuvent induire des décès (taux de décès d'environ 25%). Il reste donc 7 animaux par groupe, nombre minimal pour pouvoir obtenir des résultats statistiquement significatifs. Nous utiliserons le test de student

**RAFFINER**

Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 4) suivant l'âge et le poids des animaux de plus les cages sont enrichies par des jouets (rouleau sopalin, copeaux)

Les animaux sont surveillés au quotidien par le personnel de l'animalerie et le poids est suivi 2 fois par semaine

3228. Les pathologies cardio-vasculaires restent de loin la première cause de mortalité et le vieillissement de la population en accroît l'importance. Si les médicaments disponibles restent à visée essentiellement symptomatologique, c'est que peu d'études sont menées sur les territoires vasculaires impliqués, composés de microvaisseaux, les veines.

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes produites par une chaîne de réactions partant du cholestérol et constituées de 18 atomes de carbone. Chez les femelles, ces hormones sont secrétées principalement par les cellules de la granulosa des follicules ovariens, par le corps jaune et le placenta. Il a été mise en évidence que l'estrogène est impliqué dans le remodelage artériel.

De plus, La thrombospondine 1 (TSP-1) est une glycoprotéine produite in vitro par de nombreux types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les monocytes, les macrophages, et certaines lignées cellulaires tumorales. TSP-1 est impliquée dans différents processus tels que l'adhésion cellulaire, l'angiogenèse, les métastases cancéreuses, l'inflammation, l'athérosclérose, l'hémostase et la thrombose.

Les veines sont le dernier segment du réseau vasculaire et ramènent au cœur le sang sortant des capillaires. Outre leur rôle de conduits du sang entre les tissus et le cœur, les veines ont aussi la fonction de réservoir de sang. Parce qu'elles sont capables de stocker du sang, on les appelle souvent des vaisseaux de capacitance.

Nous étudions in vitro et in vivo ces veines dans des modèles de souris sauvage (Swiss), n'exprimant pas la protéine TSP-1 (TSP1 KO). L'originalité de notre approche réside dans notre capacité à corrélérer la fonction (variations de diamètre ou de structure) aux activités enzymatiques (phosphorylation) et aux localisations de protéines impliquées dans les voies de transduction étudiées. Nos travaux visent à déterminer les voies de transduction impliquées dans la réponse vasculaire aux facteurs mécaniques, principalement le débit (force de cisaillement) ainsi que leur interaction avec les systèmes neuro-humoraux et immunologiques produits dans la paroi vasculaire stimulée par les forces de cisaillement.

Nous mettons en œuvre la règle des trois R :

Remplacer : Nous ne pouvons pas utiliser de modèle alternatif pour nos expérimentations.

Réduire : Le nombre minimum d'animaux est utilisé afin d'obtenir des données exploitables d'un point de vue statistique.

Raffiner : Les éventuelles modifications de rythme cardiaque et respiratoire seront observées pour évaluer la souffrance, la détresse et l'inconfort des animaux pendant l'intervention chirurgicale ou le traitement hypertenseur. La réponse nociceptive des animaux, régulièrement testée en cours d'intervention (toutes les 15 minutes), conduira si elle est positive, à la ré-administration d'une dose d'agent anesthésique. Pour chaque souris, l'état général de l'animal est vérifié chaque jour par du personnel d'animalerie qualifié. Si des signes apparents de douleur apparaissent (animal prostré, isolé...) une dose d'analgésique est injectée en sous-cutanée. Si le poids diminue de 10% par rapport au poids de départ, l'animal est sacrifié. Les animaux sont maximum 5 par cage suivant leur taille et leur poids. Nous utiliserons 384 animaux pour le projet. Leur milieu est enrichi par des jeux (tuyau, maison). Ils ont accès à l'eau de boisson et à la nourriture ad libitum.

Les objectifs du projet sont de chercher à comprendre :

1. s'il existe un remodelage induit par une augmentation chronique du débit sanguin dans les veines
2. le mécanisme du remodelage veineux : rôle de la TSP-1
3. différences mâles/femelles : rôle de l'estrogène
4. la réactivité veineuse et les facteurs qui influencent la fonction des veines
5. à trouver des traitements pharmacologiques leur permettant, le cas échéant, de s'adapter à ces variations chroniques de débit sanguin.

3229. Les muscles sont des tissus essentiels au sein de l'organisme. Ils représentent plus de 40 % de la masse corporelle et permettent le maintien de la posture, le déplacement et la respiration. Ils constituent également une réserve protéique importante.

Le muscle est un organe qui est capable de s'adapter et de répondre aux sollicitations, notamment pendant la croissance et avec l'entraînement. Avec l'âge ou l'immobilisation, la masse et la force musculaire décline, et de nombreuses pathologies conduisent à une atrophie musculaire, comme par exemple l'anorexie, le cancer et certaines maladies infectieuses (SIDA, Tuberculose) ou auto-immunes (Lupus érythémateux disséminé, hépatite auto-immune).

La fonte de la masse musculaire peut conduire à une diminution de la qualité de vie, à des chutes et des fractures osseuses, et a, de ce fait, un coût socio-économique important. L'identification de molécules permettant de maintenir la masse musculaire est donc un enjeu majeur des industries pharmaceutiques. Cependant, celle-ci reste difficile, car les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la masse et de la force musculaire sont encore mal caractérisées.

Les androgènes sont connus pour leur activité anabolique sur les muscles, mais leur utilisation en clinique est limitée par manque de spécificité tissulaire. En effet, ils induisent notamment la prolifération des cellules épithéliales prostatiques, et favorisent donc le développement de cancers de la prostate. D'autre part, les traitements anti-androgéniques sont les seuls efficaces actuellement pour les cancers avancés de la prostate, mais induisent une atrophie musculaire, ce qui affaiblit les patients.

Il est donc souhaitable de développer des anti-androgènes ayant de fortes activités antiprolifératives, sans affecter les muscles, pour le traitement du cancer de la prostate, et d'analogues d'androgènes pour stimuler la force musculaire, sans augmenter les risques d'induire des cancers.

Notre objectif principal dans ce projet est de définir les mécanismes par lesquels les androgènes régulent la masse et les fonctions musculaires chez des souris de type sauvage et des souris mutantes chez lesquelles le récepteur des androgènes (AR) est invalidé dans différents types cellulaires des muscles.

Afin de clarifier le rôle des androgènes dans la physiologie musculaire, des expériences permettant de déterminer la force, l'endurance, le métabolisme, et la régulation de la masse musculaire par différentes hormones seront réalisées.

REMPACEMENT: Etant donné que la masse et les fonctions musculaires sont contrôlées par divers facteurs, tels que la charge mécanique, la stimulation nerveuse, le stress, l'état nutritionnel et certaines hormones, notamment les androgènes, il est indispensable de travailler sur l'organisme entier.

REDUCTION: Afin de limiter le nombre d'animaux, des souris ayant subi des expériences non invasives telles que la mesure de force par exemple, seront réutilisées pour effectuer des tests sur l'implication de certaines hormones dans la régulation de la masse musculaire. Ces études seront répétées au maximum 8 fois sur 3 différentes lignées de souris, étant donné que nous souhaitons réaliser des études à différents âges. Pour effectuer des analyses statistiques solides, chaque étude sera réalisée sur un maximum de 8 souris par condition expérimentale. Vu notre capacité d'élevage et d'analyse, nous étudierons en moyenne 20 souris par semaine toutes lignées confondues, c'est à dire environ 1000 souris par an.

RAFFINEMENT: Si une des expériences peut avoir des conséquences sur le bien être de l'animal, des mesures seront prises (utilisation d'analgésique, complémenté l'eau de boisson en sel, suivie du réveil et des points de chirurgie après anesthésie,...) pour améliorer la vie de l'animal.

3230. Les leucémies sont des cancers affectant les cellules du système immunitaire. Elles peuvent être classées en plusieurs types, en fonction du type de cellule immunitaire qu'elles représentent, et des anomalies génétiques qu'elles portent. La nature de ces anomalies est étroitement liée à l'agressivité de la leucémie. Nous étudions la fonction du gène IKZF1, codant pour le facteur de transcription Ikaros qui est souvent perdu dans certaines leucémies appelées leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B). De nombreuses études récentes ont montré que cette anomalie génétique est souvent présente dans les leucémies de mauvais pronostic. Il est donc important de mieux comprendre les effets biologiques de ces mutations, pour pouvoir identifier des stratégies thérapeutiques visant les voies biologiques affectées.

Notre objectif est de comprendre pourquoi les leucémies ayant perdu le gène étudié, IKZF1 sont de mauvais pronostic. Pour faire ça, nous analyserons les effets de la réintroduction d'Ikaros dans des cellules leucémiques murines (exprimant l'oncogène BCR-ABL et où Ikaros est absent) après injection ces cellules leucémiques à des souris. Cette analyse in vivo est nécessaire pour déterminer dans un contexte physiologique si la restauration de l'activité d'Ikaros peut avoir un effet thérapeutique. Le remplacement par des techniques in vitro n'est plus possible à ce stade du projet.

En parallèle, nous analyserons l'effet d'Aiolos, un autre membre de la famille dans des expériences similaires. La comparaison des activités d'Ikaros et d'Aiolos devrait largement aider à identifier les effets spécifiques à Ikaros qui sont importants pour inhiber le développement de leucémies.

En plus, nous analyserons l'effet des inhibiteurs de l'oncogène BCR-ABL in dépendance d'réexpression Ikaros et ces mutants. Dans cette expérience, des souris sont injectées avec des cellules leucémiques (BCR-ABL+, + ou - Ikaros) et traitées avec les inhibiteurs de BCR-ABL. Cette expérience nous permet à analyser les voies moléculaires qui sont responsables pour le mauvais pronostic des cas leucémiques ayant perdu le gène IKZF1.

Nous espérons que les résultats de toutes ces expériences permettront d'identifier des voies moléculaires qui pourront être ciblées pour des approches thérapeutiques.

Toutes les expériences sont réalisées en groupes répétés 2 à 3 fois. Si les résultats obtenus sont significatifs après 2 expériences nous n'effectueront pas de troisième expérience de transplantation. Nous utiliserons 105 souris pour l'ensemble de ce projet (de 3 à 9 par groupe selon les procédures), cet effectif permettant une conclusion basée sur des tests statistiques.

Enfin, afin de respecter au mieux le bien-être des animaux, ces derniers seront suivis de près et des points limites seront établis (comme l'atteinte d'une anémie trop importante par exemple) pour réduire au minimum toute souffrance chez nos souris.

3231. La réaction inflammatoire est une réponse d'un organisme à des stimuli de danger tels que la présence d'agents pathogènes envahissant ou des débris relargués par des cellules endommagées.

En réponse à de tels stimuli, des protéines appelées NLRP3, impliquées dans le système immunitaire inné, s'agrègent entre elles et avec d'autres protéines pour former un complexe appelé inflammasome NLRP3. D'autres protéines vont activer ce complexe qui en activera d'autres, entraînant au final l'inflammation.

Une mutation dans le gène codant la protéine NLRP3 entraîne une auto activation de l'inflammasome NLRP3 et provoque ainsi une réaction inflammatoire qui n'a pas lieu d'être. C'est cette mutation qui est à l'origine d'une maladie autoinflammatoire, le Syndrome Périodique Associé à la Cryopyrine (CAPS). Pour l'heure aucune donnée n'est disponible dans la littérature concernant l'inhibition des PKDs pour traiter les patients atteints de CAPS ou de maladies inflammatoires liées à l'inflammasome NLRP3.

REPLACEMENT: Nous avons pu montrer, in vitro, que l'inhibition de certaines protéines (les Protéines Kinases D (PKDs)) bloque l'activation de l'inflammasome NLRP3. Néanmoins, cette observation doit être confirmée et validée dans un système biologique complexe.

La souris étant un modèle étudié et validé dans le domaine de l'inflammation, nous comptons l'utiliser en combinant les approches génétiques et pharmacologiques.

Nous prévoyons d'utiliser 1764 souris en totalité.

Les animaux seront soumis à des procédures qui sont des modèles d'inflammation. Il s'agit de l'injection de Lipopolysaccharide (LPS) dans le péritoine et de la technique chirurgicale de ligature et ponction du caecum (LCP).

Ces procédures entraînent une réponse inflammatoire sévère. Différents paramètres de l'inflammation seront mesurés à l'issue de ces procédures. Elles seront réalisées sur des animaux contrôles, des animaux porteurs de différentes mutations sur les gènes codant pour NLRP3 et les différentes PKDs, en présence ou non de différents inhibiteurs des PKDs, afin de voir si ils peuvent réduire, voire bloquer, la réaction inflammatoire.

RAFFINEMENT: afin de réduire à son minimum la souffrance induite par le sepsis, des traitements antalgiques puissants à base de dérivés morphiniques seront administrés préventivement et curativement aux animaux testés. Des points limites seront également fixés, au-delà desquels l'expérience sera arrêtée et les animaux sacrifiés.

REDUCTION: Afin de réduire le nombre d'animaux nous appliquerons des protocoles déjà établis, la LPC sera réalisée sous anesthésie gazeuse par du personnel compétent, évitant ainsi les pertes dues à la chirurgie par elle-même et à la mise au point des protocoles. Le nombre d'animaux doit cependant être suffisant pour permettre une comparaison statistique de la survie des différents groupes de souris par la méthode de Kaplan Meyer et le test du logrank. Les niveaux des marqueurs d'inflammation entre les différents groupes seront comparés par le test statistique « test de Student t non apparié ».

3232. L'objectif du projet et d'étudier le rôle de 240 gènes impliqués dans des maladies humaines, au travers une analyse des effets de la mutation de ces gènes sur les différentes fonctions physiologiques (neurologiques, comportementales, cardiaque, respiratoire, sensorielle et métabolique).

Pour procéder à cette étude, des souris mutantes pour le gène d'intérêt sont générées et étudiées par groupe de 20 animaux (10 mâles +10 femelles), afin d'obtenir une puissance statistique suffisante pour l'étude. Les animaux, seront soumis à une batterie de tests de phénotypage, permettant de déterminer l'impact de la mutation sur les fonctions physiologiques majeures et sur l'état de santé de l'animal.

Par ailleurs, dans le cadre du consortium international (IMPC), le choix des lignées à étudier est fait en coordination avec les autres partenaires afin d'éviter toute redondance quant à l'analyse des souris mutantes pour un gène dans 2 centres différents.

Réduction: Afin de répondre à l'une des exigences des 3R (Réduction), une cohorte de souris contrôle (souris sauvage), sera phénotypée en même temps que 2 cohortes de souris mutantes (2 lignées différentes), ce qui permet de diviser le nombre des contrôles par 2. Donc, le nombre totale d'animaux qui seront utilisés : 7200 souris (240\*20=4800 souris mutantes et 120\*20=2400 souris contrôles)

Raffinement: 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. Toutes les procédures pouvant être stressantes seront réalisées sous anesthésie générale afin de réduire tout stress à son minimum.

3233. Le mot cancer, qui vient d'un mot latin signifiant « crabe », désigne une prolifération anormale des cellules. Presque tous les tissus de notre organisme peuvent être affectés par ce dérèglement dont les causes, les évolutions et les conséquences sont très diverses.

Le cancer n'est pas une maladie unique, mais un groupe de maladies où des altérations génétiques successives ont conduit des cellules initialement normales à une croissance anormale et incontrôlée.

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde, à l'origine de 7,4 millions de décès en 2004, soit 13% de mortalité mondiale. D'après les projections, leur nombre devrait augmenter pour atteindre, 12 millions en 2030 à l'échelle mondiale.

Dans le cadre de ses activités de recherche pour l'industrie pharmaceutique, notre entreprise initie des programmes de recherche afin d'identifier des candidats médicaments contre le cancer. Les molécules agissant sur les cibles d'intérêts sont sélectionnées en fonction de leurs activités dans des tests cellulaires in vitro et de leurs paramètres pharmacocinétique in vitro et in-vivo.

Nous mettons en place un processus de sélection des molécules via des tests cellulaires ou non-cellulaires in vitro. Ces tests permettent de réduire considérablement le nombre de composés à tester chez l'animal.

Les composés présentant le potentiel le plus intéressant sont testés sur des modèles animaux relevant de pathologies humaines. Nous utilisons des animaux immunodéficients sur lesquels peuvent se développer des lignées cellulaires cancéreuses humaines. Ces cellules cancéreuses seront greffées sous la peau des animaux ou de façon chirurgicale dans les organes cibles de cancer. Les animaux greffés seront traités avec des molécules actives ou des molécules de référence. L'efficacité des molécules sera évaluée en mesurant l'évolution de la taille des tumeurs et en mesurant différents biomarqueurs. Les animaux greffés seront observés par des techniciens responsables d'études et par le personnel formé de l'animalerie. Ces animaux seront mis à mort au plus tard aux points limites déterminés dans chaque procédure.

Compte tenu de l'expérience acquise dans ce domaine, nous prévoyons d'utiliser environ 8640 souris sur 5 ans, répartis sur les différents protocoles, en fonction des molécules à tester.

Les molécules seront évaluées dans les procédures multiples d'activité anti-tumorale et de pharmacocinétique. En raison de variabilité individuelle de croissance de cancer et de l'activité des molécules le nombre des animaux par groupe sera d'environ de 8-10 animaux, soit 70 animaux par étude. Nous avons prévu de réaliser 40 procédures multiples par an.

Toutes les dispositions nécessaires en matière d'hébergement, d'observation et de soins aux animaux sont prises afin d'assurer les meilleures conditions de vie aux animaux. Les interventions invasives et faiblement invasives seront réalisées sous anesthésie. L'analgésie pharmacologique sera utilisée après toutes les interventions chirurgicales.

3234. Le lymphome est une forme de cancer qui touche plus de 100 000 personnes en France. Il provoque le décès de près de 5000 personnes par an, ce qui en fait le 9<sup>e</sup> cancer en terme de mortalité.

Les anticorps (Acs) jouent un rôle important dans la défense immunitaire contre les agents pathogènes. Les Acs monoclonaux sont des outils thérapeutiques efficaces pour le traitement du cancer et des maladies auto-immunes notamment grâce à leur forte spécificité vis-à-vis de leur cible et à leurs propriétés pharmacocinétiques uniques.

La plupart des Acs du répertoire immunitaire d'un individu sain sont dirigés contre les agents pathogènes. Cependant, une partie de ces Acs ont la capacité de lier des petites molécules pro-inflammatoires, relarguées à l'extérieur des cellules lorsque celles-ci sont lésées. La capacité de ces Acs à interagir avec ces molécules pourrait être un mécanisme de régulation physiologique de l'homéostasie de l'organisme. Nous avons précédemment montré que la liaison de certaines de ces molécules aux Acs circulants a la capacité de conférer à ces Acs de nouvelles spécificités de liaison à l'antigène, et ainsi d'étendre leur potentiel de reconnaissance antigénique. Ce phénomène est corrélé à une augmentation de l'activité anti-inflammatoire des Acs. Le rôle physiologique de ce phénomène n'est pas élucidé.

De plus, la propriété qu'ont certains anticorps de se lier à une large variété de petites molécules pourrait être exploitée comme base de stratégies pour la libération ciblée de substances thérapeutiques à des sites précis de l'organisme.

Nous avons démontré *in vitro* que des Acs monoclonaux thérapeutiques utilisés actuellement en clinique pour le traitement de cancer peuvent se lier à ces molécules. Le Rituximab est un Ac chimérique anti-CD20, utilisé avec succès pour le traitement de différents types d'hémopathies B malignes. Nos résultats *in vitro* montrent que le Rituximab peut se lier à des petites molécules pro-inflammatoires et que cette interaction change son répertoire de reconnaissance antigénique. Nous avons également observé que cette liaison est corrélée à une augmentation de l'activité cytotoxique du Rituximab sur une lignée de lymphome B *in vitro*. Nos résultats nous incitent à étudier leur pertinence *in vivo*.

Dans le but d'évaluer le rôle de la liaison des petites molécules pro-inflammatoires et l'élargissement du répertoire d'antigènes reconnus sur l'efficacité thérapeutique d'un Ac anti-CD20 tel que le Rituximab, nous utiliserons un modèle murin de lymphome : des cellules de thymome de souris exprimant le CD20 humain seront injectées chez des souris qui seront ensuite traitées par un anticorps de souris anti-CD20 humain. Nos données préliminaires *in vitro* indiquent que l'Ac anti-CD20 se lie à ce type de molécules pro-inflammatoires et acquiert un potentiel de reconnaissance antigénique plus large, faisant ainsi de cet Ac un candidat idéal pour étudier comment cette liaison peut moduler l'activité thérapeutique des Acs anti-cancer. Nous utiliserons ce modèle également pour évaluer la capacité de l'Ac anti-CD20 à délivrer spécifiquement des composés cytotoxiques aux cellules de lymphome. Les résultats obtenus seront importants pour la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques avec les Acs monoclonaux.

Pour ce projet de 5 ans, nous aurons besoin de 180 souris C57Bl/6. Pour la réalisation de cette étude, nous regrouperons les expérimentations dans le but de restreindre le nombre d'animaux pour les groupes contrôles. Nos études *in vitro* nous encouragent à poursuivre cette étude *in vivo* dans un modèle expérimental de lymphome, toutefois, l'étude sera interrompue si les expériences initiales invalident l'hypothèse de travail. L'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et de tunnels en cartons).

3235. La sclérose en plaques est une maladie engendrant des troubles neurologiques et cognitifs graves causée par une inflammation auto-immune au niveau du système nerveux central. Cette maladie touche environ 80 000 personnes en France, plus particulièrement les trentenaires pour lesquels elle est la première cause de handicap sévère non traumatique (les premiers symptômes apparaissant à l'âge de 30 ans en moyenne). En dépit d'une recherche intensive dans ce domaine, il n'existe pas de traitement efficace de cette maladie.

Les anticorps (Ac) jouent un rôle important dans la défense contre les agents pathogènes. Une fraction des Ac, présents chez les individus sains, a la capacité de lier différents signaux de danger. Ce sont des molécules pro-inflammatoires, potentiellement toxiques et de faible poids moléculaire qui sont relarguées à l'extérieur des cellules en cas de lésions cellulaires ou tissulaires. La capacité qu'ont certains Ac du répertoire immunitaire d'interagir avec ces signaux de danger

pourrait jouer un rôle régulateur dans l'homéostasie de l'organisme. Nos travaux précédents ont démontré que la liaison d'un signal de danger aux Ac a la capacité de leur conférer de nouvelles spécificités de liaisons aux antigènes, ce qui leur permet d'accroître leur potentiel de reconnaissance antigénique. Cette augmentation de capacité de liaison des Ac aux antigènes corrèle avec l'acquisition d'un fort potentiel anti-inflammatoire, comme il l'a été démontré in vitro.

Le rôle physiologique des Ac capables de lier des signaux de danger n'est pas bien élucidé. Le relargage extracellulaire de certaines petites molécules se produit uniquement à la suite d'états pathologiques accompagnés par une lésion cellulaire / tissulaire étendue et une inflammation sévère. Il a été démontré que certains signaux de danger, lorsqu'ils sont libérés, ont un potentiel pro-inflammatoire puissant et exacerbent l'inflammation, ce qui contribue à la pathologie.

Les modèles animaux sont indispensables à une meilleure compréhension des mécanismes de la maladie et au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, les interactions complexes entre les cellules du système immunitaire et du système nerveux central ne peuvent pas être modélisées de manière adéquate in vitro. Le modèle le plus largement utilisé pour les études expérimentales de la sclérose en plaques est l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (experimental autoimmune encephalomyelitis – EAE) chez la souris.

Nos études préliminaires nous permettent de supposer que les Ac capables de lier des signaux de danger peuvent avoir un intérêt thérapeutique dans la sclérose en plaques. Ainsi, le but de ce projet est d'évaluer le potentiel thérapeutique de ces Ac dans un modèle murin d'EAE. L'effet thérapeutique de ces Ac peut être médié par deux activités : (1) capture des molécules pro-inflammatoires qui sont relarguées du compartiment intracellulaire en cas d'inflammation aiguë et (2) acquisition de propriétés anti-inflammatoires du complexe signaux de dangers-Ac. La complexité de la pathogénèse de la sclérose en plaques implique l'utilisation de systèmes in vivo pour l'évaluation de nouvelles thérapies. Si la thérapie Ac s'avère efficace, elle pourrait être à la base d'études translationnelles qui contribueraient à améliorer la prise en charge de la sclérose en plaques.

Pour ce projet de 5 ans, nous aurons besoin de 265 souris C57BL/6. Nous avons strictement suivi le principe des 3 R durant la conception de ce protocole. Ceci correspond au nombre minimal d'animaux qui nous permettra d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Un criblage in vitro sera réalisé pour sélectionner les Ac monoclonaux les plus efficaces et qui seront ensuite utilisés pour les expériences in vivo. Les procédures expérimentales sont optimisées pour d'abord déterminer les concentrations optimales d'Ac injectées chez un petit nombre de souris. Cela permettra de réduire le nombre de souris pour les expériences comparatives. L'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et de tunnels en cartons).

3236. Le lymphome est une forme de cancer qui touche plus de 100 000 Français (atteints ou guéris). Il provoque le décès de près de 5000 personnes par an, ce qui en fait le 9e cancer en terme de mortalité.

Les anticorps (Acs) jouent un rôle important dans la défense immunitaire contre les agents pathogènes. Grâce à leur forte spécificité vis-à-vis de leur cible, ainsi que leurs propriétés pharmacocinétiques uniques, les Acs monoclonaux sont de plus en plus utilisés en thérapie anti-cancéreuse.

Lors de lésions tissulaires, ou au niveau des sites inflammatoires, des agents endogènes (molécules oxydatives de faibles poids moléculaires) peuvent être libérées in vivo. Les propriétés de certains Acs peuvent être modifiées suite à l'exposition à ces mêmes agents. Ainsi, certains des Acs monoclonaux thérapeutiques actuellement utilisés en clinique peuvent changer leur réactivité antigénique après exposition à ces molécules endogènes oxydatives de faible poids moléculaire. Les Acs thérapeutiques sont fréquemment utilisés dans des pathologies qui sont accompagnées de dommages cellulaires ou d'inflammation telle que le cancer. Lors de leur administration, les Acs thérapeutiques pourraient donc très probablement être exposés à des agents qui changeraient leurs propriétés de liaison à l'antigène, avec des conséquences non prévisibles sur leur efficacité thérapeutique.

