



**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 (33)

3301. La perfusion cérébrale est un mécanisme dynamique permettant, grâce aux vaisseaux sanguins, d'irriguer le cerveau et de l'alimenter en nutriments et en oxygène. L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), grâce à sa capacité à mesurer le débit sanguin cérébral de façon dynamique et non-invasive, est bien placée pour en fournir une imagerie véritablement fonctionnelle.

La perfusion locale est un paramètre majeur dans le diagnostic et l'évaluation de la gravité de nombreuses maladies cérébrales. Les méthodes d'IRM existantes pour mesurer la perfusion cérébrale sont difficiles, prennent beaucoup de temps et / ou nécessitent une injection d'agents de contraste intraveineux. En outre, afin d'être quantitatif, ces méthodes nécessitent une évaluation exacte de la fonction d'entrée artérielle, ce qui est très difficile.

L'objectif global de ce projet est de développer une technique d'IRM, entièrement non-invasive, « intravoxel incoherent motion » (IVIM) pour pouvoir caractériser in vivo la microvascularisation du cerveau. Une fois le développement de la technique d'IVIM terminé, celle-ci sera transférée en clinique pour la caractérisation des tissus malades, par exemple en cas d'ischémie cérébrale, tumeur ou traumatisme cérébral. Les modèles biophysiques seront dérivés de considérations théoriques et de simulations numériques prenant en compte tous les éléments d'un voxel (1 pixel en 3D) de tissu. Les valeurs des paramètres physiologiques extraites des données IVIM seront validées par comparaison avec des techniques de perfusion reconnues (marquage de spin artériel par exemple).

Aucun modèle cellulaire ou informatique ne pouvant reproduire la microvascularisation cérébrale et ses pathologies, le recours aux animaux est nécessaire. Les rongeurs utilisés pour cette étude sont nés et ont été élevés dans des établissements agréés. Leur nombre (88) a été réduit au minimum nécessaire pour détecter un effet statistique. Ce projet est réalisé en s'assurant qu'aucune angoisse, douleur ou souffrance ne soit ressentie lors de toute intervention sur les animaux. Pour cela, des protocoles d'anesthésie et d'analgésie sont définis et validés par une équipe vétérinaire. Une observation quotidienne des animaux sera effectuée pour s'assurer de leur bien-être. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet. En cas d'effet inattendu, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en œuvre les traitements appropriés ou décider de l'euthanasie.

3302. Le cancer est une maladie complexe qui peut prendre des formes extrêmement variées, en fonction des organes et des tissus affectés. Un produit ayant démontré des propriétés anti-cancéreuses in vitro pourra faire l'objet d'une évaluation d'activité antitumorale dans un modèle animal rongeur (souris, rat) porteur de tumeurs. L'utilisation de ces animaux reste le seul moyen aujourd'hui de déterminer l'efficacité antitumorale dans un modèle in vivo, et d'étudier les relations entre le devenir d'un produit dans un organisme vivant (pharmacocinétique) et la modulation de la cible d'intérêt pour combattre le cancer (pharmacodynamie) avant son utilisation en clinique humaine (Essais cliniques de phase I). D'autre part le système immunitaire est capable de contrôler en partie le développement de tumeurs. Le système immunitaire des rongeurs et des humains étant différents, il est indispensable de mettre en place des modèles tumoraux sur des animaux immunodéprimés pourvus d'un système immunitaire humain reconstitué.

Le rongeur (souris et rat) est utilisé pour évaluer la tolérance et les propriétés thérapeutiques anticancéreuses de produits innovants de thérapie ciblée et/ou cytotoxique et montre un intérêt à manipuler le système immunitaire pour combattre la progression et l'invasion tumorale. Seuls les produits ayant démontré des propriétés thérapeutiques et pharmacocinétiques intéressantes et favorables (absorption, distribution, métabolisme et excrétion) par des tests in vitro, sont sélectionnés pour être testés chez l'animal. Le recours à l'animal valide l'intérêt d'une thérapie possédant ces propriétés in vitro. Ces deux espèces rongeurs ont été choisies car ce sont des modèles de première intention en recherche anti-cancéreuse et les mieux caractérisés.

En effet, sans évaluation du potentiel thérapeutique, un produit anti-cancéreux ne peut être développé chez l'homme. L'ensemble des études concernées par ce projet a pour but d'étudier les relations entre le devenir d'un produit et la modulation de la pathologie, d'évaluer la tolérance et les propriétés thérapeutiques de produits innovants, dans un organisme vivant. Elles permettront aussi d'anticiper les doses optimales qui devront être testées chez l'homme.

Les études réalisées au sein du centre de recherche sont encadrées par des recommandations internes et validées par la structure du bien-être animal relatives à l'utilisation des animaux (hébergement, soins, manipulation, expérimentations) et ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal.

Un support en biostatistiques est apporté par des experts de la spécialité, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées et réduire le nombre d'animaux utilisés. Ces méthodes sont cohérentes avec l'historique des données en termes d'animaux utilisés. Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact à l'animal et à l'observation des signes cliniques fondamentaux.

Ce projet couvre l'utilisation d'au maximum 132400 animaux (125000 souris dont 1500 petits non sevrés et 7400 rats (dont 360 petits non sevrés) pour 5 ans.

3303. La maladie de Parkinson est une maladie dégénérative du cerveau, elle est progressive et caractérisée par des déficits moteurs (tremblements, difficultés de mouvements) et des déficits non-moteurs (anxiété, troubles de la mémoire). Cette maladie résulte de la mort lente de certaines cellules du cerveau, les neurones, due à une accumulation toxique d'une protéine, l'alpha-synucléine. Il n'existe aucun traitement efficace et réparateur visant à rétablir les déficits liés à cette pathologie. Ceci constitue un enjeu médico-social d'importance.

Ce projet consiste à établir un modèle de la maladie de Parkinson chez la souris qui ensuite servira au criblage de composés médicamenteux pour traiter cette maladie. Ce modèle consiste à injecter dans le cerveau une très faible quantité d'alpha-synucléine et d'évaluer les déficits induits dans cinq tests de comportement courts et non aversifs évaluant la force musculaire, la coordination des mouvements, la mémoire de travail, la mémoire visuelle des objets et la mémoire topographique, ainsi que dans un test légèrement aversif pour évaluer l'anxiété. Nous souhaitons évaluer et comparer l'injection de cette protéine dans deux endroits différents du cerveau: le striatum, lieu de la pathologie de la maladie de Parkinson et le ventricule lieu sensible pour la dissémination de protéines, comme l'alpha-synucléine, dans le cerveau et de suivre ces mêmes animaux à cinq temps différents (7, 15, 30, 60 et 90 jours). Le peptide sera injecté dans le cerveau sous anesthésie générale en condition stérile (raffinement), puis, après une période de rémission, ils seront testés dans six procédures comportementales légères aux temps pré-cités. Après l'injection, les animaux seront hébergés en cage individuelle car il est nécessaire que les sutures ne soient pas endommagées par les congénères. Ces cages contiendront de l'enrichissement environnemental (buchette de bois, tubes cartonnés et matériel de nidification) (raffinement).

Nous utiliserons 50 souris mâles de la souche C57BL6/J, utilisés couramment dans la recherche sur les maladies neurodégénératives et repartis en 4 groupes,

Groupe 1: Injection de sérum physiologique dans le striatum.

Groupe 2: Injection d'alpha-synucléine dans le striatum.

Groupe 3: Injection de sérum physiologique dans le ventricule.

Groupe 4: Injection d'alpha-synucléine dans le ventricule.

Les groupes sont constitués de 12 individus et nous y ajouterons 2 souris supplémentaires pour palier à la perte potentielle d'animaux lors de la chirurgie.

Les groupes 1 & 2 seront comparés par des méthodes statistiques à chaque temps. Il en sera de même pour les groupes 3 & 4.

Le nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats exploitables statistiquement.

L'étude de la mémoire, de l'anxiété et des troubles moteurs ne peut s'effectuer sans l'utilisation d'animaux., cependant l'utilisation des mêmes animaux à tous les temps dans des procédures légères permet de réduire le nombre d'animaux utilisés (réduction). Tous les animaux seront mis à mort par une méthode réglementaire à la fin de ce projet. Les structures cérébrales seront alors prélevées afin d'obtenir un maximum d'information sur les modifications des cellules nerveuses du cerveau après induction de la pathologie.