Le Rituximab est un Ac chimérique anti-CD20 qui est largement utilisé en clinique pour le traitement des hémopathies B malignes. En dépit de ses excellentes propriétés thérapeutiques, le Rituximab n'est pas toujours efficace. Il a été démontré in vitro que l'exposition du Rituximab à des molécules oxydatives de faibles poids moléculaires induit l'acquisition de nouvelles réactivités antigéniques. Nous souhaitons désormais comprendre comment cette exposition affectera les propriétés thérapeutiques du Rituximab.

Nos résultats in vitro menés avec une lignée cellulaire de lymphome B ont montré que l'exposition du Rituximab à des molécules endogènes oxydatives de faible poids moléculaire est corrélée avec une augmentation de la cytotoxicité médiée par les molécules du complément. Pour étudier l'efficacité thérapeutique du Rituximab ou d'autres Acs anti-CD20, le modèle expérimental classique consiste à réaliser la xénogreffe de lignées cellulaires humaines de lymphome non-Hodgkinien chez des souris présentant un déficit immunitaire combiné sévère (SCID), dépourvues de lymphocytes T et B.

Nos résultats in vitro nous incitent à étudier leur pertinence in vivo. Pour ce faire, nous allons induire, après administration de Rituximab ou d'un Ac contrôle, un environnement reflétant de manière pertinente des conditions de dommages cellulaires. Le modèle in vivo est le seul moyen de déterminer comment les conditions pathologiques peuvent modifier les propriétés thérapeutiques du Rituximab dans le contexte d'un organisme complet.

Pour ce projet de 5 ans, nous aurons besoin de 210 souris SCID. Pour la réalisation de cette étude, nous regrouperons les expérimentations dans le but de restreindre le nombre d'animaux pour les groupes contrôles. Nos études in vitro nous encouragent à poursuivre cette étude in vivo dans un modèle expérimental de lymphome, toutefois, l'étude sera interrompue si les expériences initiales invalident l'hypothèse de travail. L'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la

réglementation et adapté en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et de tunnels en cartons.

3237. L'ataxie autosomique récessive cérébelleuse 2 (ARCA2) est un syndrome héréditaire rare qui se caractérise par une ataxie cérébelleuse progressive débutant dans l'enfance, parfois associé à une intolérance à l'exercice, un déficit intellectuel léger, ou des crises épileptiques. Le syndrome est dû à des mutations du gène ADCK3, un gène qui semble avoir un rôle dans la biosynthèse de l'ubiquinone (Coenzyme Q10). Les patients ARCA2 présentent en effet un déficit en CoQ10. A ce jour, nous ne connaissons pas les voies physiopathologiques impliquées dans cette maladie, ce qui empêche de comprendre l'hétérogénéité des symptômes chez les patients. Par ailleurs, aucune approche thérapeutique n'est disponible pour ARCA2.

Nous avons généré dans le laboratoire un modèle murin de la pathologie par mutation du gène ADCK3. Ce modèle reproduit plusieurs symptômes associés à ARCA2 et les symptômes chez la souris (phénotypes) sont modérés et lentement progressifs, se développant entre 5-40 semaines. Par ailleurs, des données biochimiques suggèrent un défaut métabolique et un déficit en CoQ10 dans divers organes. Ces souris constituent donc un bon modèle pour comprendre la physiopathologie de la maladie et pour tester des approches thérapeutiques.

L'objectif de notre projet est de continuer la l'étude des symptômes dans ce nouveau modèle, et notamment de comprendre les voies physiopathologiques impliquées dans le phénotype métabolique que nous observons. Les défauts métaboliques que nous avons identifiés peuvent provenir du muscle, du pancréas, du foie ou du tissu adipeux brun. Pour déterminer si le tissu adipeux brun est impliqué, nous évaluerons la thermorégulation des souris ADCK3-/- . Afin de déterminer la contribution de chaque organe dans le phénotype, et de déterminer le rôle d'ADCK3 dans les différents tissus, nous générerons des souris conditionnelles avec la mutation ADCK3 dans le tissu adipeux, le muscle, le foie ou le pancréas en utilisant des souris transgénique utilisant la Cre recombinase sous un promoteur tissu-spécifique.

REDUCTION: Pour les analyses du phénotype, la mise en culture et toutes les analyses histologiques, sanguines et moléculaires, un nombre total maximal de 640 souris sauvages et 640 souris mutantes sera utilisé soit un total de 1280 souris. Ceci correspond au nombre minimum requis pour avoir des résultats statistiquement significatifs dans nos différents tests, en effet nous utiliserons 10 souris par groupe, effectif optimisé en ce sens.

REMPLACEMENT: L'utilisation de cultures cellulaires primaires permet en partie de réduire le nombre d'animaux, notamment pour les myoblastes et les fibroblastes puisque ce sont des cellules qui se divisent. Par ailleurs, l'utilisation de cultures primaires permet de réduire les procédures effectuées sur l'animal, et de diminuer le nombre d'animaux générés pour les explorations biochimique et de biologie moléculaire.

RAFFINEMENT: Enfin une attention particulière sera portée aux animaux développant une faiblesse musculaire avec notamment la mise à disposition de nourriture gélatinifiée dans la cage, de plus pour toute procédure expérimentale pouvant induire une quelconque souffrance animale une analgésie sera utilisée.

3238. Notre institut a pour mission de créer des lignées de souris génétiquement modifiées, de produire des cohortes d'animaux en vue de les phénotyper, ainsi que de redériver des lignées de souris à partir de matériel congelé ou frais (sperme et embryons congelés, sperme et embryons frais). Toutes ces techniques demandent un transfert d'embryons (de 0.5 jour à 3.5 jours) par voie chirurgicale chez une mère-porteuse. Ainsi, ce projet ne peut se réaliser que chez la souris, aucun REMPLACEMENT par une technique alternative n'est possible.

RAFFINEMENT:

La technique utilisant le TCET (transcervical embryo transfert) est une méthode de transfert non-chirurgical d'embryons au stade de 3.5 jours. Cette technique utilise une sonde permettant de déposer, par la voie vaginale, des embryons au stade de 3.5 jours.

Cette méthode de transfert d'embryons serait avantageuse par rapport à la méthode chirurgicale et applique totalement la règle des 3R:

-Remplacer la chirurgie de transfert d'embryons au stade blastocyste par une technique de transfert d'embryon non invasive par la voie naturelle à l'aide d'une sonde;

-réduire la douleur, la souffrance et le stress chez les animaux d'expérience pendant et après le transfert d'embryons ;

- réduire le temps nécessaire au cours de la procédure de transfert d'embryons ce qui améliore la récupération post-anesthésie;

-Pas besoin de surveillance post-opératoire, pas de plaie ;

D'un point de vue pratique, le bien-être des animaux sera respecté tout au long du projet. Toute procédure stressante ou douloureuse sera réalisée sous anesthésie générale.

-Taux élevés et stable de gestation et de naissance, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés.

REDUCTION:

Pour la réalisation de ce projet de transfert de blastocystes par voie naturelle à l'aide de la sonde TCET , un maximum de 100 souris sera utilisé. De plus, cette technique permettant d'obtenir des taux plus élevés de gestation et un meilleur taux de natalité, le nombre de femelles mères-porteuses utilisées sera réduit par rapport aux techniques chirurgicales classiques.

3239. La séparation maternelle (SM) est un stress périnatal permettant de reproduire la symptomatologie de la prématurité observée en clinique. Nous avons observé que les animaux exposés à la séparation maternelle présentaient une hypersensibilité à la douleur comparativement aux animaux contrôles et une mauvaise adaptation au stress à l'âge adulte. Les mécanismes qui sous-tendent cette hypersensibilité ne sont pas encore bien définis.

De nombreuses études ont montré le rôle de l'ocytocine et de la vasopressine, deux peptides synthétisés dans l'hypothalamus, dans les comportements sociaux, et dans le contrôle de la douleur. Dans la mesure où le stress de séparation maternelle perturbe fortement le comportement social des animaux ainsi que leurs réponses à la douleur, nous avons émis l'hypothèse que le système ocytocine/vasopressine pourrait mal fonctionner chez ces animaux.

Le but de cette étude est alors d'étudier l'implication de l'ocytocine et de la vasopressine dans les hypersensibilités douloureuses induites par la SM et dans les réponses à la douleur mesurées après exposition à un stress à l'âge adulte. Les travaux se dérouleront sur deux ans et utiliseront 180 rats Wistar. La règle des 3R sera mise en œuvre à travers les procédures suivantes : raffinement par un hébergement en cages collectives enrichies (nid + bâtons) après sevrage et maintien des fratries après séparation selon les sexes. Bien que ce projet nécessite une approche invasive (implantation de cathéters d'injection), le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux tout au long de l'expérience (habituation à l'expérimentateur, anesthésiques, analgésiques); réduction par une utilisation des portées dans leur ensemble sans tenir compte du sexe biologique dans un premier temps. Un avenant sera apportée si un éventuel effet sexe-spécifique devait être suspecté pour analyser séparément les males et femelles, afin de réduire au maximum le nombre d'animaux.

Etant donné que ce projet a pour but d'étudier les conséquences comportementales d'un traitement avec des antagonistes des systèmes ocytocinergiques et vasopressinergiques, aucun remplacement n'est envisageable car le comportement requiert l'intégrité des circuits neuronaux.

3240. La photochimiothérapie extracorporelle (PCE) est une immunothérapie autologue basée sur l'injection de cellules mononuclées modifiées par photochimie (ICMP). Les indications majeures de cette thérapeutique sont les traitements (i) des lymphomes cutanés à cellules T (LCT), (ii) du rejet d'organe et (iii) de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD pour Graft versus Host Disease), et aussi le traitement de pathologies autoimmunes. Quelles que soient les indications, le but de cette thérapie cellulaire est de moduler l'activité du système immunitaire vis à vis des cellules T pathogènes responsables des manifestations cliniques tout en proposant une alternative à l'utilisation d'immunosuppresseurs. Une des limites à l'utilisation de l'ICMP est liée au fait que ses mécanismes d'action sont encore mal connus. L'hypothèse actuelle des mécanismes d'action que nous retenons est que la transfusion de cellules contenant une quantité élevée de lymphocytes T pathogènes modifiés photochimiquement va entraîner une réaction spécifique du système immunitaire. Une autre limite à l'utilisation de l'ICMP est liée à la relative lourdeur de mise en œuvre du procédé thérapeutique, qui nécessite des aphérèses régulières, difficiles à supporter, en particulier pour les enfants.

Nous pensons que l'ICMP pourrait être proposée plus fréquemment si l'on pouvait rendre le traitement moins lourd du point de vue des patients, et nous souhaiterions proposer des modifications de son procédé, afin de limiter le nombre d'aphérèses nécessaires. Par ailleurs, les champs d'applications de l'ICMP pourraient être élargis si l'on connaissait mieux ses mécanismes d'action.

Nos objectifs sont donc :

- D'étudier les mécanismes d'action de la PCE : pour cela, nous développerons deux modèles in vivo (souris), afin de comprendre comment les cellules traitées présentes dans le prélèvement d'aphérèse exercent une action immunomodulatrice, et d'évaluer le caractère immunogène des cellules traitées par PCE.

- D'optimiser le processus de PCE, afin de rendre le traitement plus supportable pour les patients. Pour cela, nous évaluerons dans un modèle animal la possibilité de constituer des doses de produit cellulaire enrichies en lymphocytes T pathogènes triés puis amplifiés in vitro, et congelés, ce qui permettrait de réduire les inconvénients de cytophères multiples. Dans ce projet nous prévoyons d'utiliser 60 souris C57/B6, et 472 DBA/1.

Nous avons choisi les souris C57/B6 car dans ce modèle il est possible d'étudier les réponses antitumorales en greffant en sous-cutané des lignées syngéniques tumorales bien définies, dans notre projet, nous utiliserons les lignées B16-OVA (mélanome) et MCA205-OVA (fibrosarcome). Dans ces modèles, il a été décrit que l'injection de cellules tumorales apoptotiques (apoptose induite par un traitement avec de la doxorubicine) était immunogène, et protégeait les animaux d'une greffe ultérieure de cellules tumorales. Nous testerons selon ce principe l'immunogénicité de la mort induite par le traitement PCE des cellules tumorales, et utiliserons un traitement à la doxorubicine comme contrôle positif. La croissance des tumeurs sera mesurée, et l'efficacité de la prévention sera évaluée par comparaison au groupe contrôle de souris n'ayant pas reçu de traitement préalable à l'injection des cellules tumorales. 5 souris par groupe seront nécessaires pour une analyse fiable de l'effet anti-tumoral. Au total, 532 souris seront nécessaires pour la réalisation de ce projet.

Nous avons choisi d'utiliser pour la suite du projet un modèle d'arthrite induite par le collagène dans les souris DBA1 qui sont les souris couramment utilisées dans l'étude de cette pathologie, modèle de la polyarthrite rhumatoïde humaine. La PCE chez l'homme est principalement utilisée dans le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) et du rejet de greffe d'organe, mais un certain nombre d'études montrent qu'elle a une efficacité dans des pathologies autoimmunes. Dans le modèle de l'arthrite, nos collaborateurs à Besançon ont montré que la pathologie (qui est médiée par des lymphocytes T « pathogènes ») pouvait être contrôlée par injection de cellules apoptotiques. Dans une expérience préliminaire réalisée chez eux, nous avons pu observer que l'injection de cellules traitées par PUVA (psoralène+UVA) issues de souris arthritiques permettait de diminuer l'arthrite de souris atteintes, validant l'utilisation de ce modèle pour l'étude des mécanismes d'action de la PCE. Après deux expériences permettant la prise en main et la validation de ce modèle, nous pourrions analyser finement par des déplétions cellulaires quels sont les mécanismes immunologiques mis en jeu dans l'immunorégulation observée. Nous pourrions aussi évaluer dans ce modèle préclinique la faisabilité de modifier la pratique clinique actuelle, qui nécessite de réaliser une cytophère par traitement, soit 2 à 3 cytophères par semaines pendant parfois plusieurs mois, ce qui est très lourd à supporter pour les patients, en particulier pour les enfants. Nous évaluerons l'efficacité d'un traitement à base de

cellules T amplifiées in vitro, qui pourraient être congelées pour faire de multiples doses de produit cellulaire à partir d'un seul prélèvement de cytophère.

Lors de la conception de ce projet, nous avons essayé de limiter au maximum le nombre d'animaux par groupe, de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause de la variabilité du score d'arthrite intra et inter-groupe, les résultats seraient trop variables si moins d'animaux étaient utilisés.

Nous avons également tenté de réduire au maximum la douleur des animaux puisque une surveillance quotidienne sera réalisée à partir de J22 et que l'on procédera à une euthanasie anticipée, si une détresse trop importante survient.

3241. L'infertilité représente un défi majeur du monde occidental et des pays en voie de développement puisqu'aujourd'hui, 16% de couples consultent pour des problèmes d'infertilité et 10% d'entre eux recourent à un programme d'aide à la procréation. Dans le processus de fécondation, la fusion du spermatozoïde et de l'ovocyte constitue un événement majeur dont les mécanismes moléculaires et membranaires restent à ce jour mal compris. Jusqu'à récemment, la recherche dans ce domaine se limitait à des approches classiques et très peu d'équipes s'étaient saisies du sujet faute de pouvoir obtenir facilement les ovocytes de mammifères en quantité suffisante, et de pouvoir imager avec des bonnes résolutions temporelle et spatiale la zone de contact des gamètes au fil de leur adhésion et fusion. Les questions clés résident dans ce qui se passe durant le contact entre un spermatozoïde et un ovocyte pour ce qui est des molécules à l'adhésion et la fusion des gamètes, de leur organisation au fil de la fécondation, et leur dynamique. Le présent projet aborde ces questions. L'objectif est d'étudier le contact spermatozoïde-ovocyte à l'aide d'un nouveau dispositif microfluidique permettant de réaliser une fécondation guidée dans l'espace et dans le temps sous microscope confocal, et donc d'imager avec une haute résolution spatiale et temporelle l'aire de contact spermatozoïde-ovocyte. Ces approches seront combinées à la production et l'utilisation de constructions moléculaires et de gamètes modifiées génétiquement. En parallèle nous travaillerons à l'élaboration d'un spermatozoïde biomimétique en vue d'élucider la machinerie de fusion minimum dans la fécondation.

L'objectif de ce projet est donc de déterminer les mécanismes moléculaires intervenant dans chaque étape de l'interaction gamétique.

La souris comme modèle: c'est un mammifère présentant avec l'homme de grandes homologues quant aux mécanismes d'interaction des gamètes et molécules impliquées dans ce processus. Les informations obtenues sur la souris auront donc une valeur réelle pour l'homme et des applications cliniques (contraception/ aide à la procréation) possibles.

De plus parmi les mammifères, les modèles transgéniques ne sont disponibles qu'en souris.

Respect de la règle des 3R:

- Réduction: travailler sur l'interaction gamétique avec des méthodes de biologie classique nécessite une quantité de cellules (ovocytes) importante. Nos outils biophysique permettent de travailler à l'échelle de la cellule unique et donc de réduire naturellement le nombre de souris nécessaires pour chaque expérience.

- Raffinement: les souris sont utilisées jeunes et ne subissent que la procédure d'injection intra péritonéale d'hormones stimulant l'ovulation

- Remplacement: les approches que nous développons tendent à remplacer les gamètes par des systèmes biomimétiques qui permettent jusqu'à un certain point de limiter l'utilisation des souris

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet: 1740

3242. 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.

Nous avons généré récemment dans le laboratoire un nouveau modèle murin par délétion conditionnelle qui reproduit notamment les symptômes neurologiques associés à l'AF. Ces souris constituent un bon modèle pour étudier la neuropathophysiologie. Les études préliminaires dans ce modèle ne révèlent pas d'altérations des protéines à centres Fe-S dans le tissu neuronal (DRG, moelle et cervelet) comme cela a été décrit dans les modèles cardiaques et dans le foie. Les neurones proprioceptifs ne constituent cependant qu'une faible proportion de la population neuronale du DRG (10 à 15%), ce qui pourrait ainsi résulter en une dilution de notre information dans l'échantillon.

Pour évaluer ce point, nous proposons de créer un modèle via l'utilisation de vecteurs adéno-associés injectés en intraveineux ou directement dans le cervelet afin de déléter la protéine dans une proportion plus large du tissu nerveux et d'évaluer ensuite l'effet de la perte de frataxine sur les protéines à centre Fe-S.

Un nombre total de 180 souris sera utilisé sur ce projet, correspondant au nombre minimum de souris nécessaire afin de mener des analyses statistiques pour nos résultats et afin de pouvoir mener en parallèles des études histologiques et moléculaires. Un minimum de 15 souris traitées par groupe est nécessaire, en effet, les ganglions dorso-rachidien, qui constituent notre tissu d'intérêt représente une faible quantité de tissus, sachant que les DRG cervicaux, thoraciques et lombaires doivent être analysés séparément. Afin de réduire au maximum l'utilisation d'animaux, une étude parallèle vise à mettre en culture des neurones primaires afin d'identifier certaines voies moléculaires modifiées suite à la déficience en frataxine. Cependant, la physiopathologie, ne peut réellement être étudiée que lorsque les cellules se trouvent dans leur

contexte physiologique avec toutes les cellules avoisinantes. Afin d'éviter toute souffrance nos animaux seront placés sous antalgiques en post opératoire et un suivi particulier sera apporté notamment avec l'ajout de nourriture gélifiée dès les premiers signes de difficultés motrices.

3243. Le diabète de type II est l'une des maladies métaboliques les plus répandus dans les pays développés et apparait en général après 40 ans. Avec la progression de la pathologie, de nombreuses complications font leur apparition sur le long terme, dont les plus importantes sont des atteintes cardiovasculaires et rénales.

Concernant les complications rénales, plus de 40% des patients diabétiques développeront au cours de leur vie une néphropathie diabétique. Cette pathologie est caractérisée par une albuminurie (présence d'albumine dans les urines) et un déclin de la fonction rénale. Au stade le plus avancé de la pathologie, le recours à la dialyse s'avère nécessaire et un remplacement d'organe est souvent proposé.

Les mécanismes et systèmes impliqués dans la néphropathie restent à ce jour pas complètement connus et les traitements pharmacologiques utilisés ne permettent pas sa rémission. Le système rénine angiotensine est l'un des systèmes physiologiques impliqué dans la néphropathie diabétique. Chez les patients atteints de néphropathie diabétique, une activation de ce système menant à une augmentation de la pression intra-glomérulaire et participant ainsi à la progression de la maladie est observée. De nombreux traitements basés sur l'inhibition de ce système, avec notamment l'emploi d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ont démontré leur efficacité dans le ralentissement de la progression de la maladie.

Les techniques alternatives in vitro et ex vivo à ce jour ne permettent pas d'étudier dans son ensemble la néphropathie diabétique ; c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animal est nécessaire.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de candidats médicaments sur le développement de la néphropathie induite par un diabète de type II, afin d'identifier une thérapie efficace pour prévenir et/ou traiter cette pathologie. Les modèles choisis pour cette étude sont des modèles murines génétiquement modifiés (souris db/db et BTBR ob/ob) qui développent un diabète de type II et une néphropathie de manière spontanée aux caractéristiques proches de la pathologie humaine.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement de l'hébergement (carrés de coton, des igloos, des refuges, ...) sera introduit auprès des animaux. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 900, en raison de 12 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs); le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

L'évaluation de l'effet de candidats médicaments sur la néphropathie diabétique se fera au cours du temps (jusqu'à 20 semaines) par des techniques non-invasives : mesure de la glycémie, prise alimentaire et hydrique et récolte urinaire par cage à métabolisme. L'observation au cours du temps de ces animaux et l'application d'une méthode non-invasive pour la mesure de la filtration glomérulaire (par cage métabolique) nous permet de réduire le nombre d'animaux par étude. L'état général des animaux sera observé tous les jours, le suivi étant assuré par les zootechniciens certifiés du service de zootechnie le week-end. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

3244. La mitochondrie est un réseau tubulaire dynamique ayant un rôle essentiel dans la production d'énergie. Le mouvement et la répartition des mitochondries nommés "dynamique mitochondriale" permet à la cellule de s'adapter à son environnement. Il correspond à un équilibre entre niveau de fusion et de fission des mitochondries et est médié par des protéines impliquées soit dans la fission (Fis-1 et Drp1), soit dans la fusion (Mfn-1, Mfn-2, et OPA-1).

De part ses fonctions et sa dynamique la mitochondrie est située au centre du développement des stratégies de cardioprotection visant à prévenir les lésions de reperfusion suite à un infarctus du myocarde (IDM). Des études réalisées par différentes équipes ont montré que l'ischémie entraînait une fission mitochondriale dont l'inhibition pouvait avoir un rôle protecteur. Au sein du laboratoire, nous nous intéressons à la cardioprotection à la phase aigüe de l'infarctus. La mitochondrie est un acteur majeur de ces mécanismes de cardioprotection. Dans ce cadre nous voulons étudier si des variations de la dynamique mitochondriale cardiaque peuvent expliquer en partie les mécanismes protecteurs de ces procédures. Cette étude physiopathologique nous permettra secondairement l'utilisation d'agents pharmacologiques pour réguler cette dynamique et améliorer la cardioprotection.

Pour le versant vasculaire, aucune étude ne détermine ni sur des vaisseaux de compliance ni sur des vaisseaux de résistance le rôle d'OPA1. Notre hypothèse est que les fonctions vasculaires et mitochondriales évoluent en parallèle et que l'altération progressive des mitochondries perturbe la réactivité et l'adaptation vasculaire (notamment à l'hypertension) avec des conséquences dramatiques pour les organes clés comme les reins, le cœur ou le cerveau. Nous nous intéressons au rôle de la protéine de fusion mitochondriale OPA1 dans la physiopathologie vasculaire et notamment dans le développement de l'hypertension artérielle systolique qui apparaît lors du vieillissement, dû souvent à une augmentation de la pression pulsée lié à un accroissement de la rigidité artérielle.

Dans le cadre de ce protocole de recherche nous appliquons la règle des 3R. Nous ne pouvons pas remplacer le modèle animal par un modèle cellulaire, le nombre d'animaux est réduit au minimum pour pouvoir faire des statistiques (Cœur isolé de Langendorff: 8 groupes soit 120 souris Ischémie/reperfusion in vivo: 2 groupes soit 30 souris Etude de la fonction cardiaque: 2 groupes soit 30 souris et 24 groupes pour un total de 480 souris pour les fonctions vasculaires).

Nous utiliserons en tout 660 animaux pour l'ensemble du projet. Tout est mis en œuvre pour assurer le bien être animal (traitement de la douleur, minimisation du stress...).

Dans le cadre de la recherche de nouvelles approches anti-cancéreuses, des composés inhibant la fonction de facteurs de transcription impliqués dans la leucémogénèse ou la cancérogenèse ont été sélectionnés. La validation a été effectuée in vitro sur la cible et sur cellules en culture ou primaires exprimant ou non la cible.

L'étude en modèle animal a pour but de valider l'efficacité de ces composés in vivo au travers d'activité anti-tumorales et /ou différenciatrices des cellules cancéreuses utilisées.

Ce travail est donc essentiel pour la suite et aura donc des retombées pour le développement de nouveaux médicaments anti-cancéreux et anti-leucémiques.

3245. Des cellules tumorales murines ou humaines (100.000 à 10.000.000 cellules selon les types cellulaires) seront xéno greffées sur animaux syngéniques ou immunodéprimés, respectivement, par voie intraveineuse (caudale ou retro-orbitale, dans un volume <5mL/Kg), sous-cutanée (100 µl, soit un volume <10mL/Kg), intra-péritonéale (dans un volume <20mL/Kg) ou en intra-tibial/fémoral (5-10µL), ceci selon les modèles. Après implantation, les animaux seront traités ou non avec des agents à but anti-cancéreux préalablement évalués et sélectionnés sur modèles in vitro en culture de cellules : les composés dilués dans une solution saline seront injectés en intra-péritonéal (2 à 20 mL/Kg) ou en intraveineuse (caudal) (1 à 5 mL/Kg). Des prélèvements sanguins en rétro-orbital ou sub-mandibulaire (modèles des leucémies) seront effectués régulièrement sur animaux anesthésiés à l'isofurane. La taille des tumeurs sera mesurée tous les 1 à 3 jours (selon les modèles) et le poids des animaux sera suivi 2-3 fois par semaine.

Le nombre d'animaux sera de 3 par groupe pour les étapes de mise au point des modèles et à 8 par groupe pour les expérimentations proprement dites, nombre modulé selon une évaluation statistique par tests non paramétriques pour atteindre une valeur statistique de p-value<0.05.

Le nombre total d'animaux sera de 693 souris répartis comme suit:

- Souris C57BL/6 ly.1 (CD45.1) : 142 souris,
- Souris NOD-SCID-Gamma (NSG) : 503 souris.

Selon les protocoles, les animaux seront euthanasiés :

- au cours de la mise en place du modèle pour valider le suivi d'implantation
- au cours du traitement pour valider l'efficacité et l'absence de toxicité des composés évalués
- au point limite pour suivre la survie globale avec ou sans traitement.

La vérification de la douleur sera basée sur ces points :

- douleurs aiguës : grattage répété au point d'injection
- douleurs chroniques : immobilité, dos voûté, poils hérissé, diminution du toilettage, auto-mutilation, perte de poids.

Les points limites sont :

- perte de poids >15%,
- détérioration irréversible de l'état de l'animal impactant sa survie tel que le développement excessif de la tumeur ou de la grosseur au point d'injection qui gêne les mouvements normaux de l'animal ou sont ulcérés, la perte d'alimentation brutale, une diarrhée ou encore une tension abdominale signe de splénomégalie ou d'ascite induisant une forte prise de poids.
- tremblements, secousses, convulsions, boiteries, décubitus permanent.

Avant euthanasie, les animaux développant des tumeurs localisées seront anesthésiés à l'isofurane pour analyses, le cas échéant, en IRM du petit animal dans le cas de cellules non fluorescentes et/ou au xéno gène dans le cas de cellules GFP-positive.

L'euthanasie se fera par dislocation cervicale sur les animaux anesthésiés avant de récupérer les organes pour analyses.

La vérification de la mort de l'animal se fera par absence de rythme cardiaque, pincement de la patte et absence de reflexe cornéen.

Les échantillons collectés seront analysés par pesée, au xéno gène (GFP), en cytométrie en flux, en étude du métabolisme, en tests clonogéniques, en microscopie de fluorescence ou immunohistochimie sur coupes cryogéniques d'organes, en extraction d'ARNm, ADN génomique et/ou protéines et les cellules remises en culture au besoin. Dans certains modèles, les cellules seront réimplantées chez la souris de la manière décrite ci-dessus.

3246. La mise en place d'implants dentaires requiert la présence d'un volume osseux minimal afin d'assurer leur ancrage. Hélas, le praticien fait souvent face à une atrophie du tissu osseux et des tissus mous environnants qui compromet la stabilité de l'implant et les résultats esthétiques. Pour pallier cette difficulté, le chirurgien comble les espaces péri-implantaires à l'aide d'os autologue et met en place une membrane pour prévenir un envahissement de la cavité par les tissus mous environnants. Cependant, le prélèvement d'un greffon osseux induit une morbidité accrue et n'est pas toujours possible. Pour pallier ces difficultés, l'utilisation d'os de banque a été proposée. Ce substitut osseux ostéoconducteur et résorbable a un intérêt croissant, en particulier sous forme de pâte injectable, en implantologie. Son utilisation évite la chirurgie lourde due au prélèvement d'os autologue et réduit les complications postopératoires.

L'objectif du projet est d'étudier l'efficacité ostéogénique de la poudre d'os humain et de trois pâtes composées de poudre d'os humain préalablement sélectionnées sur des critères d'injectabilité, de propriétés physico-chimiques, de biocompatibilité et de capacité ostéogène. De plus, une poudre d'os bovin déprotéinisée et faisant référence en clinique, sera utilisée comme contrôle positif. L'indication clinique humaine visée est l'augmentation osseuse verticale péri-implantaire.

L'efficacité des différentes formulations (formation osseuse verticale et cinétique de résorption des substituts osseux) sera évaluée, après implantation dans des chambres osseuses placées sur le crâne de rats, à J15 (analyse précoce) et J60 (analyse tardive). Cette étude doit permettre une évaluation de l'efficacité thérapeutique des formulations proposées afin de

déterminer la formulation optimale pour une utilisation chez l'Homme et, à terme, la mise en place d'un essai clinique. Cette étude comprend 6 groupes expérimentaux ; un groupe chambre à os avec la poudre d'os humain, trois groupes groupe chambre à os avec 3 formulations de pâte à la base de l'os humain, deux groupes contrôles : contrôle positif (groupe chambre à os avec os bovin déprotéinisé) et négatif (chambre à os laissé vide). Tous les groupes sont doublés pour une analyse à deux temps (15 et 60 jours), chaque groupe est composé de 10 animaux pour un total de 120 rats de type WISTAR.

Compte tenu de la complexité du processus de cicatrisation osseuse faisant intervenir plusieurs systèmes (vasculaire, nerveux, etc.), il est difficile d'étudier la réponse tissulaire et le potentiel ostéoformateur d'un substitut osseux par un modèle "in vitro" ou "in silico", d'où la nécessité d'une étude chez l'animal.

Afin de réduire le nombre d'animaux il sera réalisé (i) un minimum d'échantillons (10 par groupe) qui permet, compte tenu des écarts constatés pour les différents paramètres de la réparation osseuse étudiés, d'avoir un test significatif (ii) un suivi de la cicatrisation sur le même animal à l'aide d'un micro scanner in vivo et (iii) une réduction des temps d'analyse à deux temps. La gestion de l'inconfort et de la douleur des animaux est assurée par des soins et une médication appropriés à chacune des étapes de la procédure chirurgicale. Si l'animal manifeste de signes de douleurs (les injections de buprenorphine seront répétées toutes les 12h pendant 2 jours.

L'absence de souffrance ou d'inconfort sera contrôlée par une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude grâce à un tableau de score. Au cas où des douleurs persistent malgré les traitements entrepris ou d'infection majeure, l'animal sera mis à mort.

3247. Les autorités de santé exigent la démonstration de l'efficacité d'un vaccin ou d'une préparation d'anticorps dans des études préclinique avant leur utilisation dans la prévention des maladies infectieuses humaines. De ce fait, la protection induite par de nouveaux candidats vaccins ou des anticorps doit être évaluée in vivo dans des modèles animaux naïfs, pour tester leur innocuité, ou pré-infectés pour tester leur efficacité. Le recours à des modèles animaux est d'autant plus important lorsque les corrélats de protection ne sont pas complètement identifiés, ce qui est souvent le cas pour de nouvelles cibles vaccinales. Le but de ce projet est de développer des modèles animaux pour l'étude de l'innocuité et l'efficacité de vaccins innovants pour la prévention d'infections virales. Pour ce faire il est nécessaire d'évaluer le potentiel infectieux du virus ciblé dans le modèle animal approprié afin d'évaluer la protection induite par les candidats vaccins ou les anticorps conçus pour la prévention ou le traitement des infections virales visées.

Dans un premier temps, l'étude de l'infection chez les animaux permet de déterminer des critères de pathogénicité du virus tels que les symptômes cliniques généraux (fièvre, perte de poids...) ou symptômes spécifiques. Ce sont ces signes qui seront suivis lors des essais destinés à étudier les candidats vaccins et anticorps. Les objectifs sont multiples et permettent l'évaluation de:

La protection induite par les candidats vaccins ou des anticorps contre une infection

La réponse immune induite post-infection par les antigènes vaccinaux

Au cours de ces études, si des animaux présentent une dégradation de l'état général, des lésions ou des symptômes montrant une souffrance importante, des soins, voire une euthanasie humanitaire seront entrepris, selon l'avis d'un vétérinaire spécialisé. Les animaux font l'objet d'un soin quotidien, d'examen cliniques attentifs par du personnel formé à la détection des signes cliniques de la maladie étudiée. Ils se déroulent uniquement dans un laboratoire agréé, régulièrement inspecté par les autorités préfectorales.

L'ensemble de ce projet peut nécessiter l'utilisation de 1500 rongeurs. Il s'agit d'une estimation en fonction du nombre de souches virales et de vaccins que nous serions amenés à tester. Pour chaque test, le nombre d'animaux et l'espèce animale la plus appropriée font l'objet d'une étude attentive à la fois biostatistique et bibliographique, car pour chaque virus, on connaît en général une espèce animal qui apporte les meilleures informations scientifiques.

A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives in vitro pour évaluer les capacités d'un vaccin, d'un anticorps à induire une protection contre un virus ou pour évalue les réponses immunitaires post-infection. Le recours à l'animal de laboratoire s'avère donc nécessaire.

Chaque étude est revue par les biostatisticiens afin de définir le nombre minimum et suffisant d'animaux requis permettant une analyse statistique des résultats.

En fonction des virus, une grille d'évaluation des signes cliniques post-infection sera mise en place entre le responsable d'étude, les statisticiens et les vétérinaires Cette grille permet d'évaluer le niveau de souffrance des animaux selon des critères cliniques spécifique du virus, par un personnel spécifiquement formé.. Les animaux sont hébergés en groupe dans des locaux appropriés, et dans des cages contenant un milieu adapté à l'espèce, comprenant des moyens d'enrichissement du milieu. Ainsi les rongeurs peuvent nicher, rogner de petits bouts de bois, et la luminosité de la pièce est adaptés à leur mode de vie plutôt nocturne.

3248. Au centre de l'immunité, les cellules dendritiques (DC) sont des cibles de choix pour activer les lymphocytes T. Les DC infiltrent la plupart des tumeurs et migrent dans les organes lymphoïdes secondaires pour initier une réponse immunitaire. Les DC appelées DC XCR1 sont critiques dans l'activation de lymphocytes T tueurs (CTL). Pour avancer vers l'utilisation clinique chez l'homme des DC XCR1, nous devons mieux comprendre les fonctions des DC XCR1 dans la défense anti-tumorale chez la souris. Le projet développé ici s'articulera donc autour de plusieurs objectifs :

1-Décrire la biologie des DC XCR1 dans l'environnement tumoral

2-«Convertir» les tumeurs solides en tumeurs immunogènes (vaccination thérapeutique)

3-Améliorer le ciblage des DC XCR1 lors de la vaccination prophylactique anti-tumorale

Notre projet nécessite la mesure de la réponse immunitaire qui se met en place suite à la greffe de cellules tumorales (mélanomes, thymomes et cellules issues de cancer du côlon) sur des souris contrôles et des souris génétiquement modifiées, dans lesquelles la fonction des DC XCR1 est altérée. Remplacement : l'intégration d'un système vivant et complet est indispensable pour notre projet. La physiopathologie de la souris est suffisamment proche de celle de l'homme pour que son étude nous permette d'accroître nos connaissances sur le fonctionnement du système immunitaire chez l'homme.

Réduction : L'ensemble du projet prévoit l'utilisation d'animaux de fond génétique homogène nous permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés en évitant au maximum les variabilités interindividuelles des animaux sous fonds génétiques hétérogènes. Ainsi, chaque expérience devrait pouvoir être répétée indépendamment deux fois, avec 4 animaux par groupe, minimum requis pour s'assurer de la bonne reproductibilité des résultats.

Raffinement : les greffes de tumeur et les infections sont préalablement testées sur un groupe d'animaux standard nous permettant d'établir les doses infectieuses (dose létale 50) et les limites expérimentales (tolérance des tumeurs ; susceptibilité aux infections) de chaque procédure avant leur application sur un plus grand nombre d'animaux. Le suivi du développement des pathologies se fera par des mesures régulières de la croissance tumorale et le suivi de paramètres accessibles (scoring de la souffrance).

Le nombre d'animaux prévus dans le projet comprend :

- des animaux nécessaires pour la génération, l'élevage et la maintenance de lignées de souris génétiquement modifiées afin de générer les animaux nécessaires aux expériences.
- des animaux génétiquement modifiés et contrôles qui rentreront dans les procédures expérimentales et dont le nombre est estimé à environ 2894 sur cinq ans.

3249. Les cancers de la sphère urologique (rein, prostate, vessie) représentent 20% des cancers et pratiquement 15% des décès liés au cancer, ce qui équivaut à respectivement 1 300 000 cas et 500 000 décès par an dans le monde (2012). Leur incidence est en progression constante de 1 à 10% suivant le type de cancer. Les cancers du rein et de la vessie sont réfractaires à toutes thérapies malgré, notamment en ce qui concerne le cancer du rein, le développement des thérapies ciblées. Concernant le cancer de la prostate, il se caractérise par des récurrences fréquentes, des métastases osseuses et également une résistance aux thérapies. Ces cancers sont donc des pathologies avec un très fort besoin pour lesquelles de nouvelles options thérapeutiques doivent être impérativement développées.

L'approche par xénogreffe de tumeurs urologiques humaines directement obtenues de patients au moment de la chirurgie apparaît à l'heure actuelle comme le modèle d'étude préclinique le plus pertinent. Ces modèles sont caractérisés à différents niveaux : histologique, moléculaire, et génétique. L'objectif de ce projet est de compléter cette caractérisation en évaluant la réponse de ces modèles aux traitements de référence de ces pathologies. La comparaison de la réponse chez la souris avec la réponse clinique observée chez le patient aura pour but de montrer leur prédictivité et d'apporter la preuve de concept qu'il s'agit de modèles reproduisant fidèlement les caractéristiques des tumeurs humaines, pour une validation préclinique fiables d'un nouveau traitement in vivo.

D'un point de vue pratique, ce projet utilisera des souris immunodéficientes âgées de 6 à 8 semaines qui seront xénogreffées en sous-cutané (dans la région interscapulaire) par des échantillons de tumeurs urologiques humaines directement obtenus de patients et soumis à différents traitements thérapeutiques. A la fin de chaque étude, les souris seront sacrifiées et les tumeurs prélevées pour les analyses ultérieures.

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

- Réduction: Ce projet utilisera idéalement 2700 souris sur les 5 ans, réparties de la façon suivante : 1650, 875 et 175 souris respectivement pour les études sur les modèles de rein, vessie et prostate. Nous disposons de 30 modèles de rein, de 25 modèles de vessie et de 5 modèles de prostate. Trois molécules seront testées sur les modèles de rein (Sunitinib, Sorafénib et Évérolimus), une seule pour les modèles de vessie (Cisplatine) et une seule pour les modèles de prostate (Docétaxel). En incluant un groupe véhicule et à raison de 10 souris / groupe, cela revient à 5 groupes / étude pour les modèles de rein (soit 50 souris / modèle de rein) et à 3 groupes / étude pour les modèles de vessie et de prostate (soit 30 souris / modèle). A cela, il faut rajouter 5 souris / modèle pour la phase d'amplification. Ce qui fait un total de  $55 \times 30 = 1650$  souris pour les études avec les modèles de rein ;  $35 \times 25 = 875$  souris pour les études avec les modèles de vessie et  $35 \times 5 = 175$  souris pour les études avec les modèles de prostate. Aussi, nous utiliserons un nombre minimal d'animaux permettant d'une part, une analyse statistique des résultats (Kruskal-Wallis one-way Anova ou Bonferroni two-way Anova). Les chiffres annoncés relèvent aussi d'un taux de prise de 90%, minimisant le nombre d'animaux nécessaires.

- Raffinement: Ce projet sera réalisé au sein d'une animalerie agréée et par conséquent les animaux seront manipulés par du personnel habilité et soucieux de leur bien-être. En l'occurrence, le raffinement sera assuré par un enrichissement des cages pour le confort des animaux. Les souris seront nourries ad libitum et hébergées en groupe; elles ne seront séparées qu'en cas de comportement agressif avec induction de plaies. La température et l'hygrométrie de la pièce dans laquelle elles sont hébergées sont relevées régulièrement par les animaliers. Un dispositif est installé à demeure dans la pièce à cet effet. Les changes sont effectués une fois par semaine. Nous diminuerons la douleur et l'angoisse liées à l'acte chirurgical (xénogreffe en sous-cutané) en opérant sous anesthésie et en appliquant une analgésie locale en pré-opératoire. Pour finir, les animaux seront surveillés pendant toute la phase de réveil. Le développement tumoral en sous-cutané en lui-même n'est pas douloureux pour les animaux. Le suivi et la surveillance de nos souris montrent d'ailleurs un comportement normal dès le réveil avec prise alimentaire normale les jours suivants, sans perte de poids et sans modification de la température corporelle. De plus, selon la bibliographie et notre expertise, les traitements envisagés sont bien tolérés. Seul le Sunitinib peut entraîner une perte de poids.

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

3250. Le diabète est une maladie qui touche environ 350 millions de personnes dans le monde. Il existe principalement deux types de diabète : le diabète de type I et celui de type II. Le diabète de type II est plus fréquent, touchant plus d'un million et demi de personnes en France et ne cesse d'augmenter. Il représente ainsi environ 85 % de l'ensemble des diabètes. Cette maladie métabolique est caractérisée par un excès chronique de sucre dans le sang (hyperglycémie) et s'accompagne souvent d'un surpoids. D'après nos études récentes chez l'homme, des anomalies apparaissent sur certaines populations de cellules du système immunitaire chez les patients diabétiques. L'objectif de ce projet est donc d'étudier ces populations de cellules et leurs rôles dans le diabète de type II, notamment grâce à différents modèles animaux. Effectivement, il est nécessaire d'utiliser le modèle animal afin de comprendre les interactions entre les différents organes et les mécanismes développés par l'organisme au cours de la maladie.

Pour étudier ce diabète de type II, nous utilisons plusieurs lignées de souris génétiquement modifiées. Ces souris sont nourries avec une alimentation grasse pendant quatre mois et la prise de poids est suivie régulièrement par pesée. Nous maintenons nos lignées en élevage interne en prenant soin de produire le nombre minimum d'animaux nécessaires au maintien de ces lignées et aux expérimentations. Nous ferons l'analyse des organes cibles sur certains animaux et sur d'autres nous procéderons à des tests métaboliques après une mise sous régime alimentaire gras. Une autre procédure permettra d'induire un diabète à certaines souris et d'étudier les organes cibles des cellules du système immunitaire.

Ce projet prévu pour 5 ans nécessitera au total 1389 souris.

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

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

3251. Nous avons travaillé sur l'hypothèse que certains agents de chimiothérapie peuvent induire un stress des cellules tumorales et leur mort immunogénique (ICD, «Immunogenic cell death»).

Nous avons découvert que l'ICD est précédée de deux types de stress: le stress du réticulum endoplasmique dans la cellule (ER) et l'autophagie. Il a été démontré que la diminution des nutriments, connue sous le nom de restriction calorique (CR de l'anglais «caloric restriction») a des effets bénéfiques pour la santé et augmente la durée de la vie moyenne. Cette réduction de l'apport en nutriments est une façon physiologique de déclencher l'autophagie, qui conduit à une diminution des niveaux intracellulaires d'acétyl coenzyme A (AcCoA) donnant lieu à la déacétylation des protéines cellulaires.

Les CRMs (Caloric Restriction Mimetics) sont des produits qui miment les effets biochimiques et fonctionnels de la CR, en stimulant l'autophagie et la déacétylation des protéines cellulaires.

Un des objectifs de ce projet est de déterminer un éventuel rôle du système immunitaire dans l'action des CRMs, ce qui nécessite l'implication d'animaux vivants et plus particulièrement de souris car un organisme vivant entièrement fonctionnel est indispensable du fait de l'étude de l'impact de l'immunité dans ces processus. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire ex-vivo du fait de sa complexité. Par ailleurs, le modèle de carcinogenèse étudié a été développé chez la souris pour permettre ce type d'étude.

Ce projet aura aussi comme objectifs :

1. Analyser le rôle des CRMs dans le développement du cancer de la glande mammaire (modèle de cancer du sein de la femme);
2. Analyser le rôle des CRMs dans le traitement du cancer de la glande mammaire;
3. Comme décrit antérieurement, déterminer un éventuel rôle du système immunitaire dans l'action des CRMs.

Le projet nécessitera au maximum 9081 souris, dont 6054 souris sont envisagés pour une première étape, et 3027 souris seront pour validation des résultats plus significatifs si l'hypothèse est confirmée dans la première expérience. Ce nombre d'animaux se justifie par la complexité du modèle, les différents âges des souris et les différents groupes pour montrer l'efficacité de nos modèles.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement ; d'une part, elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (voir ci-dessus). D'autre part, les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles (point de réduction). Le nombre d'animaux par groupe est de 8 ou 12 (selon les procédures envisagées) et les expériences seront effectuées au maximum 2 fois pour permettre une analyse statistique robuste des effets observés. Nous pourrions être amenés à utiliser moins de souris si l'effet observé s'avère significatif au cours des premières expériences. L'étude sera arrêtée si l'expérience initiale invalide l'hypothèse de travail.

De plus, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Par exemple, si les souris sont faibles, de la nourriture et du gel à haute valeur nutritive seront fournis, ainsi que des moyens supplémentaires pour maintenir la température corporelle (cellulose dispersible).

3252. La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative de l'adulte incurable à ce jour. D'origine génétique, sa prévalence est de l'ordre de 1/10000. Les symptômes associent mouvements involontaires, déficits cognitifs et troubles de la personnalité. De nombreux modèles murins ont été générés, dont le knockin CAG140. Ce modèle récapitule des phénotypes majeurs de la maladie et constitue un outil inestimable pour l'étude des mécanismes physiopathologiques et la réalisation de traitements précliniques. Alors que le phénotype moteur des souris "Huntington" a été largement étudié et est utilisé comme marqueur lors des tests précliniques, le phénotype cognitif reste peu caractérisé. L'atteinte des fonctions cognitives est pourtant un marqueur précoce de la maladie, avec un impact substantiel sur la qualité de vie des patients. Ainsi, une meilleure caractérisation des fonctions cognitives chez les souris modèles Huntington est nécessaire pour comprendre les mécanismes responsables des atteintes cognitives mais aussi pour évaluer de façon précoce les bénéfices potentiels d'un traitement lors de la réalisation de tests précliniques. La MH est caractérisée par une atteinte préférentielle du striatum. Cette structure cérébrale est impliquée dans une mémoire particulière, dite procédurale, car elle permet de résoudre une tâche répétitive par un comportement automatique. De façon surprenante, peu d'études se sont intéressées à l'état de cette mémoire chez les patients ou les animaux modèles. L'objectif de l'étude proposée est de caractériser la mémoire procédurale des souris KI CAG140 à l'aide d'un test de comportement approprié, le labyrinthe du double-H. Prenant en compte la stratégie des 3R (remplacement, réduction et raffinement) et des calculs de puissance, nous limiterons le nombre de souris utilisées au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement exploitables (n=252). Par ailleurs, dans un souci de raffinement du projet et du respect du bien-être animal, l'étude sera menée de façon générale à un âge où les animaux ne sont pas atteints des symptômes les plus invalidants de la MH. Enfin, un suivi quotidien des souris sera réalisé afin d'anticiper tout signe nécessitant chez l'animal des soins particuliers.

3253. Nous savons que la molécule étudiée, le « peptide YSNSG » inhibe la croissance et la migration tumorale sur des modèles de cellules (in vitro et in vivo) de mélanome. Ce que nous ne savons pas, c'est qu'elle est la distribution de cette molécule au sein du tissu tumoral, et comment évolue cette distribution en fonction de la voie d'administration.

Nous souhaitons étudier l'influence de l'environnement tumoral sur la distribution d'une molécule possédant des propriétés antitumorales. En effet, la tumeur et son environnement peuvent participer à la résistance du cancer aux traitements antitumoraux en diminuant leur concentration au site d'action par exemple.

L'étude de la pharmacocinétique d'une molécule en développement est réalisée dans un premier temps chez un modèle animal, classiquement la Souris ou le Rat. Il n'existe pas d'alternatives validées. Après la détermination des paramètres pharmacocinétiques chez quelques animaux et la détermination de la distribution tissulaire et tumorale du médicament, des modélisations peuvent être réalisées in silico afin de limiter le nombre d'animaux utilisés.

En pratique, il s'agit d'administrer chez l'animal anesthésié une molécule et de réaliser régulièrement des prélèvements de sang et de liquide tissulaire. Pour les prélèvements tissulaires, nous utilisons une technique qui permet de mesurer au cours du temps la concentration d'une molécule dans un tissu vivant, la microdialyse. Cette technique consiste en l'implantation d'une sonde équipée à son extrémité d'une membrane semi-perméable dans un tissu. La sonde est perfusée avec un liquide de dialyse spécifique en fonction du tissu et ce liquide est recueilli en retour. Au passage au niveau de la membrane semi-perméable, ce liquide de dialyse s'est « chargé » en molécules dialysables présentes au niveau du site d'implantation, et en particulier le peptide étudié ici. Après avoir fait des recueils à intervalles réguliers (pendant quelques heures), la concentration en peptide étudié est déterminée permettant ainsi de déterminer l'évolution de la concentration du peptide d'intérêt dans le tissu étudié. Rapportée à la concentration sanguine, on peut ainsi évaluer le rapport de diffusion de la molécule.

Dans notre cas, nous injecterons sur un des flancs d'une Souris des cellules tumorales. Cette procédure est réalisée sous anesthésie. La croissance de la tumeur sera observée sur 2 jours. Le bien-être de l'animal sera suivi sur la base d'un changement de comportement (prostration, stress, mutilations), d'une variation anormale de poids et mesure de la tumeur. Toute souffrance liée à ces quelques points limites justifiera une mise à mort de l'animal selon la procédure décrite précédemment (sous anesthésie générale).

Après développement de la tumeur, nous étudierons simultanément la distribution du peptide étudié dans le tissu tumoral et le tissu sain. Ainsi, la technique de microdialyse permet le suivi de l'évolution de concentrations dans différents tissus chez un même animal. De plus, chaque animal est son propre témoin ce qui concourt à réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés. Ces études sont réalisées sous anesthésie générale.