3304. Développer une immunothérapie du diabète de type 1 (DT1 ou insulino-dépendant) basée sur une vaccination orale. Le DT1 constitue un enjeu majeur de santé publique. Son incidence augmente de ~4% chaque année. Il touche surtout les enfants et les jeunes adultes, avec des traitements contraignants à vie et des complications graves sur le long terme. Il s'agit d'une maladie auto-immune. Le système immunitaire s'attaque de façon anormale à l'insuline et à d'autres protéines produites par les cellules bêta-pancréatiques, menant à leur destruction. Aujourd'hui on peut seulement remplacer l'insuline par des injections, alors qu'il faudrait intervenir sur le système immunitaire. Il faut donc développer un vaccin – ou plutôt un 'contre-vaccin' – qui soit capable de neutraliser la réponse auto-immune contre les cellules bêta. Seule l'expérimentation sur des souris qui développent un DT1 permettra donc de réaliser cet objectif.

Le projet examinera :

1) Différents types de vaccin oral, à l'aide de l'insuline et d'autres protéines pancréatiques, sous leur forme naturelle ou 'déguisées' en anticorps. Ces derniers peuvent traverser la barrière intestinale après administration orale.

2) L'administration à 3 moments de la vie : néonatale, adulte et après apparition du DT1.

3) 4 modèles de souris complémentaires : un modèle transgénique 'simplifié', mieux adapté pour étudier les mécanismes thérapeutiques ; deux modèles 'naturels', plus proches de la maladie humaine ; et un modèle 'humanisé' créé pour ce projet, afin de reproduire l'interaction entre le vaccin et son récepteur humain.

La protection vis-à-vis du DT1 et les mécanismes sous-jacents seront analysés.

Les procédures expérimentales seront :

1) La vaccination orale : par gavage des souris avec les différentes protéines.

2) L'induction d'un DT1 par injection intrapéritonéale pour les souris transgéniques ; les autres souris développant déjà un DT1 spontané.

3) Les prélèvements de sang pour le diagnostic de DT1.

Cette étude, prévue sur 5 ans, nécessitera au total de 1.260 souris.

Ces procédures ont été élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible pour obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Les vaccins utilisés ont déjà été testés dans un précédent projet par administration intraveineuse à des souris gestantes. Le but est donc ici de rechercher un effet thérapeutique similaire par voie orale moins invasive, qui sera moins douloureuse pour la souris et plus adaptée pour une application chez l'Homme. Les procédures nécessaires sont donc en grande partie déjà validées. La souffrance des souris sera réduite avec une analgésie adaptée en cas de nécessité, et en n'utilisant le prélèvement de sang, plus douloureux, que pour confirmer une hyperglycémie déjà détectée de façon non-invasive dans les urines. Les prélèvements d'organes pour étudier les mécanismes thérapeutiques seront faits après sacrifice de l'animal. Les souris diabétiques seront également sacrifiées afin d'abrèger leurs souffrances.

Si elle est efficace, cette vaccination orale pourra aboutir rapidement à des essais cliniques, pour lesquels nous constituons d'ores et déjà des cohortes de patients adaptées.

3305. Les cellules du système immunitaire jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire dans de nombreux contextes physiopathologiques tels que les cancers. La découverte de nouvelles molécules capables de diminuer la différenciation en lymphocytes favorisant la croissance tumorale, comme les Th17, et de fait à diminuer la production de substances pro-inflammatoires telles que les interleukines pourraient aider à lutter contre de nombreux échecs thérapeutiques rencontrés dans de nombreux cas de cancers. Ce projet vise à étudier chez la souris le potentiel immunomodulateur de deux molécules, la metformine, un antidiabétique de type-2, et le resvératrol un polyphénol, dans le mélanome et le cancer colique, et d'étudier leur capacité à réduire la différenciation des lymphocytes Th17.

Nous utiliserons des souris présentant un diabète de type 2 associé à une obésité. Ces modèles sont d'origine génétique, nutritionnel ou simulant un vieillissement précoce. Les modèles tumoraux utilisés seront le modèle de mélanome et le modèle de cancer colique en injection sous cutanée.