Un total de 72 animaux par an pourra être utilisé, en fonctions des modalités d'administration étudiées soit un total de 360 souris pour 5 ans.

3254. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente un problème majeur de santé publique pour lequel les options thérapeutiques sont limitées : bien que les tumeurs à un stade précoce puissent être traitées de façon curative en utilisant des approches chirurgicales, elles sont souvent diagnostiquées à un stade avancé, où les patients ne peuvent bénéficier que d'une option palliative. Ainsi, une thérapie qui soit bien tolérée, peu coûteuse et qui présente un ratio bénéfice-risque acceptable fait défaut. Le présent projet concerne le développement de nanovecteurs (particules d'une taille inférieure à 100 nm, soit 0,1 millièème de millimètre) comme outils diagnostiques et thérapeutiques pour le traitement du carcinome hépatocellulaire et fait suite à un précédent projet qui a reçu une autorisation d'expérimenter chez la souris. Notre projet comprend cinq modules de travail fortement interconnectés :

(1) Comprendre la pathogenèse du CHC et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques

(2) Développer de nouveaux modèles animaux pertinents pour l'étude de la pathogenèse du CHC et la réalisation des études thérapeutiques précliniques d'administration de nanovecteurs (biodistribution, pharmacocinétique/pharmacodynamique, toxicité, efficacité)

(3) Elaborer des thérapies innovantes du CHC grâce à l'utilisation de nanovecteurs

(4) Optimiser la prise en charge clinique du CHC à l'aide de l'imagerie médicale

(5) Former les médecins aux nouvelles thérapies individualisées

La présente demande d'autorisation concerne le point (2) du projet : mise en place et utilisation au sein de l'Etablissement Utilisateur de modèles humanisés de CHC, basés sur la greffe de cellules tumorales humaines dans des souris immunodéficientes. Des cellules humaines de la lignée Huh-7 ou des tumeurs primaires issues de patients ayant subi une résection chirurgicale de leur tumeur seront greffées soit en situation sous-cutanée soit en situation orthotopique (c'est-à-dire dans le foie de souris immunodéficientes). Les nanovecteurs candidats évalués dans ces modèles étant des produits innovants par rapport à ceux qui existent déjà, les résultats de la littérature ne permettent pas de prédire leur comportement in vivo et de s'affranchir d'une étape d'expérimentation animale. L'expérimentation animale sur petit animal est nécessaire pour évaluer leur biodistribution ainsi que leur éventuelle toxicité périphérique et leur efficacité sur une tumeur vascularisée, impossible à reproduire in vitro. Un total de 500 souris sans tumeurs et 2230 souris avec tumeurs seront utilisées pour (i) évaluer les nanovecteurs et (ii) mettre en place les modèles PDX, qui seront ensuite transférés pour expérimentation dans un autre Etablissement Utilisateur, qui, parallèlement, a déposé en ce sens une demande d'autorisation d'expérimenter à son propre comité d'éthique.

Respect de la règle des 3R :

**REDUIRE** : Plusieurs nanovecteurs candidats seront tout d'abord testés in vitro. Seuls ceux ayant répondu aux critères in vitro d'innocuité et d'efficacité seront évalués par la suite in vivo. De plus, le monitoring de la cinétique de croissance des tumeurs se fera par imagerie (bioluminescence in vivo ou IRM), ce qui permet de réutiliser les mêmes animaux à différents temps et donc de réduire le nombre d'animaux requis, par rapport à une approche nécessitant le sacrifice des animaux pour évaluer le nombre et la taille des tumeurs.

**RAFFINER** : Afin de raffiner au mieux les expérimentations, les souris porteuses de tumeurs auront un suivi quotidien adapté afin d'éviter toute souffrance liée au développement du cancer (antalgie systématique) et tous les moyens nécessaires seront mis en œuvre pour éviter tout stress ou douleurs lors des procédures (anesthésie, imagerie non invasive).

**REPLACER** : La phase d'expérimentation in vitro préalable à ce projet ne peut remplacer l'expérimentation chez l'animal. De plus, les agents thérapeutiques (ARN interférents) étant spécifiques d'espèce, seul le modèle de souris humanisée permet de tester in vivo ce traitement sur des tumeurs humaines.

3255. Les épilepsies affectent environ 0,8% de la population et se manifestent par des crises qui ont des expressions cliniques très variées. Le présent projet est un projet pilote qui s'intéresse aux réseaux neuronaux impliqués dans le développement des crises épileptiques chez le rat, dans un modèle prédictif de l'épilepsie humaine bien connu. Nous utiliserons donc ce modèle et enregistrerons en particulier l'activité des neurones dopaminergiques par électrophysiologie au cours de la survenue de la crise d'épilepsie. Ce projet a pour but de caractériser l'activité unitaire électrophysiologique de ces neurones dopaminergiques chez ces animaux et d'explorer comment ces activités sont modifiées au décours des crises. Nous enregistrons de 1 à 5 neurones par animal. Pour avoir des résultats statistiquement prédictifs, nous avons besoin d'au moins une quinzaine de cellules enregistrées, soit un maximum de 6 rats par structure d'intérêt. Nous avons 2 structures cérébrales d'intérêt biologique à explorer, soit 12 rats au maximum nécessaires pour ce projet qui durera 6 mois.

**Réduction** : ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Chaque neurone sera son propre contrôle (avant, pendant et après la survenue des crises) et il ne sera pas besoin d'utiliser d'animaux supplémentaires non épileptiques.

**Raffinement** : Le projet implique l'immobilisation d'animaux spontanément épileptiques. Un opioïde synthétique puissant sera utilisé de façon répétée afin d'induire une immobilisation sans douleur de l'animal. L'analgésie profonde sera complétée par l'injection d'un bloqueur neuromusculaire pour prévenir tout mouvement qui pourrait interférer avec le recueil des activités électrophysiologiques. L'apparition des crises dans cette préparation permet ainsi de s'assurer que l'animal ne souffre à aucun moment de la procédure.

**Remplacement** : Aucun modèle cellulaire ou computationnel ne peut mimer la crise épileptique spontanée. De ce fait, il est impossible de remplacer notre préparation in vivo par un modèle cellulaire ou une simulation computationnelle.

3256. La biosynthèse des acides gras polyinsaturés implique l'action d'enzymes désaturases (D5, D6, D9 -désaturases chez les mammifères). In vitro, une activité désaturase inédite chez les mammifères a été montrée sur l'acide trans-vaccénique, conduisant à la synthèse d'un acide gras, le trans11cis13-CLA, connu pour être présent dans le lait, mais considéré jusqu'à présent comme un produit de fermentation des bactéries du rumen

L'objectif du projet est de suivre la métabolisation de l'acide trans-vaccénique alimentaire à l'échelle d'un organisme entier chez le mammifère non-ruminant afin de confirmer la voie de synthèse endogène pour le trans11,cis13-CLA et d'étudier les effets de cette molécule d'intérêt physiologique potentiel.

L'étude porte sur la période de lactation car la teneur du lait en trans11,cis13-CLA suggère une synthèse accrue pendant cette phase chez les mères. L'expérimentation d'une durée de 3 semaines, inclut 2 lots de 5 rates gestantes nourries pendant 3 semaines avec un régime supplémenté ou non en acide trans-vaccénique. L'administration du régime débutera au 14ème jour

de gestation, et se poursuivra 2 semaines après la mise bas sur les 2 lots de 5 rates allaitantes et 3 ratons issus de chacune des portées (soit 30 ratons).

Le projet est conçu pour respecter la règle des 3R. Une étude in vivo est nécessaire pour la mise en évidence de la voie de synthèse endogène et des effets du trans11,cis13-CLA chez le mammifère. Le nombre d'animaux dans chaque groupe est réduit au maximum mais est néanmoins suffisant pour une analyse statistique (Réduire). Les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter les signes de stress ou les comportements anormaux et l'absence de pathologie. Une attention particulière sera portée à la limitation du stress au moment de la mise bas et pour éviter un isolement des ratons nouveau-nés (Raffiner).

3257. Les formules infantiles (FI) constituent la seule alternative à l'allaitement maternel des nourrissons. L'offre est pléthorique puisque l'on compte plus de 160 variétés sur le marché français. Cependant, ces FI ne parviennent pas à mimer tous les effets physiologiques du lait maternel. Parmi les améliorations envisageables afin d'optimiser la santé des nourrissons, il semble pertinent de s'intéresser à l'origine des matières grasses (MG) utilisées dans les FI. En effet, les FI actuelles sont en grande majorité élaborées à partir d'un mélange d'huiles végétales ; seules certaines FI utilisent un mélange d'huiles végétales et de matière grasse laitière (MGL). L'incorporation de MGL permet d'obtenir un profil de MG plus proche de celui du lait maternel, aussi bien en termes de composition que de structure.

Les bénéfices de l'incorporation de MGL dans les FI ont été étayés par des études menées chez l'homme et l'animal (modèles rongeur et porc). En particulier, des résultats récents ont mis en évidence l'importance de la nature des lipides des FI sur la digestion, la physiologie de l'intestin et le microbiote du porcelet utilisé comme modèle du nouveau-né humain. Ces résultats se doivent aujourd'hui d'être confirmés et approfondis, notamment par l'étude des conséquences de l'incorporation de MGL dans les FI sur la santé métabolique de l'individu à court et long termes.

L'objectif de ce projet de recherche est d'évaluer les bénéfices santé à court et long termes de FI contenant de la MGL associée ou non avec des probiotiques.

Ce projet comprend trois étapes principales.

Les deux premières consisteront en l'étude à court et long termes des effets de l'incorporation de MGL dans des FI (supplémentées ou non en probiotiques), sur la digestion, les propriétés fonctionnelles et régulatrices de l'intestin et le métabolisme glucidique de l'individu.

Trois FI seront testées et les effectifs prévus sont de 60 porcs (20 animaux par FI, 10 pour le court terme et 10 pour le long terme).

La troisième étape consistera en l'étude des effets de l'incorporation de la MGL sur les profils sanguins après un repas. Deux FI seront testées, à savoir la formule témoin et la formule expérimentale s'étant révélée la plus discriminante lors des deux premières étapes (n=10 animaux par FI).

Le protocole a été élaboré dans le respect de la règle éthique des 3R : (1) Remplacer : le projet s'intéressant à des réponses physiologiques, l'utilisation d'un modèle animal vivant est indispensable. Le modèle animal choisi est le porcelet, pour sa ressemblance d'un point de vue anatomique et physiologique avec le nouveau-né humain ; (2) Réduire : les effectifs (n=10 par groupe et stade) ont été fixés a minima pour permettre une évaluation statistiquement significative des effets attendus (réponses métaboliques) ; (3) Raffiner : les compétences et expériences des expérimentateurs garantissent le respect du bien-être animal. Des points limites ont été établis, entraînant la sortie de protocole ou l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

3258. Les travaux de recherche entrepris au sein de notre équipe de recherche visent à étudier la plasticité structurale et cellulaire de l'hypothalamus au cours du développement embryonnaire et postnatal et à en évaluer le rôle fonctionnel sur deux fonctions physiologiques majeures : l'homéostasie énergétique et la reproduction. Notre objectif principal est de développer nos connaissances sur les modes de communication entre cellules gliales, cellules endothéliales et neurones, ainsi que d'en mesurer la portée à la fois sur le plan cellulaire (migration neuronale, plasticité neurogliale, neurosécrétion,...) et physiologique (fonction de reproduction et homéostasie énergétique). Par ailleurs, nous étudions l'impact de la nutrition et du milieu hormonal périnatale sur le métabolisme et la mise en place des circuits hypothalamiques régulant la masse corporelle et l'adiposité et l'apparition de la puberté ainsi que l'impact de la nutrition adulte sur les phénomènes d'hormonorésistance conduisant à l'obésité, au diabète de type 2 et à l'infertilité, mais aussi au développement de maladies neurodéveloppementales et neurodégénératives. Dans le projet ici énoncé seront utilisés 130 rats (souche Sprague Dawley) et 8850 souris (souches C57Bl6, B6D2 et FVB). La nature de notre recherche qui vise à explorer des processus physiologiques et physiopathologiques de grandes fonctions telles que la reproduction, la régulation de l'équilibre énergétique et la cognition limitent sérieusement la possibilité de REMPLACER les animaux utilisés (par exemple, le remplacement des modèles animaux par des systèmes cellulaires ou de tissus n'est pas envisageable). Cependant, la mise en œuvre des axes de recherche énoncés dans ce protocole vont créer de nouvelles connaissances et approches méthodologiques qui pourront permettre (dans une certaine mesure) de modéliser certains aspects des phénomènes et de créer de nouvelles connaissances et compétences méthodologiques qui pourraient permettre l'incorporation d'approches in vitro, voir in silico. En outre, d'énormes efforts seront faits pour REDUIRE le nombre d'animaux utilisés à un minimum possible. Cela a été / sera accompli par (i) l'analyse de la puissance statistique et la définition de la taille minimale des groupes expérimentaux à utiliser pour obtenir des résultats probants, qui seront ajustés en fonction des différentes variables, elles-mêmes évaluées dans chaque expérience et (ii) la coordination des études à leur conception afin de permettre la collecte de plusieurs échantillons / tissus chez les mêmes individus ou d'entreprendre des analyses multiples chez des animaux individuels chaque fois que possible. De plus, une attention

particulière a été accordée au principe de RAFFINEMENT, en améliorant par exemple les différentes procédures expérimentales à appliquer aux animaux, afin de minimiser l'inconfort ou les souffrances inutiles qu'ils pourraient endurer au cours des manipulations expérimentales.

3259. Les lésions ligamentaires du genou constituent une cause importante de l'arthrose du genou dans un contexte post-traumatique. Elles surviennent en particulier dans la pratique des sports de pivot (ski) avec une atteinte préférentielle du ligament croisé antérieur (LCA). Selon la Société Française d'Arthroscopie en 2001, l'incidence de rupture du LCA dans la population générale est estimée à 2/1000 habitants par an, et 15000 ruptures nécessitent une intervention chirurgicale par ligamentoplastie chaque année en France.

L'effet des ruptures du LCA entraîne à court terme l'apparition d'une instabilité responsable de lésions méniscales et cartilagineuses et à long terme une arthrose à 10 ans. L'arthrose se caractérise par la dégradation progressive irréversible du cartilage articulaire et des tissus péri-articulaires. Cette affection potentiellement invalidante se traduit par une douleur chronique, une raideur et une déformation articulaire.

Actuellement, le traitement de référence des ruptures du LCA repose sur le remplacement du ligament lésé par un autogreffon (utilisation de tendons ou d'un ligament situé à proximité du genou). Aucun greffon n'a actuellement prouvé sa supériorité avec globalement un pourcentage de succès allant de 75% à 90%. Le taux d'échec (échec technique, nouveau traumatisme, faillite de l'ancrage osseux du greffon ou propriétés mécaniques insuffisantes de celui-ci) est de l'ordre de 20%. De plus, viennent s'ajouter les complications potentielles liées au traumatisme généré par le prélèvement du tendon ou du ligament de voisinage (hématome, fracture de rotule, infection).

L'utilisation de ligaments artificiels ne constitue pour l'instant une alternative à celle de l'autogreffe que dans un petit nombre de cas (lors de ré-interventions où il n'est plus possible de prélever de greffon). De nombreuses complications à long terme sont en effet rapportées : persistance d'une instabilité articulaire responsable d'une rupture du ligament artificiel, des inflammations articulaires générées par les débris d'usure. Nous nous proposons d'évaluer dans ce travail un nouveau ligament en fibres d'hydrogel (composant utilisé depuis plusieurs années en clinique dans la réparation des ménisques). Les propriétés de ces fibres confèrent à ce ligament des propriétés mécaniques similaires à celle du ligament naturel en termes d'élasticité et de résistance à la rupture et une bonne résistance à l'usure.

Ce projet vise donc à évaluer un ligament artificiel à base de fibres d'hydrogel dans un modèle de remplacement ligamentaire chez le lapin afin d'évaluer sa tolérance locale (inflammation), sa résistance à l'usure et son impact éventuel sur l'évolution de l'arthrose. Les résultats obtenus seront comparés chez chaque animal à ceux obtenus lors du remplacement du ligament par un autogreffon (le traitement de référence constituera notre groupe contrôle).

Cette évaluation ne peut se faire que chez l'animal, car elle nécessite une articulation entière arthrosique. Le modèle expérimental retenu est un modèle chirurgical par rupture du LCA chez le lapin, car il est adapté pour notre étude et bien décrit dans la littérature. Vingt-sept lapins blancs de Nouvelle-Zélande seront utilisés, ce qui est le minimum indispensable pour une interprétation statistique des données ; et qui tient compte de la faible probabilité de perte d'un animal (morbidity et mortalité du modèle faible) et de la variabilité limitée des réponses.

Les interventions chirurgicales seront réalisées par un chirurgien orthopédiste assisté de chirurgiens vétérinaires et les animaux recevront systématiquement un traitement anti-douleur avant, pendant et après l'opération. Des soins post-opératoires adaptés à l'espèce seront mis en place, deux fois par jour, afin d'assurer leur rétablissement rapide. Ils seront hébergés dans des cages équipées adaptées à l'espèce.

La mise à mort des animaux sera effectuée suivant les bonnes pratiques relatives à l'espèce (injection létale intraveineuse).

3260. La fibrose hépatique est la résultante commune aux maladies chroniques du foie. Sa progression conduit généralement à la cirrhose. Le diagnostic et l'évaluation du degré de la fibrose hépatique, requis pour la prise en charge des patients, repose essentiellement sur des tests sanguins et la ponction-biopsie hépatique, particulièrement invasive.

Dans ce contexte, nous proposons de développer et d'évaluer un diagnostic non-invasif de la fibrose hépatique chez le lapin par une imagerie ultrasonore :

1) D'établir la faisabilité de l'établissement d'une fibrose hépatique à différents stades d'évolution (léger à sévère) par injections chroniques de tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) chez le lapin mâle, New Zealand.

2) De classer ces différents foies selon leurs stades d'évolution (léger à sévère) par imagerie ultrasonore des microstructures tissulaires. L'imagerie ultrasonore sera effectuée avec deux types de sondes ultrasonores. Nous souhaitons corréliser les tailles et les concentrations des structures tissulaires estimées par imagerie ultrasonore à celles observées en histologie sur des ponctions hépatiques. Cette méthode d'imagerie ultrasonore pourrait alors être un outil prometteur pour classer les cirrhoses hépatiques de façon non-invasive.

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

Remplacement: Dans une première approche expérimentale, nous avons réalisé des expériences de simulations dont les résultats sont particulièrement encourageants et nécessitent d'être validés avec un modèle préclinique pertinent. 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.

Réduction: Une première étude de faisabilité des procédures d'induction de la fibrose hépatique et de caractérisation de la fibrose hépatique par imagerie ultrasonore sera réalisée sur 10 lapins. Si l'étude de faisabilité est concluante, l'expérience sera poursuivie sur 10 lapins supplémentaires, soit un nombre total de 20 lapins. Le nombre restreint d'animaux examinés dans chacune des classes de pathologie induite permettra de mettre en évidence la faisabilité de nos approches en montrant qu'une

corrélation existe entre les paramètres que l'on extrait et la nature des tissus. Selon les résultats obtenus, une étude de plus grande ampleur pourra ultérieurement être mise en place.

Raffinement: Les lapins seront hébergés individuellement en présence d'un objet d'enrichissement (morceaux de carton). Les animaux atteints d'une fibrose hépatique seront observés deux fois par jour.

3261. Le cancer de la vessie est le cancer urologique le plus fréquent après celui de la prostate. Touchant principalement les hommes après 50 ans, ce cancer est d'autant mieux traité qu'il est détecté tôt. Le nombre de cas de cancers de la vessie en France augmente et son incidence le place au 6ème rang par sa fréquence. On compte aujourd'hui près de 10 000 nouveaux cas par an et il représente 3,5% des décès par cancer. Il existe différents types de tumeur maligne de la vessie. Le carcinome transitionnel est la forme la plus fréquente (90 % des cancers de la vessie) suivi par le carcinome épidermoïde (7 %) et l'adénocarcinome (1 %). Les lésions non carcinomateuses correspondent aux lymphomes, sarcomes et tumeurs neuro-endocrines de la vessie dont le traitement diffère des carcinomes.

La paroi interne de la vessie est tapissée de cellules transitionnelles qui sont à l'origine de la plupart des cancers de la vessie. L'évolution et la prise en charge dépendent beaucoup du caractère invasif de la tumeur. On distingue le cancer superficiel de la vessie du cancer invasif, lequel, plus agressif, nécessite des traitements plus lourds. Le traitement des tumeurs de la vessie dépend de leur nature et de leur caractère infiltrant ou non et métastatique ou non. Les moyens thérapeutiques sont la chirurgie, la radiothérapie externe, la chimiothérapie et l'immunothérapie avec traitement endo-vésical ou systémique.

Si le cancer superficiel reste de bon pronostic, le risque de rechute suite à l'ablation des tumeurs par les voies naturelles reste élevé, ceci étant dû, en partie, aux tumeurs résiduelles non détectables par endoscopie conventionnelle. C'est pourquoi, une nouvelle technique consiste à procéder à une ablation chirurgicale guidée par la fluorescence de molécules photoactivables (appelées photosensibilisateurs) localisées préférentiellement dans les lésions tumorales. La molécule ayant reçu l'AMM en 2005 pour ce type de procédure est l'Hexvix® (h-ALA), une pro-drogue à base d'acide 5-aminolévulinique qui est métabolisée en un produit fluorescent (protoporphyrin IX) au niveau des tumeurs. Cependant, malgré le taux de tumeurs résiduelles significativement inférieur obtenu par cette méthode, le nombre de faux positifs est plus élevé que lors d'une ablation chirurgicale classique. Ceci peut être imputé à l'imparfaite sélectivité tumorale du photosensibilisateur. D'autres inconvénients comme la fluorescence restreinte aux couches superficielles des tissus et la photodégradation rapide de la molécule incitent à rechercher des molécules plus performantes.

L'objectif de ce projet est d'évaluer la distribution de nouveaux photosensibilisateurs sur tumeur et tissu sain (urothélium et muscle) chez le rat, ce qui ne peut-être réalisé sur des modèles *in vitro* ou *in silico* (remplacement). Au maximum, 68 rats femelles Fischer 344 seront utilisés pour ce projet, répartis en groupes de 4 à 6 animaux. Les animaux seront placés à 2 par cage, sans enrichissement du milieu pour comparer les résultats avec de précédentes études effectuées dans les mêmes conditions. Cinq nouvelles molécules (PC-19, ALA-W, ALA-X, ALA-Y et ALA-Z) seront testées en comparaison avec la molécule de référence (h-ALA), administrées par instillation vésicale (par les voies naturelles) à 1 concentration et avec 2 temps d'incubation (0 et 2 heures) sur des tumeurs orthotopiques de vessie induites chez ces animaux 10 jours auparavant. Les nouveaux composés qui seront testés ne sont pas génotoxiques pour les cellules, pas toxiques pour les animaux aux doses testées, et ils n'induisent pas d'allergie.

L'induction de tumeurs de vessie est effectuée sous anesthésie par abrasion de la surface de la vessie sur une zone limitée dans l'axe de la vessie à l'aide d'un abraseur introduit par l'intermédiaire d'un cathéter placé dans les voies naturelles (urètre) suivie de l'instillation vésicale de cellules tumorales de vessie d'origine murine. Dix jours après induction des tumeurs vésicales, les animaux sont à nouveau anesthésiés et chaque composé à tester est administré dans la vessie (instillation) par l'intermédiaire d'un cathéter placé dans l'urètre et laissé au contact de la vessie pendant 0 ou 2 heures avant la mise à mort des animaux par injection d'une surdose d'anesthésique. La vessie est alors prélevée est congelée dans de l'azote liquide pour effectuer les analyses en microscopie de fluorescence après réalisation de coupes à froid (cryostat). Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduction) mais de permettre une approche statistique des résultats obtenus, les groupes seront constitués au départ de 4 rats, chaque animal étant son propre témoin. Si 3 animaux sur 4 présentent une différence significative de distribution entre tissu tumoral et tissu sain, 2 autres animaux seront ajoutés. Les analyses seront effectuées à un stade de développement des tumeurs non invasif ce qui limite l'impact de la maladie sur l'animal (raffinement). Pour supprimer la douleur induite éventuellement par l'induction des tumeurs vésicales, les animaux recevront deux injections sous-cutanées de Buprénorphine sous anesthésie à la fin de l'induction tumorale et 24 heures après induction tumorale. Les points limites suivis seront l'évolution pondérale des animaux, leur état physiologique (activité, posture, état de la fourrure, tremblements...) et leurs consommations alimentaire et hydrique. En cas d'atteinte d'un point limite, les animaux seront mis à mort par une méthode en conformité avec les recommandations éthiques (injection d'une surdose d'anesthésique).

3262. La myopathie de Duchenne est une maladie génétique qui touche le muscle chez l'enfant, provoquant une faiblesse musculaire généralisée et évolutive. Les patients sont contraints à l'usage permanent du fauteuil roulant vers l'âge de 10 ans et décèdent prématurément d'insuffisance respiratoire ou cardiaque vers l'âge de 30 ans. Il n'existe pas à ce jour de solution thérapeutique pour la myopathie de Duchenne. Il existe différents modèles de cette maladie pour travailler en amont sur l'élaboration de médicaments, des modèles *in vitro* (myoblastes, myotubes) aux modèles animaux. Toutefois seul le contexte du chien atteint spontanément par cette même maladie, le chien GRMD (golden retriever muscular dystrophy), reproduit de manière fidèle ses manifestations cliniques. Lorsqu'un médicament a fait ses preuves sur des modèles *in vitro* puis dans le modèle murin, et qu'il a des chances importantes d'arriver au chevet du malade, son efficacité chez le chien GRMD permet

d'envisager un passage en clinique prometteur, du fait de la valeur translationnelle forte des données obtenues chez les chiens.

C'est le cas du Riméporide, molécule qui sera testée dans ce projet. Cette molécule est un inhibiteur d'un échangeur sodium-proton qui a montré des effets très positifs sur des myotubes en culture (modèles in vitro) : diminution du pH (anormalement élevé dans les muscles des malades), et régulation des influx de sodium et de calcium (dérégulés chez les malades). Chez la souris et le hamster souffrant de cardiomyopathie, des effets positifs respectivement sur la fonction musculaire et cardiaque ont été identifiés, mais ils doivent être confirmés dans un contexte pathologique plus proche du contexte humain, tel que celui du chien GRMD. Notre projet a pour objectif d'étudier l'effet du riméporide administré chroniquement (6 mois de traitement) à un stade avancé de la maladie : dysfonctions locomotrice et respiratoire présentes, début de la cardiomyopathie. L'objectif est de déterminer si un traitement par cette molécule pourrait avoir un effet sur des patients âgés de plus de 10 ans. Cette étude devra déterminer si le riméporide est capable d'améliorer la locomotion et la fonction respiratoire à un stade auquel elles sont déjà altérées, et de prévenir l'évolution de la cardiomyopathie. Ainsi les résultats obtenus permettront d'orienter le positionnement de cette molécule en clinique (âge et organe ciblés).

Six chiens GRMD seront inclus dans ce projet et recevront 10 mg/kg/j de rimpéoride par voie orale durant 6 mois, de l'âge de 12 mois à l'âge de 18 mois. Les données obtenues seront comparées à nos données déjà disponibles sur des chiens non traités, ce qui permettra d'éviter d'inclure un groupe placebo.

Des tests fonctionnels non invasifs (tests locomoteurs, respiratoires, cardiaques, imagerie RMN) seront réalisés de manière itérative durant les six mois de traitement afin de suivre au plus près l'évolution clinique des animaux et de collecter autant d'informations que possible sur un nombre d'animaux réduit (réduction). A l'issue de l'étude, les chiens seront euthanasiés et différents échantillons de tissus musculaires striés squelettiques et cardiaques seront prélevés.

Le chien GRMD est un modèle de myopathie de Duchenne incontournable au stade préclinique, mais l'utilisation de ces animaux requiert une expertise dans leur maintien, des soins spécifiques qui leur sont nécessaires pour leur permettre de mener une vie dans les meilleures conditions possibles, tout en ayant défini des points limites extrêmement précis et suffisamment précoces pour éviter à ces animaux toute souffrance prolongée.

3263. L'enrichissement du milieu est un facteur de bien-être pour les animaux en expérimentation qui sont amenés à rester un temps plus ou moins prolongé dans leur cage d'habitation.

L'annexe II de l'Arrêté du 1er février 2013 (J.O. R.F., Texte 30/130, 07/02/13) à propos des exigences relatives aux établissements et des exigences relatives aux soins et à l'hébergement des animaux stipule à propos de l'enrichissement que tous les animaux doivent disposer d'un espace suffisant présentant une complexité adéquate pour leur permettre d'exprimer un large répertoire de comportements normaux. Ils doivent disposer d'un certain degré de contrôle sur leur environnement et d'une certaine liberté de choix afin d'éviter les comportements induits par le stress. Les établissements veillent à mettre en place des techniques d'enrichissement appropriées qui élargissent la gamme d'activités possibles des animaux et développent leurs capacités d'adaptation, en encourageant notamment l'exercice physique, l'exploration, la manipulation et les activités cognitives, en fonction des espèces. L'enrichissement environnemental dans les compartiments doit être adapté aux besoins spécifiques et individuels des animaux concernés. Les stratégies d'enrichissement dans les établissements doivent être régulièrement revues et mises à jour.

Il est donc nécessaire de mettre en place de l'enrichissement mais il ne faut pas que celui-ci modifie les résultats des études car un certain nombre de paramètres peuvent être modifiés par l'enrichissement comme : le poids (légère baisse due à une augmentation d'activité), les comportements alimentaire et hydrique, l'activité générale des animaux (plus importante, moins de repos), la température corporelle, les paramètres biologiques (corticotérostéone, interleukines...), le temps de cicatrisation, la production de lait, la reproduction, les fonctions cognitives et le métabolisme cérébral : beaucoup d'études ont en effet montré que l'enrichissement améliorait les performances cognitives et provoquait des effets cellulaires et moléculaires sur les modèles animaux des désordres du système nerveux central (Alzheimer, Parkinson, Stroke...).

L'objectif de notre projet est d'évaluer les performances de mémoire spatiale de rats ayant été préalablement mis en présence de différents enrichissements. Le labyrinthe aquatique de Morris (LAM) permettra d'évaluer ces performances pour déterminer les conditions optimales d'utilisation du test prenant en compte l'enrichissement du milieu requis par la nouvelle Directive Européenne.

Dans ce projet, 40 rats issus d'une précédente étude et ayant subi une procédure de classe modérée seront utilisés et répartis en 4 groupes de 10 animaux avec 2 rats par cage. Chaque groupe sera testé dans le LAM. Les groupes sont les suivants :

- Groupe 1 : Pas d'enrichissement
- Groupe 2 : Carton ciselé (enviro-dri)
- Groupe 3 : Briquettes de bois
- Groupe 4 : Tunnel rouge

Le poids, la prise alimentaire et hydrique seront relevés pendant toute la durée de l'expérimentation afin de recueillir un maximum d'information.

Après 15 jours en présence des différents enrichissements, Le LAM est mis en place. Déposé dans un bassin rempli d'eau à 20°C, le rat doit apprendre à s'orienter lors d'essais successifs à l'aide des indices présents dans la pièce pour localiser une plate-forme immergée et ainsi échapper au milieu aquatique aversif.

Le test se déroule sur 5 jours. Les quatre premiers jours, les animaux sont entraînés à retrouver la plate-forme immergée. La séance quotidienne sera constituée de quatre essais consécutifs. L'essai débute quand l'animal est déposé dans le bassin, face à la paroi, et s'arrête lorsque le rat se rétablit sur la plate-forme ; il y est laissé pendant 15 secondes avant de passer à l'essai

suisant. Si le rat ne trouve pas la plate-forme au bout de 60 secondes, l'essai est terminé et l'expérimentateur place alors l'animal sur la plate-forme pour 15 secondes.

Le cinquième jour, un test de rétention est réalisé en l'absence de la plate-forme dans le bassin. Un rat avec de bonnes performances de mémoire passera plus de temps à l'endroit où se trouvait précédemment la plate-forme.

Les animaux seront observés régulièrement tout au long de l'expérimentation et ceux présentant un comportement anormal (agressivité, cachexie, vocalises...) seront exclus de l'étude et mise à mort en conformité avec les recommandations éthiques

L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les performances de mémorisation des animaux car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) (remplacement). Les essais permettront de déterminer l'effet de différents enrichissements dans ce modèle, ce qui permettra à l'avenir de choisir un enrichissement et de l'inclure dans toute nouvelle étude de mémoire spatiale. Ainsi des résultats optimum seront obtenus en tenant compte du bien-être des animaux : Cela permettra également d'utiliser le nombre adéquat d'animaux dans les meilleures conditions et d'éviter d'utiliser trop (réduction) ou trop peu (raffinement) d'animaux pour permettre l'exploitation des résultats.

3264. 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 aiguë traumatique ». L'hémostase implique une interaction complexe entre les plaquettes et les facteurs de la coagulation, dont la thrombine constitue un élément central. L'objectif de cette étude est d'évaluer la fonction plaquettaire et la génération de thrombine en cas de coagulopathie traumatique. Une meilleure compréhension de ce phénomène complexe ouvrirait la voie à des thérapeutiques ciblant les mécanismes impliqués dans sa survenue.

Les expérimentations seront réalisées sur 48 animaux (rats Sprague Dawley) 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/analgésie.
- Il s'agit d'une étude sur une pathologie impliquant l'organisme dans son ensemble et pour laquelle le remplacement n'est pas possible

3265. La réparation osseuse à l'aide de matériaux synthétiques est un problème médical dont l'actualité croît avec l'augmentation de l'espérance de vie de la population. La mise en place de prothèses de ce type est la seule option thérapeutique pour les affections nécessitant le remplacement complet d'une articulation, car dans ce cas la greffe d'os issu du patient ou d'un donneur compatible est inenvisageable. Ces remplacements d'articulation sont pratiqués en routine pour l'arthrose de la hanche (150000 interventions par an en France) et du genou (50000/an) ou de manière plus rare pour des prothèses de disques intervertébraux. L'amélioration de la façon dont ces prothèses se fixent et sont colonisées par l'os (ostéo-intégration) sont un enjeu médical majeur pour les patients traités.

Notre projet adresse une série de questions fondamentales sur l'importance de l'ostéo-intégration d'un modèle d'implant métallique standardisé en fonction de (1) la possibilité donnée à des vaisseaux sanguins néo-formés de coloniser l'espace entre l'os et l'implant, (2) la rugosité de la surface de la prothèse, (3) le temps de cicatrisation, (4) la proximité initiale entre la prothèse et la surface de l'os, (5) l'état de l'os au moment de la pose de la prothèse, (6) l'effet de l'application de forces de tension différentes sur les bandes élastiques maintenant l'implant en position et (7) l'effet du changement de modèle d'animal. Pour ce projet, 84 lapins et 4 moutons seront utilisés.

Il n'est pas possible d'étudier les conséquences d'implantations de biomatériaux dans l'os sur des modèles cellulaires ou inertes en raison de l'effet combiné des forces exercées, de la forme de l'os, de l'irrigation du tissu osseux et sur l'ostéo-intégration elle-même (remplacement). Les effectifs des groupes expérimentaux varient entre 4 et 8 animaux (en fonction du site d'implantation des prothèses et du nombre de prothèses implantables par l'animal). Ce nombre est le minimum indispensable pour que les résultats puissent être exploités (réduction). Les animaux bénéficieront d'une couverture antalgique pendant tout la phase post-opératoire initiale. Dans notre expérience, une fois cette phase passée, leur comportement ne présente pas de signes manifestes de mal-être (raffinement).

3266. Le cancer du sein se situe au premier rang des cancers chez la femme (d'après la Ligue Contre le Cancer) puisque l'on décèle chaque année, 50 000 nouveaux cas en France. Cependant la mortalité de ce type de cancer diminue depuis 2000 grâce à la mise en place d'un dépistage plus précoce des tumeurs mammaires et à l'optimisation de leur prise en charge thérapeutique. Néanmoins, le taux de survie dépend de l'âge de la patiente ainsi que du stade du cancer lors du diagnostic, puisqu'une survie à 5 ans n'est observée que pour 23.3% des patientes atteintes d'un cancer du sein au stade métastatique (données Inserm). Le récepteur LRP-1 (low-density lipoprotein receptor-related protein-1) participe à de nombreux processus physiopathologiques. Cependant, son rôle précis dans le contexte des cancers demeure encore très fortement controversé et mal compris.

Par ailleurs, le remplacement des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas encore possible dans le domaine de l'oncologie. En effet, le développement d'une tumeur et de sa vascularisation sont des mécanismes complexes impliquant l'interaction entre de nombreux types cellulaires (cellules tumorales, endothéliales, stromales) et nombreux composants matriciels (collagène, fibronectine, protéoglycanes, etc), qui, pour être modélisés sur de réelles bases physiologiques et structurales, nous obligent de réaliser ces études chez l'animal. Cette étude préclinique nécessitera au maximum 120 animaux. Il s'agit là d'une appréciation globale du nombre d'animaux mais les expérimentations seront menées sous forme de séries consécutives afin d'ajuster le nombre d'animaux nécessaires en fonction des résultats observés (Réduction). En conformité avec la règle des 3R, le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les souris seront anesthésiées dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées (implantation de tumeur, imagerie), et mises à mort dès lors que l'un des points limites sera atteint (Raffinement).

De plus, nous utiliserons des techniques d'imagerie non invasive permettant de réduire les souffrances de l'animal (Raffinement) et le nombre d'animaux en réalisant des images de la tumeur et de de la vascularisation tumorale dans le temps sur un même animal (Réduction).

La réalisation de ce projet d'expérimentation animale permettra de mieux comprendre le rôle de LRP-1 dans le développement des cancers du sein in vivo.

3267. Depuis de nombreuses années, les caractères de production (croissance, nombre d'œufs, efficacité alimentaire...) ont été considérablement améliorés chez la poule pondeuse grâce à la sélection génétique ainsi qu'à l'amélioration de la qualité de l'aliment, des conditions d'élevage et de la prophylaxie. L'amélioration des performances semble avoir affaibli les fonctions immunitaires en raison d'un équilibre d'allocation métabolique compromis entre la production et la réponse immunitaire. A l'inverse, nous ne savons pas si l'amélioration de la réponse immunitaire des animaux peut avoir un impact négatif sur la croissance et la production des animaux. L'objectif de notre projet est donc de déterminer si la sélection pour augmenter des caractéristiques immunitaires est préjudiciable ou non pour les caractères de production. Plus précisément, l'effet de la sélection intensive pour des caractères immunitaires sur la croissance et la consommation alimentaire sera étudiée par comparaison d'une lignée 'ND3', sélectionnée depuis 1994 sur la réponse anticorps au vaccin contre la maladie de Newcastle, avec une lignée témoin issue de la même population d'origine, mais conservée sans sélection. Les comparaisons des systèmes immunitaires se feront au travers de différents paramètres comme les formules sanguines, les réponses vaccinales et l'expression des gènes du système immunitaire. Respect de la règle des 3R :

- Remplacer : Pour évaluer le lien entre immunité et digestion, il faut disposer des mesures sur les animaux et le modèle le plus adapté pour l'évaluer sur le poulet est le poulet lui-même

- Réduire: Les animaux seront issus du renouvellement de la lignée ce qui évite une production d'animaux supplémentaires. De plus, le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de cette expérience a été déterminé suite à des calculs statistiques.

- Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions comparables à celles des poulets d'élevage et les prises de sang limitées au strict minimum (3 fois) pour limiter leur stress L'effectif mis en œuvre est de 68 animaux (34 par lignée). Les cages, d'une surface de 2780 cm<sup>2</sup>, sont contiguës et grillagées, avec un système d'abreuvement et d'alimentation adapté à l'espèce. Les animaux peuvent se voir. De plus, les cages seront enrichies (grattoir, rondelles métalliques).

3268. Lors d'altérations continues des pressions et débits au sein des vaisseaux, ceux-ci développent une modification durable de leurs structures pour permettre de normaliser les changements hémodynamiques : le remodelage vasculaire. Il se traduit par une correction du diamètre interne du vaisseau et de son épaisseur de paroi. Ce remodelage a été principalement décrit au niveau artériel laissant un rôle passif à la veine.

Des études réalisées par de nombreuses équipes ont permis de mettre en évidence l'importance d'une source d'inflammation corrélée au remodelage. Notamment par l'augmentation d'un recrutement des neutrophiles et des macrophages participant à la dégradation de la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de métalloprotéases matricielles (MMP-9). Cependant, même si elles sont histologiquement et fonctionnellement différentes, une veine est toujours couplée à une artère. De plus, son bas débit rend possible un recrutement immunitaire. Dans ce cadre, nous voulons étudier si une interaction est possible entre la veine et l'artère par l'intermédiaire du système immunitaire. Cette collaboration sera étudiée lors du remodelage par augmentation chronique de débit, mais également lors de la mise en place de la pathologie à forte composante inflammatoire qu'est l'athérosclérose.

Nos hypothèses sont doubles. Il sera nécessaire de comprendre si la veine capte directement les modifications hémodynamiques puis interagit avec l'artère, ou si l'artère transmet d'abord l'information à la veine qui induira ensuite un recrutement immunitaire. Après avoir caractérisé l'interaction artério-veineuse, nous nous concentrerons sur la mise en place de celle-ci lors de l'athérosclérose. En bloquant spécifiquement la veine, nous pourrions étudier son effet sur l'évolution de la pathologie et faire de celle-ci une potentielle cible thérapeutique.

Pour l'étude de la formation de la plaque

Il y a 24 groupes

LDL +/- 3 mois sans régime WD

- Absence de cuff carotidien

o Aucune ligature : 20 Souris

o Ligature Jugulaire Gauche : 20 Souris

- Cuff (Sham)

o Aucune ligature : 20 Souris

- o Ligature Jugulaire Gauche : 20 Souris
- Cuff fermé
- o Aucune ligature : 20 Souris
- o Ligature Jugulaire Gauche : 20 Souris
- LDL +/+ 3 mois avec régime WD
- Absence de cuff carotidien
- o Aucune ligature : 20 Souris
- o Ligature Jugulaire Gauche : 20 Souris
- Cuff (Sham)
- o Aucune ligature : 20 Souris
- o Ligature Jugulaire Gauche : 20 Souris
- Cuff fermé
- o Aucune ligature : 20 Souris
- o Ligature Jugulaire Gauche : 20 Souris
- LDL -/- 3 mois sans régime WD
- Absence de cuff carotidien
- o Aucune ligature : 20 Souris
- o Ligature Jugulaire Gauche : 20 Souris
- Cuff (Sham)
- o Aucune ligature : 20 Souris
- o Ligature Jugulaire Gauche : 20 Souris
- Cuff fermé
- o Aucune ligature : 20 Souris
- o Ligature Jugulaire Gauche : 20 Souris
- LDL -/- 3 mois avec régime WD
- Absence de cuff carotidien
- o Aucune ligature : 20 Souris
- o Ligature Jugulaire Gauche : 20 Souris
- Cuff (Sham)
- o Aucune ligature : 20 Souris
- o Ligature Jugulaire Gauche : 20 Souris
- Cuff fermé
- o Aucune ligature : 20 Souris
- o Ligature Jugulaire Gauche : 20 Souris

Pour un total de 480 souris de 3 mois : 240 LDLr +/+ et 240 LDLr -/-

Seules les expériences indispensables seront réalisées. Il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience. Les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale complétée par une analgésie. Une analyse statistique des résultats sera réalisée (analyse de variance ANOVA suivie d'un test posthoc LSD).

3269. Des études épidémiologiques et expérimentales ont conduit à proposer l'hypothèse de l'origine fœtale des maladies de l'adulte. Ainsi, il est aujourd'hui bien admis qu'un environnement fœtal défavorable entraîne une perturbation des fonctions cardiovasculaires.

L'augmentation croissante du nombre de diabétiques dans le monde conduit à une augmentation du diabète maternel au cours de la grossesse. Afin d'étudier les conséquences d'une exposition in utero à un diabète maternel, des rates de la souche Sprague Dawley sont rendues diabétiques par injection de streptozotocine le premier jour de la gestation. Il s'agit d'une substance qui détruit les cellules  $\beta$  du pancréas (productrices d'insuline) et qui entraîne donc un diabète de type 1 chez ces femelles. Dans ce modèle, nous avons clairement identifié l'exposition in utero au diabète maternel comme facteur de risque du développement d'une hypertension artérielle à l'âge adulte chez la F1 (descendance directe). De plus, nous avons montré qu'il existait des modifications d'expression de gènes favorisant une vasoconstriction et un défaut de relaxation (modification de la réactivité des vaisseaux), ce qui pourraient être reliées au développement de l'hypertension artérielle chez ces animaux.

Les cellules s'adaptent aux changements environnementaux par l'altération de leur profil d'expression génique suite à la modification de la structure globale de l'ADN (compaction de zones normalement transcrites). Ainsi, les nouveaux profils obtenus peuvent perdurer et être héréditaires. Ces modifications d'information, transmissibles d'une génération à l'autre, sans modification de la séquence d'ADN sont considérées comme épigénétiques et pourraient se transmettre d'une génération à une autre (effets transgénérationnels).

Ce projet a donc pour objectif d'étudier si il existe une transmission des perturbations suite à l'exposition au diabète maternel des animaux de la F1 à la génération suivante (F2). Grâce à un suivi longitudinal des animaux F2, nous pourrions :

- 1) étudier l'évolution des paramètres biologiques (pression artérielle et fréquence cardiaque) et épigénétiques mais surtout leur variabilité.
- 2) étudier la réactivité des vaisseaux.

La souche Sprague Dawley est plus sensible au développement de pathologies cardiovasculaires que les autres souches. Pour générer le modèle, 20 accouplements seront réalisés (1 mâle pour 3 femelles). Puis 120 animaux F2 seront utilisés en expérimentation.

Accouplements primaires : 70 animaux (10 mâles et 60 femelles)

Expérimentation : 120 animaux F2

Chaque animal est manipulé calmement afin de ne pas l'effrayer et régulièrement pour favoriser le contact avec l'expérimentateur. Les rats sont placés 4 ou 5 par cage avec eau et boisson à volonté ainsi qu'un milieu d'enrichissement.

Concernant le nombre d'animaux utilisés, les études de réactivité vasculaire précédentes montrent qu'il faut un minimum de 10 animaux par groupe pour aboutir à une significativité si une différence devait apparaître (analyse ANOVA 2 facteurs). Quatre groupes d'animaux F2 seront étudiés provenant d'animaux F1 issus d'accouplement de mère contrôles (CMO) ou diabétiques (DMO) avec des mâles contrôles.

Les 4 groupes générés à partir des animaux CMO et DMO F1 seront : descendants F2 de mâles et femelles CMO (F2-CMO), descendants F2 de mâles et femelles DMO (F2-DMO), descendants F2 de mâles DMO (F2-DMO-M), descendants F2 de femelles DMO (F2-DMO-F).

Nous appliquons la règle des 3 R:

REMPACER

Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle in vitro

REDUIRE

Nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Le nombre d'animaux par groupe est de 10 .

RAFFINER

Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 4) suivant l'âge et le poids des animaux de plus les cages sont enrichies par des jouets (rouleau sopalin, copeaux)

Les animaux sont surveillés au quotidien par le personnel de l'animalerie et le poids est suivi 2 fois par semaine

3270. Le virus VIH, responsable du SIDA chez l'homme, se réplique préférentiellement dans les cellules immunitaires de l'intestin. Il cause une altération de la barrière immunitaire à ce niveau. Cela entraîne chez les individus infectés le passage de produits bactériens de la flore intestinale dans le sang, ce qui est responsable d'une activation du système immunitaire généralisée à tout l'organisme.

Ces individus peuvent bénéficier d'un traitement antirétroviral. Un des buts de ce traitement est de reconstituer les défenses immunitaires altérées au cours de l'infection, notamment les lymphocytes T CD4+. Néanmoins, les lymphocytes T CD4+ semblent ne pas se reconstituer aussi bien dans l'intestin que dans le sang. Ce défaut contribue à la persistance de l'inflammation généralisée observée chez les patients traités pour leur infection par le VIH-1.

Ce défaut de reconstitution des lymphocytes T CD4+ intestinaux pourrait être dû à une perturbation des mécanismes qui guident la migration des lymphocytes du sang vers l'intestin. Les lymphocytes expriment à leur surface un récepteur, dit CCR9, qui reconnaît une molécule CCL25 qui est normalement produite par les cellules de la muqueuse intestinale. Une production réduite de la chimiokine CCL25 dans l'intestin de ces individus est un des mécanismes décrits pour expliquer le défaut de migration des lymphocytes T CD4+CCR9+ du sang vers l'intestin.

Ce projet vise à démontrer qu'un traitement délivrant le CCL25 manquant au niveau de la muqueuse intestinale pourrait permettre de corriger le défaut de migration des lymphocytes T CD4+CCR9+.

Pour cela nous utiliserons ; des souris receveuses n'exprimant plus CCL25 et des souris donneuses dont on prélèvera la rate afin d'en récupérer les lymphocytes. Nous avons choisi de travailler sur le modèle murin car il s'agit du seul modèle d'étude n'exprimant plus CCL25.

Nous allons donc, chez 60 souris receveuses, leur apporter par voie digestive des lactobacilles (bactéries alimentaires) modifiés pour produire CCL25. Cet apport de CCL25 nous permettra de voir si on peut améliorer le recrutement de lymphocytes T CD4+CCR9+ au niveau de l'intestin. Les 60 souris receveuses ont une immunité intestinale incomplète mais cela ne cause pas de souffrance chez ces animaux. De même, l'apport des lactobacilles producteurs de CCL25 n'a pas d'impact délétère chez ces animaux.

Afin de pouvoir suivre la migration des lymphocytes recrutés du sang vers l'intestin des souris sous l'influence de CCL25, nous leur injecterons des lymphocytes marqués (marqueur fluorescent ou radio-visible), provenant de souris donneuses, permettant de les distinguer des autres lymphocytes de l'animal.

Une expérience comprend 6 souris receveuses et 10 souris donneuses, nous reproduirons l'expérience 10 fois, nous permettant l'étude statistique de nos résultats. Si nous avons le besoin de reproduire les expériences nous pourrions utiliser jusqu'à 800 souris en 5 ans.

Notre protocole d'expérimentation est adapté au suivi des animaux afin de s'assurer de leur bien-être. Chaque jour, nous nous assurerons de leur aspect général et de leur comportement. Si une souffrance devait apparaître chez un animal, des mesures seraient prises pour la réduire (ex : modification de l'habitat, utilisation d'anesthésiant lors de l'expérimentation) pouvant aller jusqu'à l'arrêt de l'expérimentation.

3271. Les glioblastomes (OMS Grade IV) constituent les tumeurs primitives du système nerveux central les plus fréquentes chez l'adulte. Ces tumeurs d'origine gliale sont aujourd'hui de très sombre pronostic avec une survie médiane des patients à 15 mois après le diagnostic. La thérapeutique actuelle consiste, lorsque c'est possible, en une exérèse chirurgicale suivie d'un

traitement de radio et/ou chimiothérapie. En dépit des efforts considérables portés ces dernières années sur la prise en charge des glioblastomes, force est de constater que la stratégie thérapeutique est en échec. Plusieurs facteurs interviennent pour expliquer cela.

Premièrement, les symptômes associés ne surviennent que lorsque la tumeur occupe déjà une place très importante dans le tissu cérébral. Ceci rend la prise en charge complexe et tardive. Il est donc nécessaire de développer des approches diagnostiques permettant une détection précoce de la pathologie.