Lors de nos expériences, nous utiliserons le nombre minimal de souris requis par condition expérimentale pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Les modèles utilisés dans ce projet sont complémentaires et utilisent des procédures déjà mises au point et couramment décrites. 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.

Le nombre total d'animaux estimé pour la mise en œuvre de ce projet est de 640

3306. L'étude de la pharmacocinétique d'une molécule à visée thérapeutique en développement est réalisée après validation des travaux de pharmacodynamie in vivo. La pharmacocinétique 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 endormi et anesthésié une dose non toxique de la 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 en principe actif étudié. Après avoir fait des recueils à intervalles réguliers (pendant quelques heures), la concentration en principe actif est déterminée, permettant ainsi de suivre l'évolution de sa concentration dans le tissu étudié. Rapportée à la concentration sanguine, on peut évaluer le rapport de diffusion de la molécule.

Dans notre cas, ces études seront réalisées chez le Rat. Nous étudierons simultanément la cinétique plasmatique du principe actif ainsi que sa distribution dans différents tissus. Ainsi, la technique de microdialyse permet le suivi de l'évolution de concentrations dans différents tissus chez un même animal.

A l'issue de la mise en place du guide de microdialyse un traitement par anti-inflammatoire est mis en place, et les animaux sont placés dans des cages individuelles, et les cages sont replacées dans la pièce de stabulation initiale des rats. Les études sont réalisées sous anesthésie générale. L'animal étant sous anesthésie lors de la microdialyse, il se subira pas les dommages liés à la pose de la sonde et aux prélèvements des dialysats. Un traitement antalgique à base d'anti-inflammatoire sera mis en place après la pose du guide de microdialyse.

De plus, chaque animal est son propre témoin ce qui concourt à réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés.

Un maximum de 100 animaux par an pourra être utilisé, en fonctions du nombre de principes actifs étudiés et des modalités d'administration étudiées, soit un total de 500 rats sur 5 ans.

3307. Notre projet a pour but d'évaluer de nouvelles molécules sondes pour développer une technique d'imagerie innovante et peu invasive du stress oxydant dans le cerveau utilisant la résonance paramagnétique électronique (RPE). Cette technique s'apparente à l'IRM et est pratiquée sous anesthésie. Pour cela, nous étudierons la distribution et la stabilité des sondes dans l'organisme de la souris normale après injection intraveineuse.

Le stress oxydant est le facteur déclenchant originel ou bien un facteur secondaire qui participe aux complications d'un grand nombre de situations pathologiques (inflammation, cancer, maladies neurodégénératives, accidents vasculaires cérébraux). Actuellement, seule une analyse ex vivo permet de détecter les lésions dues à ce stress au niveau des protéines, de l'ADN et des lipides des tissus, alors qu'une détection précoce in vivo pourrait constituer une aide au diagnostic précoce et au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces.

La souris est le modèle animal le plus utilisé en laboratoire. Nous l'avons donc choisi pour sélectionner les sondes qui ont vocation à être utilisées ensuite sur des modèles murins de pathologies cérébrales diverses. L'appareil d'imagerie a été entièrement adapté pour assurer un suivi respiratoire et un maintien de la température corporelle de la souris pendant l'expérience qui ne dépassera pas deux heures. La technique en elle-même ne devrait pas engendrer de souffrance chez l'animal. Les molécules sondes seront injectées dans la veine de la queue directement ou via un cathéter. Un prélèvement des différents organes sera réalisé sur une fraction des souris après euthanasie pour analyser la distribution de la sonde. Nous envisageons de tester 5 nouvelles sondes par an. Cette étude prévue sur 5 ans nécessitera, au maximum, un total de 795 souris.

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Nous nous attacherons à prévenir tout inconfort lié à la déshydratation de la souris pendant l'anesthésie. L'objectif de notre recherche étant, à terme, de pouvoir faire des suivis répétés sur le même animal, il est capital que la santé et le bien être de celui-ci soient le moins perturbés possible par l'expérience.

Il faut souligner que l'utilisation d'une méthode d'imagerie non invasive permettra à terme de réduire le nombre d'animaux utilisés pour caractériser le stress oxydant dans la mesure où des études longitudinales sur le même animal deviennent possibles.