D'autre part, les vaisseaux sanguins qui alimentent le cerveau sont imperméables à la plupart des molécules. On parle de ce phénomène comme une véritable barrière : la barrière hémato-encéphalique (BHE). Si la fonction première de ce mécanisme est bien de protéger le cerveau en condition normale, cela devient un problème en situation pathologique pour délivrer au cerveau des médicaments par voie sanguine. Dans le contexte d'une chimiothérapie, plusieurs études scientifiques ont aujourd'hui montré que, lors d'un traitement par voie générale, une infime partie seulement des drogues parvient spécifiquement à la tumeur. Cela explique les très nombreux effets secondaires qui surviennent au cours des traitements et leur faible efficacité thérapeutique.

Au cours des 10 dernières années, la physique médicale a permis la mise au point d'émetteurs d'ultrasons (US) focalisés permettant d'ouvrir la BHE de manière localisée, contrôlée et transitoire.

Ce projet propose d'utiliser les US focalisés pour ouvrir la BHE, non seulement de manière à délivrer des drogues administrées par voie sanguine dans le cerveau, mais aussi afin de permettre à des molécules d'intérêt qui sont présentes dans les territoires tumoraux et qui peuvent servir de biomarqueurs de « sortir » dans le compartiment sanguin dans lequel on peut les détecter par différentes techniques de biologie.

L'utilisation de 285 rats issus de deux souches différentes doit permettre d'aboutir à des résultats significatifs pour l'identification de biomarqueurs. Le recours à un modèle animal est indispensable pour cette étude dans la mesure où aucun modèle alternatif complexe n'est actuellement disponible pour répondre aux questions posées. Les expérimentateurs prennent en compte des effectifs suffisants pour conclure significativement quels que soient les aléas expérimentaux, tout en mutualisant les groupes témoins afin de réduire le nombre d'animaux concernés. Enfin, le recul important du laboratoire sur les modèles de tumeur chez le rat permet une prise en charge efficace de la douleur par des traitements antalgiques et le choix de points limites adaptés afin d'éviter toute souffrance animale.

3272. Dans les pays occidentaux, l'accident vasculaire cérébral (AVC) est une cause majeure de handicap acquis de l'adulte, la deuxième cause de démence après la maladie d'Alzheimer et la troisième cause de mortalité. L'insuffisance rénale chronique (IRC) favorise la survenue d'AVC et est à l'origine de complications neurologiques et d'affections cognitives qui appauvrissent la qualité de vie des patients et sont associées à un risque accru de mortalité. Les atteintes peuvent être motrices, sensitives, sensorielles et cognitives (avec notamment des troubles de la mémoire) et sont souvent associées à des syndromes dépressifs. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement de l'AVC en dehors de la thrombolyse et des traitements administrés en prévention secondaire. La prévention et le traitement des atteintes ischémiques conséquentes à la survenue de l'AVC sont donc des considérations importantes dans la prise en charge de personnes atteintes d'IRC.

L'aldostérone pourrait contribuer à la sévérité des atteintes ischémiques. En effet de nombreuses études indiquent que, outre son rôle dans l'homéostasie hydrosodée et le contrôle de la pression artérielle, l'aldostérone peut jouer un rôle dans la dysfonction endothéliale, les calcifications vasculaires et les atteintes ischémiques cérébrales.

Le but du présent projet est d'évaluer le rôle de l'aldostérone dans la sévérité des atteintes ischémiques post-AVC chez la souris au cours de l'insuffisance rénale chronique (IRC).

Pour répondre à cet objectif nous travaillerons sur des souris C57BL6J atteintes d'IRC (souris IRC) ou des souris contrôles (souris SHAM), traitées soit par spironolactone (un antagoniste du récepteur de l'aldostérone) soit par une molécule placebo. Les souris seront donc réparties en quatre groupes : SHAM placebo (n=50), SHAM spironolactone (n=50), IRC placebo (n=58), IRC spironolactone (n=58). Après six semaines de traitements, les souris subiront un AVC. Le comportement et les capacités motrices des souris seront analysés avant et après induction de l'AVC et les cerveaux des souris seront étudiés post-mortem afin de déterminer si l'antagonisme du récepteur à l'aldostérone influence la sévérité des dommages ischémiques post-AVC au cours de l'IRC.

La complexité des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'IRC et les AVC ne permettant pas les études *in silico*, ces expériences ne peuvent à l'heure actuelle être réalisées que par l'intermédiaire de modèles animaux. Notre choix s'est porté sur un modèle de souris car notre laboratoire possède une grande expérience des modèles d'IRC et d'AVC chez la souris. Ces modèles ont fait l'objet de plusieurs publications internationales et sont reconnus par la communauté scientifique.

Le nombre d'animaux nécessaire à l'étude (n=236) est maintenu au minimum pour permettre une analyse statistique des résultats et éviter une impossibilité de conclure par manque d'animaux dans des groupes expérimentaux.

Toutes les précautions d'usage en termes d'analgésie et d'anesthésie seront prises afin de soulager et limiter la douleur des animaux lors des différentes expériences. Ainsi, après chaque chirurgie, les souris recevront une injection sous cutanée d'un antalgique opiacé et seront placées sur une couverture chauffante jusqu'à leur réveil. L'administration de l'antalgique sera répétée 6 à 8 heures après la première administration si les animaux montrent des signes de douleurs. La plus grande attention sera portée afin d'éviter la survenue de douleurs et de stress chez les animaux tout au long du protocole. Ainsi, après chaque chirurgie, l'état général des souris sera surveillé par une pesée (journalière dans la semaine post-chirurgie puis semi-hebdomadaire) et la recherche de signes de souffrance (observation visuelle, sept jours sur sept). La plus grande attention sera portée afin d'éviter la survenue de douleurs et de stress chez les animaux.

3273. Un nouveau symptôme appelé «hypersensibilité électromagnétique» ou «électrosensibilité» aux champs électromagnétiques se manifesterait par différents troubles (fatigue, irritabilité, troubles du sommeil, maux de tête...) au sein d'une faible proportion de la population. Dans ce contexte, une précédente étude a montré que des rats exposés à un champ radiofréquence (RF) de type antenne relais durant 5 semaines, présentaient une fragmentation du sommeil paradoxal, une augmentation de la prise alimentaire et le maintien d'une vasoconstriction périphérique lorsque les animaux sont soumis à une température d'air de 31°C mais pas à la température d'air de 24°C.

L'exposition de longue durée aux ondes RF serait donc ressentie comme une contrainte environnementale qui provoquerait un ensemble de réponses adaptatives dont le but serait d'optimiser la conservation de l'énergie. Actuellement, on ne peut pas conclure si les réponses induites par cette activation peuvent conduire à des dommages qui seraient, à terme, délétères pour l'organisme. Ces réponses peuvent ne pas être délétères afin d'assurer au mieux les fonctions, les besoins et le développement de l'organisme. Dans ce cas, l'animal s'adaptera à cet environnement sans chercher à l'éviter. Dans le cas contraire, dès qu'il ressentira la contrainte, l'animal cherchera un environnement optimal plus favorable, s'il en a la possibilité (stratégie de retrait ou d'évitement).

L'objectif de ce projet est de déterminer si les réponses adaptatives observées dans l'étude précédente, représentent une contrainte importante et coûteuse pour l'organisme, que l'animal cherchera à éviter en recherchant un environnement plus favorable. Pour cela, les rats seront placés dans un dispositif comportant deux enceintes : une exposée aux ondes RF et l'autre non. Ainsi, l'animal sera libre de choisir l'enceinte qui lui est le plus favorable. En parallèle, le sommeil, la prise alimentaire et la température cutanée de la queue seront enregistrés afin de définir s'il y a une éventuelle stratégie d'adaptation dans le cas où l'animal n'évite pas l'exposition. Les animaux utilisés seront juvéniles car ce type de population est potentiellement plus sensible aux champs électromagnétiques de par un périmètre crânien plus petit et donc une zone de pénétration des ondes RF dans les masses cérébrales plus grande que chez un adulte.

L'espèce rat Wistar a été choisie car c'est une espèce reconnue et couramment utilisée pour les études comportementales pour lesquelles il n'existe pas de méthode alternative. Le nombre maximal de rats utilisés dans cette étude sera de 34 afin d'observer des résultats statistiquement significatifs.

3274. Le système immunitaire met en place des stratégies efficaces pour lutter contre les pathogènes grâce à une réponse adaptative protectrice. Dans le cas d'infection par staphylocoque, non seulement la réponse immune protectrice est méconnue mais aussi aucun vaccin n'est disponible actuellement alors que *Staphylocoque aureus* représente un problème majeur en santé public, en particulier chez les patients ayant subi un acte chirurgical, une pause de cathéter.... Comprendre comment ces mécanismes de contrôle fonctionnent, comprendre pourquoi dans certains cas ils ne fonctionnent pas, pouvoir prévenir certaines maladies infectieuses est la mission que nous nous donnons par l'étude spécifique des sentinelles de notre système immunitaire que sont les phagocytes mononucléés et leurs partenaires de la réponse immune adaptative, les lymphocytes T. En effet, comprendre leur immunobiologie permettra de mettre en place des stratégies pour mieux les contrôler, les cibler afin d'améliorer l'efficacité de notre système immunitaire.

Dans nos études précédentes, nous avons déterminé quels étaient les marqueurs clés pour distinguer les différentes populations de cellules dendritiques de l'épiderme (LCs, CD207+CD11b+), et du derme CD207+CD11b- (CD103- et CD103+), CD207-CD11b- et CD207-CD11b+. Nous avons poursuivi la caractérisation des cellules CD207-CD11b+ du derme afin de pouvoir distinguer les DCs, des monocytes et des macrophages. La diversité de ces populations ne peut pas être générée in vitro. En effet, il est possible de générer des cellules dendritiques à partir de précurseurs in vitro mais souvent leur signature génétique varie drastiquement par rapport aux « vraies » cellules extraites des tissus. Pour mieux comprendre le rôle de chacune de ces cellules dans la mise en place d'une immunité protectrice lors d'une infection il est important de réaliser des études in vivo. Dans le laboratoire, nous avons choisi de travailler sur la souris comme modèle animal car nous pouvons facilement les manipuler génétiquement et nous pouvons ainsi développer des modèles animaux dans lesquels nous pouvons contrôler l'expression de certains gènes par certaines de ces populations de cellules dendritiques, nous pouvons aussi dépléter spécifiquement l'une ou l'autre des populations et regarder quelles seront les conséquences sur la réponse immune.

Le projet que nous présentons consiste à :

- Etudier les conséquences d'une infection bactérienne, parasitaire ou fongique sur le recrutement, le phénotype et les fonctions des cellules phagocytaires mononucléées.
- Comprendre leur rôle dans l'activation des lymphocytes T in vivo à l'homéostasie ou suite à une infection bactérienne, parasitaire ou fongique.

Les animaux inclus dans les différentes procédures expérimentales seront utilisés en nombre suffisant pour permettre des analyses statistiques valides. Au total, nous avons estimé qu'environ 8736 animaux seront nécessaires pour finaliser l'étude décrite dans le projet.

En fonction de leur statut génétique, les souris seront suivies scrupuleusement par rapport à leur poids, l'aspect de leur peau. Pour toute expérience nécessitant une manipulation de l'animal, ceux-ci seront anesthésiés avec les méthodes adéquates. Lorsque le système immunitaire sera compromis, les souris seront traitées avec des antibiotiques (bactrim) et des anti-douleurs (ibuprofène)

Afin d'améliorer les conditions de vie des animaux, un enrichissement de leur milieu est mis en œuvre tel que du coton pour confectionner des nids et des dômes protecteurs

3275. Les dysfonctionnements du système nerveux central affectent un nombre croissant de personnes, notamment en raison du vieillissement de la population et de l'allongement de l'espérance de vie. Ceux-ci peuvent être traumatiques (e.g.,

accidents, lésions vasculaires), psychiques (e.g., autisme, dépression, anorexie, troubles bipolaires), neurodégénératifs (e.g., Parkinson, Alzheimer, Huntington), ou liés à des tumeurs (e.g., glioblastomes, médulloblastomes, neurinomes). De fait, il y a un enjeu majeur à développer des nouveaux traitements mais aussi à comprendre le fonctionnement de la structure biologique extrêmement complexe qu'est le cerveau.

Le développement de thérapies et d'examen réside entre autre dans des approches neurotechnologiques telles que les neuroprothèses (déjà utilisées en clinique avec la stimulation cérébrale profonde, les implants cochléaires, et actuellement les débuts des implants rétiniens) ou les interfaces cerveau-machine (pour la réhabilitation motrice en contrôlant des bras robots par exemple ou encore pour la réhabilitation de la parole en contrôlant un synthétiseur vocal). Avec pour objectif d'améliorer les performances et d'optimiser le processus d'apprentissage à l'utilisation des dispositifs médicaux interfaces cerveau-ordinateur pour la réhabilitation de la parole, ce projet vise dans un premier temps à réaliser des études de vocalisation et dans un deuxième temps à évaluer de nouveaux implants corticaux permettant de stimuler et d'enregistrer de manière stable l'activité neuronale du cortex. Le modèle du mini-porc sera plus pertinent que celui du rat pour le développement d'interfaces cerveau-ordinateur puisque par rapport au rat, l'anatomie du cerveau du mini-porc est plus proche de celle de l'homme.

Dans un souci de bien-être animal, les zones de stabulation des miniporcs seront enrichies (ballons, chaînes suspendues, musique, jouets...) et des visites quotidiennes réalisées par au moins un intervenant du projet. Par ailleurs, même si les miniporcs seront stabulés de manière isolée après la pose des implants, ils seront plusieurs dans la même pièce dans des box en vis-à-vis les uns des autres de manière à pouvoir interagir.

Dans un souci de protection animale, les tests seront strictement limités aux effectifs nécessaires pour permettre une interprétation statistique de nos résultats expérimentaux. Nous utiliserons pour cela 70 animaux sur 5 ans. Deux types de dispositifs d'électrodes seront implantés. Le premier type seront des implants commerciaux certifiés pour une utilisation préclinique afin de réaliser les études de vocalisation, alors que le deuxième type seront de nouveaux implants corticaux développés spécifiquement pour présenter à la fois une meilleure biocompatibilité et capacité à enregistrer et stimuler les neurones par rapport aux implants commerciaux, et donner ainsi de meilleurs résultats pour les études de vocalisation.

L'étude des bases corticales de la vocalisation chez le miniporc s'inscrit dans un projet à plus long terme visant à développer des interfaces cerveau-machine pour la réhabilitation de la parole chez l'homme. Ces interfaces nécessitent des algorithmes permettant de décoder les signaux corticaux afin de prédire la parole produite. L'enregistrement de ces signaux corticaux reste invasif par l'implantation de réseaux d'électrodes dans le cerveau. Afin de mettre au point ces algorithmes avant une utilisation chez l'homme, nous aurons recours à un modèle animal permettant d'enregistrer simultanément les signaux corticaux à l'origine des sons que cet animal vocalise. Le modèle de miniporc est beaucoup plus adéquat que le modèle rat pour cette étude car il produit un nombre beaucoup plus important de vocalisations différentes, ce qui permettra de tester les algorithmes de classification avec plus d'efficacité. Par ailleurs, il présente une alternative plus éthique au modèle de primate non humain. Cette étude sera réalisée sur un total de 30 animaux sur 5 ans avec des implants commerciaux.

Concernant les tests de biocompatibilité des nouveaux implants corticaux, pour limiter autant que possible nos investigations sur les animaux, ces implants auront été dans un premier temps testés *in vitro*. Leur cytotoxicité aura été évaluée avec la lignée cellulaire de fibroblastes L929 (ISO 10993-5). Néanmoins, certaines études ne peuvent pas être modélisées et nécessitent le recours à un modèle animal. Après des tests *in vivo* réalisés chez le rat adulte, il sera nécessaire d'évaluer leur biocompatibilité et leur capacité à enregistrer l'activité neuronale et la stimuler électriquement de manière stable sur le long terme chez le mini-porc, modèle plus pertinent que le rat de par les similitudes anatomiques et constitutives avec le cerveau humain. Notamment, le cerveau de miniporc subit des mouvements importants qui permettront de mettre à l'épreuve les nouveaux implants développés en terme de stabilité. Cette étude sera réalisée sur 40 animaux dont 15 animaux seront explorés en condition anesthésiée, et 25 animaux en situation comportementale éveillée.

3276. Dans le contexte du changement climatique et de la nécessité d'économiser les ressources énergétiques en élevage, nous étudions différentes stratégies pour limiter les coûts de production tout en augmentant la robustesse des animaux domestiques, c'est-à-dire leurs capacités d'adaptation. Une technique pour réaliser ces deux objectifs en production avicole est la modification des paramètres d'incubation des œufs, qui sont actuellement quasi-constants en pratique. Ceci ne reflète pas la diversité des conditions de température vécues par l'œuf lors d'une couvaison en extérieur, qui pourrait faciliter l'adaptation ultérieure de l'oiseau à des conditions climatiques variables. Notre stratégie est de moduler dans l'incubateur les mécanismes de thermorégulation des volailles pour améliorer leur résistance ultérieure au froid et au chaud, tout améliorant la durabilité de l'élevage.

Trois études sont prévues, les deux premières pour déterminer les conditions favorables de températures variables d'incubation des œufs qui garantissent la bonne éclosion sans nuire à la qualité des poussins. La troisième expérimentation vise à l'évaluation multicritère de programmes d'incubation des œufs (choisis à partir des premières expériences) dans différentes conditions d'élevage ultérieures, variables ou constantes. Nous mettrons au total en incubation 4000 œufs de poulet de chair provenant d'un élevage commercial. Les études seront menées respectivement sur 666 œufs pour les expérimentations 1 et 2 puis 2668 œufs en incubation et 984 poulets mâles en élevage dans l'expérimentation 3. Dans la troisième étude, trois procédures seront appliquées, l'exposition à des températures d'incubation variables, l'exposition à des températures d'élevage variables et des prises de sang répétées. L'exposition à des températures variables en cours d'élevage consistera en l'exposition de 480 poussins à des températures ambiantes de 5°C plus basse au démarrage, puis de 12°C plus élevée en fin d'élevage, que la température ambiante habituellement pratiquée. Des prises de sang seront réalisées de manière répétée sur un total de 72 poulets mâles à 2, 4 et 6 semaines d'âge pour suivre des marqueurs de santé. Réduction : pour limiter le nombre d'animaux mis en élevage, l'expérimentation ne portera que sur des poulets mâles qui sont les plus sensibles

aux variations de températures; le nombre d'animaux prévus est nécessaire et suffisant pour échantillonner suffisamment de tissus et tirer des conclusions significatives selon notre expérience. Remplacement : compte tenu de l'objectif appliqué du projet en zootechnie, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico. Raffinement : les poulets feront l'objet d'une surveillance quotidienne. Toute manifestation de symptômes comportementaux persistants définis par un point limite entraînera le retrait de l'animal de l'expérimentation.

3277. L'époinçage du bec consiste à soumettre la pointe du bec des poussins à un faisceau infra-rouge afin de limiter la croissance de la partie cornée et d'éviter que l'extrémité pointue puisse créer des lésions chez les congénères lors de diverses interactions. L'époinçage est systématiquement pratiqué en France sur les poussins de poules pondeuses afin de limiter les blessures dues au picage agressif. Cependant, compte tenu d'une demande sociale importante, cette pratique est remise en cause dans plusieurs pays européens. Ce projet a pour objectif de tester des solutions techniques pour éviter l'apparition de comportements de picage agressif et ses conséquences chez des poules non époinçées, élevées en plein air. Pour cela, 1200 poules seront utilisées. Trois lots de 200 poules seront élevées dans des conditions témoins, les mêmes conditions d'élevage que des poules pondeuses Label Rouge (lots T) et 3 lots de 200 poules seront élevées dans des conditions d'élevage cumulant de nombreux facteurs susceptibles de réduire le comportement de picage agressif (enrichissement du bâtiment et du parcours, transfert plus précoce vers le bâtiment de ponte, lots E). En plus de l'observation quotidienne habituelle, les poules seront visitées attentivement 3 fois par semaine pour détecter des traces de picage (comportement, plumes arrachées). Leur plumage sera également régulièrement examiné pour compléter la détection. Parmi les 200 poules de chaque lot, 24 poules par lot seront soumises à des tests de comportements permettant d'estimer leur réactivité émotionnelle. Des prises de sang seront également effectuées pour évaluer leur état de stress oxydant, marqueur possible de la tendance au picage. La prise en compte de la règle des 3R se décline par :

REMPACEMENT : Compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico.

REDUCTION : L'effectif de 200 poules par lot ne peut être réduit car la détection d'une réduction significative du comportement de picage nécessite d'importants effectifs si la prévalence du picage est faible dans le lot témoin : par exemple, avec un effectif de 200 poules, si cette prévalence dans un lot témoin est de 5%, l'écart minimum détecté sera de 3,5%, c'est-à-dire une prévalence 1,5% dans les lots E. Il existe une très grande variabilité dans la prévalence du picage qui est un trouble d'origine multifactorielle complexe, les données de la littérature, dans la mesure où elles sont transposables dans notre dispositif, indiquent qu'il devrait nous permettre une détection de la réduction du comportement de picage si la prévalence du picage dans le lot témoin est supérieure ou égale à 10%.

L'état de réactivité émotionnelle et l'état de stress oxydant seront mesurés sur 24 animaux par lot car cet effectif est le minimum nécessaire pour détecter une différence de réactivité émotionnelle et car les corrélations entre ces différents paramètres seront recherchées.

RAFFINEMENT : Les poules disposeront d'un parcours de 2 960 m<sup>2</sup>, soit 14,8 m<sup>2</sup>/poule (pour les labels, la surface minimum de parcours par poule est de 5 m<sup>2</sup>) qui fournira un important d'enrichissement. Elles seront visitées une fois par jour. Les animaux piqués seront orientés vers une infirmerie.

3278. 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  $\beta$ -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, SYN-028, administré par voie orale, sur la mémoire de la souris injectée intra-cérébralement avec le peptide  $\beta$ -amyloïde, impliqué dans la maladie d'Alzheimer et produisant une perte permanente de la mémoire. Le composé est administré un jour l'injection cérébrale du peptide  $\beta$ -amyloïde et pendant 8 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 topographique. Cette étude veut quantifier le bénéfice de ce traitement à J+8 quand le médicament est encore présent dans l'organisme ainsi que d'évaluer l'effet du traitement et à J+21 (donc non présent dans l'organisme, afin déterminer si le traitement a un effet réparateur à long terme).

Cette étude comprend 9 groupes, d'animaux contenant chacun 12 individus, nous y ajouterons 3 souris pour palier à la perte potentielle d'animaux lors de la chirurgie, soit un total de 111 animaux. Ce nombre d'animaux est nécessaire et 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).

3279. L'anxiété est une composante souvent importante des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. Afin d'étudier l'anxiété dans des modèles murins de ces maladies, nous souhaiterions établir et valider le test de la boîte "claire /obscur", un test d'anxiété utilisé couramment en recherche chez le rongeur. Ce test est peu aversif en comparaison à d'autres tests d'anxiété (raffinement), mais est couramment utilisé et a permis de prouver les effets anxiogènes de molécules.

Ce test utilise une boîte (l: 46 cm, L:32 cm, h: 16 cm) séparée en deux compartiments (2/3, 1/3) par une partition, ayant une ouverture permettant le passage de l'animal d'un compartiment à l'autre. Le compartiment le plus petit est recouvert d'un revêtement noir sur le sol et les parois et est fermé sur le dessus par un couvercle amovible. Le deuxième compartiment est recouvert d'un revêtement blanc au sol et sur les parois. Ce compartiment n'est pas fermé et est éclairé (100 lux).

Le principe de ce test réside dans le fait que l'anxiété de la souris peut être mesurée par le temps que l'animal passe dans l'espace ouvert en comparaison du temps passé dans l'espace couvert. L'anxiété se traduit par un temps moins important passé dans l'espace ouvert en comparaison avec une souris non anxieuse. En effet les rongeurs préfèrent être dans un endroit couvert et peu éclairé que dans un espace ouvert et éclairé.

Pour la validation de ce test nous utiliserons une molécule induisant l'anxiété, la vérratrine. Pour ce faire nous aurons besoin d'utiliser 20 souris C57BL6J mâles. Dix animaux seront injectés par voie sous-cutanée avec du sérum physiologique et dix autres avec une dose de vérratrine. Trente minutes après l'injection chaque animal sera placé dans le compartiment couvert. Le test se déroulera sur une période de 3 minutes. Le temps passé par l'animal dans l'espace ouvert sera mesuré avec l'aide d'un logiciel permettant de suivre les déplacements de la souris. Les animaux seront mis à mort après le test. Il n'est pas possible d'étudier l'anxiété sans l'utilisation d'animaux, cependant nous n'utiliserons qu'un nombre restreint d'animaux mais suffisant pour obtenir des résultats exploitables (réduction). Les animaux seront hébergés à plusieurs dans des cages contenant de l'enrichissement environnemental, et les injections seront effectuées par du personnel formés à ces techniques (raffinement).

3280. La maladie d'Alzheimer est une maladie liée au vieillissement caractérisée par la neurotoxicité du peptide beta-amyloïde induisant des processus d'inflammation au niveau des cellules nerveuses du cerveau, dans les régions cérébrales comme l'hippocampe, impliqué dans la mémoire et les fonctions intellectuelles. La neurotoxicité du peptide beta-amyloïde est centrale à 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

Pour ce projet, nous voudrions étudier les phénomènes d'inflammation dans les différentes structures du cerveau ainsi que du liquide entourant le cerveau (liquide céphalo-rachidien) après injection de trois doses différentes de peptide beta amyloïde au niveau de l'hippocampe à trois temps différents. L'injection cérébrale est effectuée en conditions aseptiques et sous anesthésie (raffinement). Cette étude vise à quantifier les marqueurs inflammatoires dans le cerveau à J+4, J+7 et J+14 après injection. Cette quantification permettra ensuite de cribler des composés médicaments sur un modèle préclinique, visant à diminuer cette inflammation, pour la maladie d'Alzheimer. L'étude des phénomènes d'inflammations au niveau du cerveau entier ainsi que du liquide céphalo-rachidien nécessitent l'utilisation des animaux. Nous utiliserons des souris C57BL6J, utilisées couramment dans la recherche sur le cerveau.

Cette étude comprend 12 groupes, d'animaux contenant chacun 5 individus, nous y ajouterons 3 souris pour palier à la perte potentielle d'animaux lors de la chirurgie, soit un total de 63 animaux. Ce nombre d'animaux est nécessaire et 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). 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).

3281. Les Papillomavirus sont des virus transmis par contact sexuel ou cutané. Ils sont responsables de la majorité des infections sexuellement transmissibles et sont à l'origine du développement de nombreuses lésions muqueuses et cutanées. Si la plupart de ces virus sont impliqués dans des lésions bénignes comme les verrues ou les condylomes, certains sont étroitement liés à des tumeurs particulièrement malignes et invasives comme les cancers du col de l'utérus ou de la peau. Ainsi, les infections par papillomavirus constituent un réel problème non seulement médical mais aussi économique. Bien que des vaccins aient été développés pour prévenir les maladies induites par papillomavirus, ces vaccins ne permettent pas de traiter les infections déjà établies. Ceci est particulièrement vrai lorsque l'individu infecté présente une déficience de son système immunitaire.

L'existence d'une maladie génétique rare associée à une susceptibilité accrue aux papillomavirus, appelée Epidermodysplasie Verruciforme (EV), constitue un excellent exemple. Ces patients souffrent d'une déficience génétique conduisant à la perte de la protéine EVER2 et développent alors des lésions cutanées conduisant à des tumeurs malignes chez plus de 50% d'entre eux. Cependant, le rôle de cette protéine dans le système immunitaire est encore inconnu à ce jour. Nous avons donc développé un

modèle murin présentant une déficience du gène EVER2 et nous nous proposons d'étudier grâce à ce modèle les mécanismes immunitaires conduisant à la susceptibilité aux infections par papillomavirus et l'évolution tumorale de ces infections. La compréhension de ces mécanismes permettrait non seulement d'améliorer à terme les stratégies vaccinales utilisées pour prévenir les infections par les papillomavirus mais également de proposer des traitements pour les infections déjà établies. Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 960 animaux sur 5 ans.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet.

1- Remplacement : le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude se fait après de nombreuses études *in vitro* dans des modèles cellulaires montrant l'importance de ces gènes dans le fonctionnement du système immunitaire. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car les études *in vitro* ne reproduiraient pas l'ensemble des voies impliquées dans des modèles physiologiques intégrés et par conséquent ne permettent pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables et pertinents de la pathologie humaine.

2- Réduction : les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. Ce projet a déjà obtenu l'accord du comité d'éthique régional et les études effectuées nous ont permis de maîtriser ces modèles murins permettant de réduire le nombre d'animaux. De plus, nous avons déjà validé certaines de nos approches expérimentales *in vitro* permettant d'optimiser l'utilisation des animaux. Les résultats actuels ont permis de valider que des lots de 10 souris selon les paramètres à évaluer permettent d'acquiescer des données fiables.

3- Raffinement : Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement à l'initiation du modèle. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, tels que définis par le comité SBEA pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal.

3282. Les patients diabétiques présentent des lésions des microvaisseaux qui causent la dégénérescence de certains organes comme les yeux ou les reins. Le diabète est d'ailleurs la première cause de mise sous dialyse en Europe.

Nous utiliserons différentes lignées de souris génétiquement modifiées pour étudier les mécanismes impliqués dans les lésions vasculaires rénales et rétinienne au cours du diabète. Nous cherchons ainsi à valider *in vivo* des cibles thérapeutiques préalablement identifiées par des études *in vitro*. En premier lieu, nous traiterons les souris à la streptozotocine afin de les rendre diabétiques et nous analyserons la fonction cardiaque et rénale en réalisant des prélèvements sanguins, urinaires et par échographie. Après 10 semaines, les souris seront euthanasiées pour prélèvement d'organes afin d'étudier les lésions vasculaires.

Le diabète est une maladie complexe et seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement possible le microenvironnement diabétique, permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans les lésions vasculaires rénales et rétinienne au cours du diabète.

La souris est un modèle de choix car elle développe des complications vasculaires du diabète proches de celles de l'homme. De plus, nous tirerons parti de la transgénèse, c'est à dire le fait de pouvoir modifier les gènes des souris, afin d'étudier les cibles identifiées *in vitro*.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans. Le nombre de souris utilisées sera de 425 maximum.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans le développement des lésions microvasculaires au cours du diabète. Ils pourraient permettre le développement de nouveaux médicaments ciblant les voies mises en causes, permettant ainsi de prévenir ou freiner le développement des maladies vasculaires chez les patients diabétiques.

3283. Comme d'autres types d'addiction, l'addiction aux opiacés (héroïne, morphine) peut être considérée comme une pathologie de l'apprentissage et de la mémoire, dans laquelle le souvenir des états affectifs associés à la drogue (bien-être de la consommation) ou à son manque (malaise aversif du sevrage) ont un rôle crucial pour le maintien de la consommation et pour le risque de rechute après abstinence. Par l'enregistrement d'activités cérébrales chez le rongeur, nous visons à décrypter par quelles types d'activités neuronales sont codées ces mémoires, en particulier celles associées aux effets aversifs du manque. Notre objectif est de comprendre comment différentes régions du cerveau (le noyau accumbens, le cortex préfrontal, l'hippocampe et l'amygdale basolatérale) intègrent les stimuli de l'environnement associés au manque (contexte, lieux, objets, personnes). Ce projet apportera des connaissances fondamentales dans le cadre des thérapies émergentes basées sur la manipulation de ces mémoires pour le traitement de l'addiction et pourraient avoir des implications pour la compréhension d'autres types de mémoires pathologiques (tel que le stress post traumatique par exemple).

Pour rendre des animaux dépendants aux opiacés (morphine, héroïne), nous réaliserons soit des implantations de pastilles de morphine ou de mini pompes en sous cutané soit des injections chroniques répétées. Dans les deux cas le sevrage peut être induit par injection de faibles doses d'un bloqueur des récepteurs aux opiacés, la naloxone. L'étude des mémoires affectives associées aux effets des drogues nécessitent des protocoles comportementaux de conditionnement des effets négatifs du sevrage ou des effets positifs de la drogue. L'activité cérébrale des réseaux d'intérêt sera enregistrée dans ces différents protocoles comportementaux et le rôle des différentes structures sera évalué après des manipulations génétiques permettant de les activer ou de les inhiber.

Ainsi, notre projet nécessite l'utilisation de méthodes invasives (enregistrements électro-physiologiques intra-cérébraux, injections de traceurs et/ou de virus non infectieux, ...), réalisables uniquement chez l'animal. Ces approches sont indispensables car 1) nous recherchons des activations au niveau uni-cellulaire et au niveau de structures spécifiques nécessitant une résolution spatiale impossible avec les autres approches d'imagerie disponibles (par exemple IRM fonctionnelle chez le petit animal), et 2) nous cherchons à étudier le fonctionnement en réseau et la synchronisation fine de nos structures d'intérêt ce qui impose des enregistrements électrophysiologiques intracérébraux dont la résolution temporelle reste inégalée par d'autres approches (comme par exemple là encore l'IRM fonctionnelle chez le petit animal qui n'est pas suffisamment sensible).

Ne pouvant pas remplacer les modèles animaux dans notre projet, nous nous attachons donc à réduire le nombre d'animaux en expérimentation, et à raffiner nos procédures (règles des 3R).

Concernant la réduction du nombre d'animaux, les analyses statistiques que nous employons dans nos études visent à limiter au strict minimum le nombre d'animaux utilisés, tout en garantissant la significativité de nos résultats. Ainsi, nos protocoles expérimentaux et les méthodes d'analyses statistiques employés sont pensés au préalable de la phase d'expérimentation, nous permettant ainsi d'éviter la répétition inutile d'expériences ou l'emploi d'un nombre inapproprié d'animaux. Le nombre estimé d'animaux nécessaires à la réalisation du projet est de 370.

Concernant le raffinement de nos procédures, nous avons mis en place des procédures spécifiques de gestion du stress et de la douleur, et la mise en place de points limites selon une grille d'évaluation permettant le suivi quotidien des animaux.

3284. Le principe est la production d'une famille informative permettant d'établir la liaison entre les marqueurs génétiques et la transmission des phénotypes chez la poule.

La coloration du plumage est un caractère utilisé par de nombreux éleveurs qui s'intéressent aux races anciennes de poules.

Le format des animaux a à la fois une importance économique pour l'élevage industriel et un intérêt pour les éleveurs amateurs qui souvent préfèrent les animaux petits car plus économes. L'hypothèse d'une mutation portée par le chromosome sexuel Z et réduisant modérément la croissance est ancienne et n'a jamais pu être vérifiée, la confirmation de la localisation chromosomique d'une telle mutation est intéressante pour la connaissance du déterminisme génétique de la croissance chez le poulet.

Le déterminisme est de type caractère porté par le chromosome sexuel Z transmis par le mâle et s'exprimant directement chez les filles, démontré pour "chocolat" et supposé pour "dwB" d'après la littérature. La production d'animaux se fera à partir d'un croisement avec le type parental normal (poule noire) entre un mâle hétérozygote pour les mutations responsables du phénotype et 17 reproductrices de la "lignée parentale femelle". Le résultat de l'analyse de liaison permettra de préciser la position des gènes sur le chromosome Z et de rechercher dans ces régions des gènes dits 'candidats' dont les fonctions pourraient influencer la production de pigment du plumage ou la taille des animaux. Le croisement produira 100 poussins femelles qui serviront à l'étude de liaison.

Les moyens mis en œuvre pour respecter la règle des 3R seront les suivants :

- Réduire: des calculs statistiques ont été effectués pour estimer le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de cette expérience
- Raffiner :les jeunes sont élevés au sol dans des conditions comparables à celles d'élevage classique. Un enrichissement sera mis en place lors de la phase d'hébergement des reproducteurs en cages (grattoir, rondelles métalliques).
- Remplacer : Ces travaux nécessitent une approche globale (phénotypage in vivo, voies métaboliques impliqués/régulations) et ne peuvent donc être abordés que par une approche sur les animaux.

L'ensemble du projet nécessitera l'utilisation de 118 animaux.

3285. La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après l'étude multicentrique STAR\*D, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements.

La pertinence d'un modèle animal à reproduire une pathologie humaine dépend de trois critères : sa validité prédictive (à savoir que les traitements efficaces en clinique doivent l'être dans le modèle), sa validité phénoménologique (la capacité du modèle à induire les symptômes de la pathologie) et sa validité théorique (la place du modèle par rapport au cadre théorique). Seul le développement de modèles animaux chroniques dans lesquels un état anormal est induit et maintenu pendant une période prolongée, durant laquelle une « thérapie » peut être administrée, peut fournir un outil pour répondre à ces questions. C'est la raison pour laquelle nos travaux se basent sur l'utilisation du modèle du stress chronique léger imprédictible (SCI). De façon intéressante, il s'agit du seul modèle pour lequel il existe une signature moléculaire commune entre la dépression humaine et celle existant après stress chronique imprédictible chez la souris. Ce modèle de stress chronique imprédictible a également été validé pharmacologiquement, et semble le mieux adapté et le plus pertinent pour étudier la pathophysiologie de la dépression.

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

Raffinement : le stress appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen, en raison de sa brièveté, il sera réduit à son minimum. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu.

Remplacement : aucune méthode alternative ni substitutive n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chronique chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire in vitro n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=15 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

Cette expérience s'intéresse à l'aptitude d'un modulateur du récepteur au GABA-A à reverser les effets du stress chronique imprédictible (SCI) sur les fonctions exécutives. Un total de 60 souris femelles sera utilisé répartis en 4 lots de 15 individus.

3286. La fièvre aphteuse est une maladie virale non dangereuse pour l'homme qui affecte principalement les animaux ongulés (mammifères herbivores dotés de sabots). Très contagieuse, elle reste l'une des préoccupations majeures des éleveurs et des autorités sanitaires et peut avoir des répercussions socio-économiques considérables. A titre d'exemple, la réapparition de la fièvre aphteuse en Europe en 2001, qui a touché plus particulièrement le Royaume Uni dont 2000 exploitations ont été frappées, restera parmi les exemples les plus dévastateurs de l'histoire. A la même année, deux foyers ont été identifiés en France ce qui a entraîné l'abattage de près de 50 000 animaux et des conséquences économiques importantes. En effet, les mesures de lutte contre la fièvre aphteuse qui ont conduit à l'abattage d'urgence des troupeaux infectés, les restrictions imposées aux échanges communautaires ainsi que les impacts indirects de l'épidémie sur l'environnement et le tourisme dans les régions touchées eurent un coût élevé pour l'ensemble de la Communauté.

Devant cette menace, une stratégie de lutte internationale a été initiée en 2009 par l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) dans le cadre du Plan-cadre mondial pour la lutte progressive contre les maladies animales transfrontalières signé par les deux partenaires en 2004. Cette stratégie de lutte mondiale contre la fièvre aphteuse est considérée comme une priorité internationale.

La vaccination est la méthode de choix pour contrôler et/ou prévenir les infections par le virus de la fièvre aphteuse. Des vaccins inactivés sont disponibles mais leur durée d'efficacité est limitée dans le temps. De plus, la production de vaccins inactivés nécessite de disposer de grandes quantités de virus infectieux pour leur formulation, ce qui représente un problème majeur de sûreté biologique. Afin de proposer une solution à ces problèmes, de nouvelles approches vaccinales sont à l'étude dont l'utilisation d'adénovirus recombinés exprimant des antigènes du virus de la fièvre aphteuse.

Les objectifs principaux de cette étude sont (i) de mesurer sur une période de 18 mois la durée d'immunité induite par différentes formulations vaccinales : le vaccin inactivé commercial et un vaccin innovant à base d'adénovirus recombiné avec et sans adjuvant et (ii) d'analyser les profils d'expression génique dans les cellules mononucléées du sang périphérique où les réponses immunitaires sont initiées. Trente moutons seront vaccinés à l'aide des différentes formulations (10 animaux par vaccin) et des prélèvements de sang seront régulièrement réalisés pour mesurer la durée de l'immunité. Les profils d'expression génique seront établis à partir de cellules sanguines prélevées au cours des premiers jours après la vaccination.

Les profils d'expression génique qui ont été caractérisés dans les cellules sanguines au cours de la réponse précoce aux vaccins chez l'homme et les rongeurs, sont prédictifs de l'amplitude de la réponse humorale. Nous émettons l'hypothèse que cette régulation de l'expression de gènes serait également prédictive de la durée de l'immunité et fournirait un outil puissant et innovant pour sélectionner efficacement les nouvelles stratégies vaccinales induisant une longue durée de l'immunité protectrice.

Remplacement: l'animal sensible au virus de la fièvre aphteuse, ici le petit ruminant, est nécessaire pour l'évaluation de la durée de l'immunité vaccinale et l'établissement du profil d'expression génique précoce; Le remplacement n'est donc pas possible.

Réduction: le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats interprétables et exploitables scientifiquement à partir de l'analyse des données brutes du transcriptome précoce associé aux réponses immunes

Raffinement: les animaux seront maintenu en groupe, après une période d'hébergement en confinement de deux à trois semaines nécessaire à la vaccination avec un adénovirus recombinant, les animaux seront hébergés en condition conventionnelle sur paille.

3287. L'objectif de cet essai est de comprendre comment la nutrition des lapereaux dans la période naissance – sevrage peut améliorer leur résistance aux troubles digestifs en phase de post-sevrage. En effet, les entéropathies post-sevrage constituent un problème sanitaire majeur dans les élevages de lapins, avec de fortes incidences économiques (coût des traitements sanitaires, allongement des durées d'élevage, mortalité) et des incidences sanitaires (les traitements de ces symptômes entraînant l'utilisation d'antibiotiques).

Pour essayer d'améliorer la robustesse des jeunes lapereaux, le levier testé sera la nutrition des lapereaux avant sevrage (âge de distribution d'aliment et apports nutritionnels), couplé avec une stratégie de limitation de l'ingestion en post-sevrage.

Il s'agit d'un essai dont la réalisation en milieu contrôlé permettra de déterminer

1. l'effet d'une distribution précoce d'aliment pré-sevrage (distribution au nid dès 8 jours d'âge)
2. l'effet de la teneur en amidon de l'alimentation pré-sevrage et post sevrage (19-42 jours d'âge) sur la croissance et la santé digestive des lapereaux tout au long de la période d'élevage (70j)
3. la digestibilité de l'aliment à 42j.

Pour cet essai, 51 portées seront suivies en phase pré-sevrage. En phase post sevrage, 474 lapins seront suivis : 450 animaux pour les mesures zootechniques classiques et 24 animaux pour les mesures de la digestibilité. Seuls ces 24 animaux en cages de digestibilité (cages individuelles) seront concernés par une procédure expérimentale, du fait de leur isolement. Tous les animaux sont pesés, leur consommation d'aliment est contrôlée par pesée de leur trémie. Des observations quotidiennes (comportement, état sanitaire) permettront de détecter les éventuels animaux en souffrance. Ceux-ci seront retirés immédiatement de l'essai et recevront les soins adéquats décidés par le vétérinaire référent.

L'objectif final est d'accroître la résistance aux troubles digestifs des lapins en phase de post sevrage et à terme réduire l'usage d'antibiotiques en filière cunicole. Ce projet s'inscrit dans le programme du plan ministériel « EcoAntibio2017 », qui vise une réduction en 5 ans, de 25% de l'usage des antibiotiques vétérinaires.

3288. Dans le cadre de la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'hydrocéphalie, la mesure précise du débit cérébrospinal est primordiale, or il n'existe pas à ce jour de technique non invasive fiable. Notre projet expérimental propose une technique innovante pour la mesure du débit dans une dérivation ventriculo-péritonéale sous-cutanée destinée aux patients atteints de cette pathologie. Chez ces patients équipés d'une valve réglable qui évacue le liquide cérébro-spinal grâce à un cathéter placé sous la peau, le dispositif proposé permettrait de mesurer le débit à l'intérieur de la tubulure sans avoir recours à la chirurgie ou à toute autre méthode intrusive.

Après validation de notre dispositif *ex vivo*, il apparaît maintenant indispensable de prouver son efficacité sur un modèle vivant de taille suffisante pour recevoir le dispositif destiné aux patients. L'expérimentation proposée sera ainsi réalisée sur dix rats anesthésiés sur lesquels seront placés transitoirement le long du flanc un cathéter sous-cutané, le temps de la mesure. L'anesthésie des animaux tout au long de la procédure permettra d'éviter tout stress et toute souffrance. Dans le respect de la règle des 3R, chaque geste chirurgical non douloureux sera répété deux fois sur les animaux, de chaque côté du corps, afin de limiter l'effectif du lot expérimental. Après cicatrisation des tissus, l'expérimentation ne donnant lieu à aucune séquelle, ils pourront être utilisés lors d'un autre protocole expérimental compatible avec leur utilisation antérieure, en accord avec le vétérinaire chargé du suivi de leur bien-être.

3289. Les animaux d'élevage sont des êtres sensibles, il est donc nécessaire de limiter au maximum les émotions négatives qui peuvent être provoquées par les procédures d'abattage. Afin de proposer ou de tester différentes méthodes d'abattage, basée sur la limitation du ressenti douloureux, il est indispensable de disposer de méthodes d'évaluation de la douleur qui reposent sur des fondements scientifiques.

Face à l'absence de techniques de mesures directes du ressenti douloureux, une étude ayant pour objectif de développer une méthode d'évaluation de la douleur aiguë des bovins, à l'aide d'indicateurs validés et clairement définis, au moment de leur mise à mort a été mise en œuvre en 2014. Au cours de cette étude, des indicateurs (électro-physiologiques, physiologiques, comportementaux et intégratifs) ont été sélectionnés et testés en abattoir sur deux groupes de bovins. Le premier groupe recevait une injection de Lurocaïne® (un anesthésiant local) au niveau de la ligne de coupe (trajet du couteau lors de la mise à mort des animaux). Le second groupe lui recevait une injection de sérum physiologique. Afin de valider définitivement les résultats obtenus au cours de cette étude notamment en ce qui concerne l'activité cardiaque et le comportement des animaux, nous devons nous affranchir de toutes les interactions potentielles entre nos résultats et notre modèle, en particulier les effets des injections sur la réactivité des animaux. Certains articles scientifiques expliquent que la Lurocaïne® peut avoir un effet sédatif si des quantités suffisantes passent dans le sang. L'objectif du présent projet est donc de voir les effets de la Lurocaïne® sur le comportement et la physiologie du bovin au repos et dans un test de réactivité contrôlé (induction d'un stress de l'animal en le mettant dans des conditions proches de celles rencontrées en abattoir), lorsque cet anesthésiant local est injecté selon le même protocole utilisé dans l'étude précédente.

De manière à tester cet effet dans les meilleures conditions, il est nécessaire d'avoir recours à des animaux (n=16) sur une période d'un mois. De plus, il n'existe pas de méthodes alternatives, ne mettant pas en jeu des animaux, qui nous permettent de répondre à l'objectif de notre projet. Durant l'expérimentation les animaux conduits en lots de 4 de façon à limiter leur stress en dehors de la période de test. Durant le test, la manipulation des animaux se faisait dans le calme, au rythme des animaux avec du personnel qualifié pour ce type de manipulation.

3290. Les systèmes d'élevage de ruminants doivent dorénavant réduire l'utilisation d'aliments concentrés et maximiser la ressource herbagère pour des raisons économiques, environnementales et sociétales. Dans ce contexte, la durabilité des systèmes d'élevage d'herbivores repose sur la capacité des animaux à utiliser plus efficacement un éventail d'aliments, disponibles non seulement au niveau de la ferme mais aussi à l'échelle des territoires. Cependant, les ressources fourragères sont soumises à de fortes variations de disponibilité et de qualité induisant une importante variabilité des apports en nutriments, aux animaux, entre saisons au cours d'une année et entre années. Ainsi, le bilan nutritionnel (apports – besoins) de l'animal peut se trouver négatif à certaines périodes d'une année de production. Des animaux robustes, c'est-à-dire capables de faire face à cette variabilité saisonnière et aux perturbations nutritionnelles en développant des mécanismes biologiques adaptés, sont donc recherchés.

A ce jour les capacités d'adaptation (donc robustesse) des herbivores d'élevage vis-à-vis de ces contraintes nutritionnelles n'ont pas été favorisées et leur déterminisme reste encore mal connu. La capacité des animaux à utiliser des réserves lipidiques corporelles face à des restrictions alimentaires, par exemple en réponse à une sécheresse, et à constituer des réserves corporelles en période d'abondance alimentaire est un des mécanismes clés d'une telle capacité d'adaptation ou de robustesse individuelle.

Les objectifs du projet sont de comprendre les mécanismes biologiques majeurs et le déterminisme génétique, encore mal connus, qui contrôlent la capacité des animaux à utiliser/constituer des réserves corporelles lipidiques face à une diversité de challenges environnementaux au cours d'un cycle de production (mise à la reproduction/gestation/mise-bas/élevage et sevrage des agneaux). Cette meilleure connaissance à l'échelle individuelle (biologique et génétique) permettra d'élaborer et de proposer aux éleveurs des stratégies de conduite de l'alimentation et de sélection génétique des animaux pour renforcer la compétitivité et la durabilité des élevages de ruminants.

La substitution de modèle animal n'est pas possible puisque nous souhaitons mesurer des aptitudes biologiques. L'utilisation d'animaux placés dans des conditions d'élevage variées, changeantes est indispensable pour mesurer la variabilité du caractère étudié, qui n'est pas connue dans aucune espèce animale à ce jour. Nous proposons de travailler avec l'espèce ovine, espèce de ruminants emblématique dans les milieux méditerranéens, de petite taille, élevée à des fins commerciales dans des systèmes et des environnements très diversifiés et donc susceptible d'être exposée à des contraintes nutritionnelles.

Le nombre d'animaux retenu prend en compte la puissance statistique calculée à des fins d'analyse génétique. En effet, l'exploration génétique du caractère étudié nous contraint à un dimensionnement important de notre dispositif pour garantir la représentativité de la variabilité génétique dans la race étudiée. Environ 520 brebis sont donc nécessaires pour une estimation précise et fiable des caractéristiques génétiques du caractère étudié.

Pratiquement, pour répondre à ces objectifs, des brebis seront produites et élevées dans un milieu extensif contraignant, chaud et sec l'été, froid et humide l'hiver (Causses du Larzac) en plein air intégral tout au long de l'année.

Les manipulations des animaux supplémentaires à celles d'élevage, induites par ce projet, consisteront d'une part à des prélèvements sanguins répétés 4 à 5 fois au cours d'une année de production. Aucun effet indésirable, de cette procédure, n'est attendu sur les animaux. Des paramètres biologiques sanguins seront mesurés pour évaluer l'état des réserves lipidiques de l'animal. D'autre part, un lien sera fait avec la capacité d'ingestion des animaux. L'ingestion individuelle au pâturage étant difficile à mettre en œuvre, des mesures de capacité d'ingestion seront réalisées en utilisant des cages à digestibilité avec un échantillon réduit d'animaux (n = 20), représentatif du troupeau expérimental. Le bien-être de ce petit groupe d'animaux sera évalué par une surveillance accrue durant cette procédure. En dehors des interventions expérimentales, l'ensemble des brebis sera conduit au sein du troupeau dans les conditions d'élevage classiques de l'EU.

3291. L'œil a pour fonction de recevoir la lumière et de transformer l'énergie lumineuse contenue dans les photons en influx nerveux. Ces messages nerveux sont ensuite transmis jusqu'au cortex visuel et interprétés en images. La conversion de l'information lumineuse en information électrique est réalisée par le mécanisme de phototransduction. Ce mécanisme se déroule au niveau de la couche la plus interne de l'œil, la rétine, et plus particulièrement dans les photorécepteurs rétiniens. Il existe deux types de photorécepteurs : les bâtonnets et les cônes. Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) sont indispensables à la fonction et à la survie des photorécepteurs.