3308. L'état de stress post traumatique (ESPT) est un trouble d'anxiété observé chez des personnes témoins d'atrocité comme les victimes d'attentat ou de violences sexuelles. A ce jour, aucun traitement pharmacologique n'est disponible afin de traiter les états de stress aigu (au moment de l'exposition au trauma) et les troubles psychiatriques observés à plus long terme (quelques mois à plusieurs années).

Le neuropeptide S (NPS) est un neurotransmetteur du cerveau récemment mis en évidence et qui est devenu une nouvelle piste thérapeutique prometteuse pour traiter les troubles psychiatriques induits par un stress intense. Son administration diminue les niveaux d'anxiété et protège des effets à long terme d'un stress traumatique. Cependant, ces études ont été réalisées par des injections intracérébrales chez l'animal, méthode difficilement transposable à l'Homme. De plus, l'administration de peptide thérapeutique ne peut pas être envisagée par la voie orale classique car il serait totalement dégradé par l'action des enzymes digestives.

L'administration intranasale est une voie alternative pour délivrer des molécules thérapeutiques au niveau cérébral et est actuellement prescrite pour de petits peptides comme l'ocytocine. Le passage nez-cerveau n'est pas parfait, seulement 0,1-1 % des molécules arrivent à atteindre leur cible. Les nanoparticules pourraient être un moyen efficace pour améliorer le passage nez-cerveau.

L'avantage de ce projet est de tester un nouveau traitement précoce des états de stress aigu facilement utilisable sur le terrain. L'objectif est d'évaluer, chez la souris, si les nanoparticules peuvent améliorer l'efficacité du NPS administré par voie intranasale. Nous proposons une étude pharmacocinétique au niveau comportemental (test d'anxiété ; test d'extinction de peur conditionnée) et neurobiologique (activation corticale évaluée par électrophysiologie, microdialyse et expression de facteurs de transcription). En parallèle des nanoparticules, nous comparerons les effets observés de ceux obtenus avec la vitamine B12 qui améliore également le passage nez-cerveau.

L'analyse de comportement complexe comme l'anxiété et des corrélats neurobiologiques sous-jacents (niveau moléculaire et cellulaire) ne peut se faire que sur un Mammifère vivant et ne peut pas être effectuée chez l'Homme, ni être remplacée par des méthodes alternatives in vitro ou in silico. En accord avec le principe de raffinement, une attention particulière sera portée aux conditions d'hébergement des animaux afin d'améliorer leur bien-être (élevage en cage collective, enrichissement de leur milieu de vie, nourriture et boisson à volonté). La première étude de comportement propose d'employer un effectif total de 420 souris de la souche C57/Bl6J (28 groupes de 15 animaux/groupe) sur 5 ans afin de permettre une puissance statistique suffisante et nécessaire (critère pour passer au stade clinique). En accord avec le principe de réduction, chaque animal sera testé deux fois en comportement (diminution des effectifs par 2) et 160 d'entre eux seront « réutilisés » pour l'étude neurobiologique. La chirurgie pratiquée sur 80 animaux n'est pas dommageable pour l'animal. Cependant, les éventuels signes de souffrance seront systématiquement évalués par une grille objective et traités de façon adéquate. L'administration d'antalgiques en cas de douleurs intenses est prévue. Les 260 animaux non utilisés dans l'étude de neurobiologie seront reclassés à des fins pédagogiques.

3309. Un faisceau d'arguments expérimentaux et épidémiologiques indique que le manque de sommeil, conséquence d'une pathologie du sommeil ou d'un comportement volontaire de restriction de sommeil, est un facteur de risque important de maladies métaboliques telles que l'obésité, le syndrome métabolique et le diabète de type 2. Une meilleure compréhension des effets des perturbations des états de vigilance sur le métabolisme est susceptible de permettre le développement de nouvelles voies thérapeutiques visant à lutter contre les maladies métaboliques, un problème majeur de santé publique.

Plusieurs souris Knock Out (KO) semblent pouvoir constituer des modèles originaux et pertinents. En effet, elles présentent toutes des états de vigilance altérés, et l'une d'entre elles a déjà été proposée comme modèle d'obésité puisqu'elle présente toutes les caractéristiques de celle-ci.

Afin d'évaluer si les perturbations des états de vigilance de ces différentes souris KO sont liées à des altérations métaboliques, nous évaluerons, pour ces souris KO des variables comportementales (activité, prise alimentaire), physiologiques (dépense énergétique, métabolisme glucidique, profils lipidiques, concentrations hormonales) et le suivi du poids. Seules les mesures de la dépense énergétique, de l'activité physique et de la prise alimentaire seront réalisées dans ce projet.

Dans le but d'avoir des résultats les plus fiables possibles, ce projet répond au maximum aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

1) Remplacement :

Les mammifères sont les seuls animaux possédant un cycle veille/sommeil/rêve semblable à celui de l'homme. L'utilisation des animaux est donc indispensable pour accéder aux mécanismes impliqués dans les effets délétères d'un sommeil court et/ou de mauvaise qualité sur le métabolisme.

2) Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum (46 animaux) sans compromettre l'objectif du projet qui est de caractériser l'état métabolique de nos souris KO et de les comparer à celui de souris sauvages. Pour cela il est prévu de réaliser un certain nombre de mesures telles que l'activité spontanée, la prise alimentaire et la dépense énergétique.

3) Raffinement

Ces travaux de recherche fondamentale nécessitent des observations sur des animaux non anesthésiés vivant dans de bonnes conditions psychophysiologiques.

Le stress ayant une influence directe sur les mesures réalisées, le bien-être des animaux est impérativement pris en compte à chaque étape de l'expérimentation. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

3310. L'ataxie spinocérébelleuse 7 (SCA7) est une maladie héréditaire dégénérative rare affectant principalement le système nerveux, tels que le cervelet, la rétine et l'oreille. SCA7 est causée par une mutation dans la protéine ataxine-7, une protéine conservée au niveau de l'évolution, mais dont la fonction reste inconnue.

Récemment, nous avons étudié la fonction de l'ataxine-7 en utilisant le poisson zèbre, afin de faciliter les analyses grâce à sa transparence et à sa reproduction massive, mais aussi par soucis de substituer (ou remplacer) le modèle mammifère classique, la souris, par un modèle vertébré en principe moins affecté par l'expérimentation. Cette approche a porté ses fruits car nos résultats indiquent entre autres que la mutation causant SCA7 affecte non seulement le système nerveux, mais aussi le développement des organes périphériques. Cette nouveauté mérite maintenant d'être abordée chez la souris. Nos résultats déjà acquis avec le poisson zèbre vont permettre de guider l'expérimentation chez la souris afin réduire le nombre d'animaux nécessaires pour atteindre des résultats concluants. Pour ce faire, nous avons récemment acquis un nouveau modèle souris Knock-in SCA7, qui a été très peu caractérisé à ce jour, mais qui s'avère être le modèle reproduisant le mieux la pathologie SCA7 au niveau génétique.

Le but principal de ce projet est de faire une exploration fonctionnelle et morphologique des systèmes sensoriels (vision, audition), cardiaques, respiratoires, rénaux et squelettiques, afin de comprendre la physiopathologie de SCA7. Notamment, avec une cohorte maximale de 40 animaux, nous allons effectuer une analyse longitudinale à 2 âges différents à l'aide de procédures non invasives (imagerie in vivo, télémétrie, échographie, etc) afin de raffiner l'aspect qualitatif et quantitatif de l'étude, et de réduire le nombre d'animaux requis. A terme, ces informations vont permettre non seulement de comprendre les atteintes fonctionnelles, mais aussi de développer et tester des stratégies thérapeutiques afin d'alléger les souffrances liées à la pathologie.

3311. Ce projet se résume à l'administration d'un composé ou de plusieurs composés non radiomarqués ou radiomarqués par différentes routes d'administration à des singes afin de décrire le comportement et le devenir du produit dans un organisme vivant. Classiquement il s'agit de modéliser son absorption, sa distribution dans l'organisme, son métabolisme c'est à dire comment l'organisme procède à sa transformation et enfin à son élimination. La réalisation de ce projet fait partie des dossiers présentés aux autorités réglementaires.