L'Amaurose congénitale de Leber (ACL) est caractérisée par une dégénérescence très précoce des photorécepteurs associée à une perte de la vision dans l'enfance. A ce jour, des mutations dans plus de 17 gènes ont été associées à des ACL chez l'homme. Parmi ces mutations, celles touchant le gène Rpe65 représentent environ 2% des cas totaux d'ACL. Rpe65 est une enzyme exprimée au niveau des cellules de l'EPR. Elle est nécessaire à la synthèse du photopigment des photorécepteurs. Un défaut de fonction de cette enzyme entraîne une perte importante de la vision nocturne puis diurne. Actuellement, il n'existe aucun traitement efficace pour traiter les ACL liées à un défaut en Rpe65. Cette pathologie étant autosomique récessive, la thérapie génique d'addition, qui consiste en l'apport d'une copie supplémentaire du gène Rpe65 dans les rétines déficientes, est donc une approche thérapeutique intéressante.

Nous avons évalué un vecteur adéno-associés pour le traitement par thérapie génique d'une forme d'Amaurose congénitale de Leber liée à une mutation dans le gène Rpe65. Nous travaillons chez le chien Briard Rpe65<sup>-/-</sup>, un modèle canin naturel d'Amaurose congénitale de Leber liée à une mutation dans le gène Rpe65. La dégénérescence rétinienne chez ce chien est très proche de celle observée chez l'homme, ce qui en fait un très bon modèle préclinique pour l'évaluation d'un traitement par thérapie génique des rétinites pigmentaires liées à une mutation dans le gène Rpe65. De plus, la taille et l'anatomie de l'œil du chien sont beaucoup plus proches de celles de l'homme que ne le sont celles des rongeurs. Il est ainsi possible d'injecter un volume de vecteur identique à celui qui sera injecté chez l'homme et de mieux évaluer la dose thérapeutique. Nous avons démontré que l'injection sous-rétinienne d'AAV2/5.hrpe65.hrpe65 qui code pour le gène rpe65 humain sous le contrôle du promoteur humain rpe65, spécifique de l'EPR, permettait de restaurer au long-terme la vision du chien Rpe65<sup>-/-</sup>. Ces résultats précliniques ont permis le démarrage d'un essai clinique de phase I-II chez 9 patients Rpe65-déficient en 2011. Les premiers résultats cliniques sont très encourageants, et de nouvelles méthodes de production et de purification du vecteur de grade clinique sont en cours pour améliorer encore l'efficacité du vecteur.

Nous souhaitons maintenant tester l'efficacité de ces nouveaux vecteurs.

La toxicité de 5 vecteurs différents sera testée chez des rats (n=25).

Puis la fonctionnalité d'un lot de vecteur sera testée dans le modèle Briard Rpe65<sup>-/-</sup> (n=10, 2 à 3 animaux par groupe). Ce nombre est le minimum requis pour permettre une interprétation fiable des résultats sachant qu'il existe une certaine variabilité individuelle après transfert de gènes dans la rétine. Il n'y aura pas d'analyse statistique.

Les animaux seront répartis de la façon suivante :

Rats :

6 lots, 5 vecteurs à tester et un lot témoin. N=4 animaux par lot et 5 animaux témoins (2 rats non injectés et 3 rats injectés avec de la solution oculaire injectable = véhicule)

Chiens :

Le but chez les chiens RPE65 est d'injecter les 2 yeux afin de comparer 2 processus de production de l'AAV2/4, comparer l'AAV2/4 nouveau processus avec un vecteur de référence, et enfin d'évaluer 2 doses différentes de l'AAV2/4 nouveau processus.

10 chiens (8 homozygotes et 2 hétérozygotes) chiens seront inclus dans 4 groupes :

Groupe contrôle : n=2, 2 yeux injectés tampon de formulation

Groupe #1 : n=2, œil G injecté tampon, œil D injecté avec l'AAV2/4 ancien processus de production

Groupe #2 : n=3, œil G injecté AAV2/4 processus de production optimisé, œil D injecté AAV de référence

Groupe #3 : n=3, 2 doses d'AAV2/4 optimisé dans chaque œil

Tous les examens cliniques et les injections sont réalisés avec sédation et anesthésie appropriée en présence d'un vétérinaire anesthésiste. Des protocoles seront mis en place et adaptés à l'espèce concernée et aux procédures expérimentales : anesthésie gazeuse seule (rat), anesthésie fixe au Nesdonal® avec relai gazeux et prémédication au Calmivet® (chien), anesthésie locale par instillation de gouttes oculaires. Afin d'éviter l'apparition de réactions inflammatoires un traitement post opératoire sera effectué.

L'état général et l'alimentation des animaux (chiens et rats) sont surveillés quotidiennement par les animaliers et le vétérinaire référent du Centre de Boisbonne.

D'autre part les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur, avec un programme d'enrichissement du milieu pour les différentes espèces.

3292. L'évaluation préclinique de molécules est régie par des lignes directrices internationales qui rendent obligatoires les études de Toxicologie avant la 1ère administration d'une nouvelle molécule candidat-médicament chez l'Homme. Cette évaluation s'inscrit dans une stratégie où de gros efforts pour éviter ou réduire l'utilisation d'animaux sont réalisés en utilisant des modèles *in silico*, des tests *in vitro* et en évaluant certains paramètres spécifiques (paramètres d'immunotoxicologie, de pharmacologie de sécurité, ...) dans des études de toxicologie générale.

Pour les études de toxicologie générale, les molécules doivent être évaluées dans deux espèces, rongeurs et non rongeurs, selon les directives internationales ICH M3, sauf cas particulier des biologiques, si une seule espèce est pertinente. Ces études ont pour objectif d'identifier les potentiels effets indésirables observés suite à l'administration de ces produits afin de pouvoir définir la/les dose(s) à administrer chez l'Homme et les mesures pour minimiser les effets toxiques.

Il n'y a actuellement aucune méthode alternative validée qui permette de mimer toutes les interactions et effets possibles d'une molécule sur l'organisme entier d'un animal vivant afin de permettre l'extrapolation à l'Homme. De plus, un certain nombre d'études spécifiques sur l'animal de laboratoire demeurent nécessaires pour satisfaire la réglementation en vigueur en vue de l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour les futurs médicaments.

Ce projet couvre l'utilisation d'au maximum 23000 animaux dont 1500 primates non-humains, 1500 chiens, 7500 souris et 12500 rats sur 5 ans.

Les études sont réalisées par du personnel formé et compétent. Le nombre d'animaux par groupe et le nombre de groupes sont définis par certaines lignes directrices internationales telles que celles d'ICH (« International Conference on Harmonisation »), sur des bases scientifiques et avec l'apport des biostatistiques afin d'avoir un effectif minimum mais statistiquement exploitable pour pouvoir interpréter les éventuels effets adverses.

Par ailleurs, des actions ont été menées en combinant deux tests réglementaires afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés. De plus, le contenu de ces études intègre les impératifs éthiques tels que les modalités d'administration et de prélèvement, l'hébergement et l'enrichissement du milieu spécifique pour chaque espèce étudiée mais aussi la prévention de toute douleur, détresse ou inconfort chez l'animal.

3293. La qualité sanitaire des aliments est une préoccupation majeure en France et dans le monde. Dans ce cadre, il faut se pencher sur le risque associé d'une possible contamination de l'alimentation destinée à l'homme ou l'animal par des mycotoxines. Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par certains champignons. Les mycotoxines sont des contaminants relativement communs des céréales et environ 25% des récoltes mondiales sont contaminées. De plus, la majorité des mycotoxines ne sont pas dégradées par la chaleur et restent présentes même après la disparition des champignons.

Les syndromes toxicologiques cliniques provoqués par l'ingestion de fortes quantités de ces toxines sont bien caractérisés et vont de la mortalité, aux retards de croissance et aux troubles de la reproduction. Elles peuvent également altérer les réponses immunitaires et diminuer la résistance aux maladies infectieuses. En raison de l'altération des réponses immunitaires par les Fusarium toxines (notamment le déoxynivalénol = DON) ainsi que de l'augmentation des lésions de l'épithélium le long du tractus digestif, plusieurs études suggèrent que les Fusarium toxines augmenteraient la sensibilité des animaux à développer des maladies inflammatoires de l'intestin (IBD = intestinal bowel disease).

Ce projet, composé de 3 études, vise à évaluer l'effet des Fusarium toxines chez des animaux exposés via leur alimentation sur le développement et la sévérité d'une IBD. L'analyse de l'apparition des symptômes et des atteintes morphologiques et immunitaires dans le colon seront ainsi analysées. L'approche fondamentale de ces études s'inscrit dans la compréhension du rôle joué par des contaminants alimentaires sur la susceptibilité à développer des pathologies chroniques de l'intestin. Cette étude a été mise en oeuvre en prenant du mieux possible en considération les principes énoncés dans le cadre de la règle des "3R". L'utilisation de modèles cellulaires étant impossible dans l'évaluation de l'effet d'une toxine sur le développement d'une pathologie intestinale, cela justifie l'utilisation d'animaux qui s'avèrent irremplaçables dans ces expérimentations. L'utilisation de notre modèle animal s'appuie sur un nombre important d'études bibliographiques et d'outils méthodologiques utilisant ce modèle "rat" pour évaluer l'impact de différents traitements sur le développement de ces pathologies. Afin de réduire

l'utilisation des animaux, leur nombre a été limité en prenant en compte la variabilité inter-individuelle qui conditionne d'avoir des effectifs suffisants pour réaliser des analyses statistiques pertinentes. Ainsi, 460 animaux sur 3 ans seront donc nécessaires pour réaliser l'ensemble des expérimentations. Leur hébergement sera fait dans les meilleures conditions standardisées, avec des possibilités d'enrichissement du milieu.

3294. La thérapie photodynamique (PDT) est une stratégie alternative pour le traitement des tumeurs solides due à son ciblage spécifique et l'absence d'effets secondaires indésirables. Elle nécessite un photosensibilisateur (PS), c'est-à-dire une molécule qui absorbe la lumière à une longueur d'onde spécifique et qui, en présence d'oxygène, génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont très toxiques pour les cellules cancéreuses. Dans le cadre d'une collaboration européenne, nous testons un nouveau PS, nommé LUZ11. Ce projet vise à caractériser l'implication du système immunitaire suite à une thérapie photodynamique en présence de LUZ11. Ce projet se déroulera sur plusieurs années et il nécessitera 2277 souris immunocompétentes (n. 2097) et immunodéficientes (n. 180). Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Nous effectuerons des expériences de vaccination et de croissance tumorale. Cette étude peut être conduite seulement in vivo car il n'y a pas d'autre modèles pour étudier la réponse immunitaire à la thérapie photodynamique dans un organisme entier (toxicité, effets immuno-dépendants). L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales invalident l'hypothèse de travail. Pour la réalisation de cette étude, nous chercherons à regrouper les expérimentations dans le but de garder un nombre minimum d'animaux pour les groupes contrôles. Néanmoins, nous pourrions être amenés à réduire le nombre de souris si l'effet observé s'avère significatif au cours des premières expériences. Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et le personnel est formé pour éviter au maximum le stress et/ou la douleur au moment de l'expérimentation. Ce projet fournira des connaissances sur la thérapie photodynamique qui permettront l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses ciblées.

3295. Les anticorps monoclonaux sont des anticorps très spécifiques et qui sont sécrétés de façon continue par des hybrides cellulaires, les hybridomes, rendus « immortels ». Les hybridomes sont obtenus à partir de la fusion d'une cellule lymphoïde productrice d'anticorps tels que les splénocytes et une cellule myélomateuse. Les anticorps monoclonaux sont très largement utilisés comme outils de diagnostic en médecine et comme outils de recherche. Depuis plus de 20 ans, l'utilisation d'anticorps monoclonaux comme sondes spécifiques permet de détecter, localiser, caractériser de nombreux composés dans un grand nombre de domaines de recherche.

La production se déroule en 3 étapes :

-La production in vivo (immunisations) des cellules lymphoïdes sécrétant les anticorps.

-La sélection in vitro d'un ou de plusieurs hybridomes producteurs d'anticorps spécifiques.

-La prolifération des hybridomes in vitro afin de produire les anticorps en quantité suffisante pour leur utilisation.

Le principe repose sur la capacité du système immunitaire à déclencher une production d'anticorps par les plasmocytes suite à l'immunisation avec un antigène. L'immunisation avec l'antigène se fait par voie sous cutanée en présence d'adjuvant qui va stimuler le système immunitaire.

Les souris immunisées sont ensuite euthanasiées et les ganglions poplités prélevés. Les cellules productrices d'anticorps sont alors fusionnées avec des cellules myélomateuses afin de les rendre immortelles garantissant ainsi une production d'anticorps pérenne. Contrairement à la production de sérum polyclonal il ne sera plus nécessaire d'utiliser d'animaux pour produire de nouveau cet anticorps.

Pour produire une série d'anticorps contre un antigène donné nous avons besoin de 3 souris Balb/C. Nous envisageons de conduire au maximum 10 programmes par an (soit 10 antigènes) au cours des 5 années à venir, soit un nombre total de 150 souris. Ces antigènes seront des protéines alimentaires, végétales ou animales, non toxiques.

En accord avec la règle des 3 R, et dans le but d'obtenir des résultats significatifs, nous limitons le nombre de souris à 3 par antigène. Nous utilisons un adjuvant synthétique (Titermax Gold) à la place de l'adjuvant de Freund classiquement utilisé car ce dernier induit de forte irritation au site d'immunisation. La production des hybrides cellulaires à partir des cellules des ganglions poplités nous permet de limiter la durée du protocole à 17 jours et de réduire le nombre d'immunisation à 2. Enfin les animaux sont observés quotidiennement et des points limites sont mis en place afin d'évaluer le bien être animal et d'intervenir en cas de nécessité.

3296. Certains polymorphismes génétiques des récepteurs à la nicotine sont associés à l'incidence des cancers pulmonaires. La signification physiopathologique de cette découverte reste encore inconnue et le rôle de ces polymorphismes reste à étudier. Les objectifs de notre projet sont donc de rechercher, en utilisant en particulier des modèles murins, l'implication des récepteurs à la nicotine exprimés au niveau pulmonaire, et en particulier de leurs polymorphismes génétiques, dans les événements conduisant au cancer pulmonaire. Le but de notre étude est ici de focaliser sur un polymorphisme d'un des récepteurs à la nicotine, qui se traduit par une mutation D398N, polymorphisme fortement associé à l'incidence des cancers broncho-pulmonaires.

Lors de précédents travaux, nous avons montré des altérations de la réparation de l'épithélium des voies aériennes de souris exprimant la mutation D398N, la réparation est ainsi plus lente et est accompagnée d'une inflammation plus marquée.

Pour compléter ce travail, nous souhaitons étudier in vitro les propriétés des cellules de l'épithélium des voies aériennes exprimant la mutation D398N, caractériser in vivo le contexte inflammatoire et étudier son implication dans les altérations de la réparation épithéliale.

Notre projet, visant à étudier les remaniements tissulaires associés à la mutation D398N, est conditionné par l'utilisation de souris transgéniques exprimant cette mutation et récemment mises à notre disposition dans la cadre d'une collaboration. Ce projet ne peut être réalisé sur des cultures de cellules pulmonaires, par ailleurs maîtrisées au laboratoire. En particulier, l'étude de la réparation tissulaire et du contexte inflammatoire ne peut être réalisée qu'in vivo.

Nous avons essayé de restreindre au minimum le nombre d'animaux utilisés. La plupart des protocoles expérimentaux, en particulier le protocole de lésion pulmonaire, sont maîtrisés par le laboratoire depuis plusieurs années. Nous en connaissons donc la variabilité expérimentale et le nombre d'animaux à inclure dans chaque protocole est réduit au minimum. Les tests d'analyse statistique non paramétriques, adaptés aux échantillons faibles, sont systématiquement utilisés. Ce projet sur 5 ans nécessite l'utilisation de 724 souris : 492 souris KO $\alpha$ 5, 96 souris Kia5 et 136 souris témoins C57BL/6.

Certains protocoles impliquent des lésions pulmonaires. Les protocoles ont été systématiquement discutés avec un vétérinaire ; des anesthésiques et/ou analgésiques sont utilisés lorsque jugés nécessaires. Une surveillance journalière des animaux sera effectuée afin de déterminer toute douleur ou souffrance éventuelle qui sera prise en charge le cas échéant, et des points limites pertinents seront déterminés. Au cas où une souffrance ne saurait être prise en charge et qu'un point limite serait atteint, la décision d'euthanasie sera prise.

Les protocoles sont parfois très longs, de quelques semaines à un an, et une attention particulière est portée à l'enrichissement du milieu : sélection de litières propices à l'aménagement (copeaux de bois de tailles variées), utilisation en simultané ou en alternance de solutions d'enrichissement : tubes "Tunnel Mandrin", dômes "Cello Dome", plaquettes de fibres de diverses composition (coton, cellulose), frisettes en carton (Sizzle-Dri). Les animaux reçoivent de la nourriture et de l'eau à volonté.

3297. Le présent projet de recherche consistera à étudier le rôle d'un gène suppresseur de tumeur dans la progression métastatique des cancers du poumon. L'objectif de ce travail est de mieux comprendre les mécanismes qui conduisent à l'invasion tumorale et la formation de métastases afin d'identifier de nouveaux marqueurs pronostiques et de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques anti-cancéreuses.

Les interactions entre les cellules tumorales et les cellules de l'hôte sont nécessaires à la progression métastatique. Bien que les mises au point initiales soient réalisées sur des modèles d'invasion in vitro, ils ne permettent pas de reproduire la complexité de ces interactions présentes uniquement dans un organisme entier. Dans ce contexte, ces études justifient l'utilisation de modèles animaux.

Ce projet sur 5 ans nécessite l'utilisation de souris (Total : 748) qui recevront les cellules tumorales humaines. Lors de nos expériences, nous utiliserons le nombre minimal de souris requis par condition expérimentale (10) pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Les deux modèles utilisés dans ce projet sont complémentaires (étude des étapes précoces et tardives de la progression métastatique) et utilisent des procédures déjà mises au point et couramment décrites dans la littérature. Une surveillance journalière des animaux sera effectuée afin de déterminer toute douleur ou souffrance éventuelle qui sera prise en charge le cas échéant, et des points limites pertinents seront déterminés. Au cas où une souffrance ne saurait être prise en charge et qu'un point limite serait atteint, la décision d'euthanasie sera prise.

3298. La cryoconservation des embryons, en association avec le transfert d'embryons est une technique qui permet le maintien de la biodiversité génétique pour des races en voie d'extinction, ou des races menacées par des fléaux sanitaires. Elle est très utilisée par les filières d'élevage pour diffuser plus largement le progrès génétique. La filière porcine ne dispose pas encore pleinement de ces biotechnologies, car la cryoconservation de l'embryon porcin n'est pas encore une technique suffisamment fiable et rentable pour être utilisée sur le terrain, et ce, même si depuis une dizaine d'année des progrès considérables ont été réalisés grâce à l'utilisation d'une nouvelle technique de cryoconservation : la vitrification. L'embryon de porc est très sensible à un abaissement de température et renferme une quantité de lipides très importante.

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre la variabilité de la qualité embryonnaire après gel / dégel des embryons (= viabilité), comparée à celle d'embryons à l'état frais. Nous tenterons de remédier au déficit rencontré en utilisant des milieux de vitrification mieux adaptés, dans un souci notamment d'utiliser des milieux le plus définis possible, sans ajout de protéines animales, de mieux préparer l'embryon à la cryoconservation en lui appliquant des traitements qui permettent par exemple de réduire la quantité de lipides intrinsèque. Pour valider l'efficacité et la fiabilité de notre technique, nous réaliserons des transferts d'embryons sur des femelles receveuses.

Afin de REDUIRE le nombre d'animaux à utiliser, nous avons choisi de superovuler les donneuses d'embryons. C'est une technique couramment utilisée et qui donne de très bons résultats dans l'espèce porcine. Nous pouvons après superovulation collecter entre 15 et 20 embryons par donneuse, contre seulement moins de 10 si la femelle n'est pas superovulée.

La procédure de superovulation choisie est RAFFINEE : elle minimise au maximum les interventions même peu douloureuses pour l'animal. En effet, la synchronisation des femelles se fera par voie orale à l'aide d'un progestagène pendant 18 jours et seulement quatre injections de gonadotropines chorioniques par voie intramusculaire sur chaque animal seront nécessaires. De même pour les receveuses, la procédure de préparation est RAFFINEE : une seule injection intramusculaire de gonadotropines chorioniques sera réalisée. Lors du transfert proprement dit, qui est fait de façon chirurgicale par le chirurgien habilité, les femelles seront mises sous traitement anesthésique et analgésique. L'environnement dans lequel les femelles de étude se trouveront sera enrichi avec des objets et jouets adaptés (chaîne, balle, ballon ...).

REMPLENER l'utilisation de porcs dans cette expérimentation n'est pas possible puisque c'est pour cette espèce que nous souhaitons améliorer la cryoconservation des embryons. Il n'y a pas de modèle équivalent. Nous avons besoin au maximum de 90 femelles pour réaliser ce projet.

3299. Les syndrômes neurologiques paranéoplasiques (SNP) (Paraneoplastic Neurological Degeneration : PND) sont des manifestations neurologiques qui se développent chez les patients atteints d'un cancer (cancer du poumon à petites cellules, cancer des ovaires...) chez lesquels une réponse immunitaire anti-tumorale va se diriger contre les neurones, provoquant une maladie auto-immune.

Selon la partie du cerveau qui est affecté les patients peuvent souffrir de symptômes neurologiques sévères ; problème de coordination motrice, de perturbations sensorielles, de déficiences cognitives, des problèmes de vision, perturbations du sommeil, crises...

Bien que les mécanismes immunitaires pathogènes ne sont pas encore identifiés dans les SNP, la contribution des anticorps a longtemps été suggérée mais toujours non prouvée. Toutefois, le rôle potentiel des cellules T est de plus en plus mis en évidence, en particulier des cellules T CD8, dans le déclenchement des SNP.

Pour obtenir de nouvelles informations sur les mécanismes immunitaires impliqués dans les SNP, nous allons utiliser un modèle de souris génétiquement modifié, dans lequel l'hémagglutinine (HA) du virus de la grippe est exprimée dans les neurones. Des tumeurs exprimant HA seront injectées aux souris ainsi que des lymphocytes T spécifiques à HA afin de mimer les syndromes observés en pathologie humaine.

Avec ce nouveau modèle, notre projet vise à élucider le lien entre l'efficacité des réponses cellulaires anti-tumorales T CD8 et l'inflammation du cerveau et des dommages causés.

Cette étude permettra d'accroître nos connaissances sur la façon dont l'immunité tumorale peut être déclenchée avec succès; comment elle peut générer une maladie neurologique auto-immune rare mais très grave associée à un cancer, et aider à développer des stratégies thérapeutiques contre cette maladie invalidante.

Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 1230 animaux sur 3 ans.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet.

Remplacement : le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude se fait après de nombreuses études in vitro dans des modèles cellulaires montrant l'importance de ces gènes dans le fonctionnement du système immunitaires. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car les études in vitro ne reproduiraient pas l'ensemble des voies impliquées dans des modèles physiologiques intégrés et par conséquent ne permettent pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables et pertinents de la pathologie humaine.

Réduction : les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. Ce projet a déjà obtenu l'accord du comité d'éthique régional et les études effectuées nous ont permis de maîtriser ces modèles murins permettant de réduire le nombre d'animaux. De plus, nous avons également pu valider certaines approches expérimentales in vitro permettant d'optimiser l'utilisation des animaux. Les résultats actuels ont permis de valider que des lots de 10 souris selon les paramètres à évaluer permettent d'acquérir des données fiables.

Raffinement : Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, qui auront été définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal.

3300. Dans le cadre des enseignements d'Immunologie de la Licence Sciences de la Vie et de la Terre, les étudiants peuvent suivre 3 unités d'enseignement d'Immunologie, 1 en 2ème année et 2 en 3ème année concernant environ 350 étudiants par an. La formation des étudiants en Biologie nécessite que ceux-ci acquièrent un minimum d'expérience dans le domaine de la manipulation des animaux vivants et la réalisation de manipulations courantes qu'ils seront amenés à reproduire ultérieurement dans leur carrière (manipulation des animaux, recueillir des paramètres physiologiques, ...) afin d'appliquer la théorie de leurs enseignements en pratique sur l'animal. Les objectifs pédagogiques comprennent également une sensibilisation de l'étudiant au bien être de l'animal au cours de sa manipulation et à la prise en charge de la douleur. Le projet consiste à mener une étude sur la cinétique de réponse immunitaire humorale en quantifiant au cours du temps la production d'anticorps puis à démontrer la bi fonctionnalité des immunoglobulines produites. Des analyses immunohistochimiques sur les organes lymphoïdes sont également mises en œuvre. L'antigène utilisé correspond à des globules rouges de lapin qui sont injectés à des souris. L'intérêt d'utiliser un antigène cellulaire permet de développer par la suite des méthodologies d'hémagglutination et d'Hémolyse. Le sang du lapin est prélevé au niveau de l'artère centrale de l'oreille, les globules rouges sont ensuite lavés avec du sérum physiologique avant d'être injecté par voie sous cutanée à des souris. Les prélèvements sanguins chez la souris sont réalisés par incision d'une veine de la queue. Le dernier prélèvement se fait sous anesthésie par ponction intracardiaque afin de récupérer le plus grand volume sanguin possible. Les organes lymphoïdes (Thymus, rate, ganglions lymphatiques et plaques de Peyers) sont ensuite prélevés pour les études immunohistologiques. Dans le respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux est réduit à son maximum, les animaux sont stabulés dans l'animalerie au minimum une semaine avant le début de la procédure. Un enrichissement est utilisé dans les cages (dômes ou tunnel) et la présence de 4 animaux par cage est appliquée afin de réduire l'anxiété et le stress des animaux. Une surveillance quotidienne est exercée pour s'assurer du bon état général des animaux. Des manipulations (simulations de la contention) et des préhensions sont réalisées pendant les 5 jours précédant le début des TP afin de réduire le niveau d'anxiété de l'animal. Au total, par an et pour environ 350 étudiants, ces travaux pratiques nécessitent l'utilisation d'un lapin et de 30 souris. Le lapin ne subissant que 3 prélèvements sanguins, il n'est pas euthanasié et peut être réutilisé dans le cadre d'autres projets. Soit sur 5 ans un total de 5 lapins et 150 souris.