L'évaluation de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'élimination d'un produit dans un organisme vivant ne peut pas être réalisée in vitro. Seule l'observation sur un organisme vivant dans son ensemble permet d'évaluer les différentes phases d'absorption, de métabolisme, de distribution et d'élimination du composé, de définir les relations et/ou interactions entre ces différentes phases et permet aussi de déterminer les niveaux du composé ou des composés administrés, de leurs métabolites et de marqueurs pharmacologiques au cours du temps dans l'organisme.

Le singe est choisi en fonction des résultats des essais préliminaires in vitro et in vivo (métabolisme) et de sa proximité génétique avec l'homme (cibles thérapeutiques génétiquement similaires). Le singe est pour certains composés l'espèce permettant la meilleure prédiction pour simuler les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques avant de réaliser la première administration chez l'homme. Le singe est couramment utilisé pour ce type de procédure et est accepté par les autorités réglementaires.

Le nombre d'animaux est optimisé en utilisant si possible un seul sexe, le minimum d'animaux pour obtenir des résultats statistiquement fiables et pour répondre aux objectifs du projet. Les doses utilisées sont en général faibles car aucun effet

toxique indésirable n'est recherchée ce qui permet une réutilisation des animaux. Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet peut être estimé à un total de 200 sur 3 ans.

Par défaut, l'hébergement des animaux est réalisé en groupe dans des cages conformes à la Directive 2010/63 avec des enrichissements.

L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, des analgésiques/anesthésiques peuvent être utilisés pour éviter l'inconfort et minimiser la douleur éventuelle, et un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée.

3312. Le mélanome de la choroïde est la plus fréquente des tumeurs oculaires de l'adulte. Dans 50% des cas les patients développent des métastases dont pour la majorité sont situés au niveau du foie. Pour la maladie métastatique, les traitements anticancéreux utilisés aujourd'hui ne montrent pas ou peu d'efficacité.

Nous avons établi des xénogreffes de tumeurs directement à partir de pièces opératoires de patients sur les souris immunodéprimées.

Nous avons mis en évidence la dérégulation d'une ou plusieurs voies responsables de la prolifération anormale des cellules dans les tumeurs. Notre but est d'évaluer l'efficacité antitumorale d'une molécule capable de bloquer une de ces voies et la combiner à la chimiothérapie utilisée en clinique dans cette maladie.

Expérimentation

La première étape de l'expérimentation consiste à vérifier l'absence de toxicité de l'inhibiteur et la chimiothérapie en association. Pour cette étape le nombre de souris nécessaire est de 36 souris. Les voies d'administration utilisées sont le gavage et la voie intrapéritonéale.

La seconde étape consiste à évaluer l'efficacité antitumorale de l'inhibiteur seul ou associé à la chimiothérapie sur les xénogreffes de tumeurs humaines et étudier le mécanisme d'action. Les greffes sont faites sous anesthésie générale. Des mesures régulières permettent l'évaluation de la croissance tumorale et l'efficacité des médicaments. Le nombre de souris nécessaire est de 380. Ce nombre est réduit à son strict minimum nécessaire et tient compte du taux de prise tumoral (67%) sur les animaux et l'évaluation de façon statistique robuste de l'effet des médicaments.

Le nombre total de souris nécessaire est de 416.

Les contraintes imposées aux animaux sont modérées et n'induisent pas de modification de leur bien-être. Les animaux sont surveillés quotidiennement et les point-limites, en accord avec les recommandations internationales en cancérologie, sont observés pour ceux-ci tout au long des expériences.

3313. Le traumatisme crânien est un problème majeur de santé publique fréquent, et potentiellement grave tant à court terme (risque vital) qu'à long terme (handicap). Malheureusement, il n'existe, à ce jour, toujours pas de traitement pour les patients. La recherche expérimentale étudie les mécanismes à l'origine des lésions de la substance blanche cérébrale, jusqu'ici largement sous-estimées, méconnues et potentiellement responsables de lourdes séquelles neurologiques observées même à distance du traumatisme crânien. Ainsi, l'espoir d'améliorer le pronostic de cette pathologie repose sur la découverte de cibles thérapeutiques pour les lésions de la substance blanche et les désordres neurocomportementaux conséquents. Pour cela, une description complète des mécanismes potentiellement impliqués dans l'apparition des lésions de la substance blanche est nécessaire et représente l'objectif de ce projet. Il sera étudié les modifications du lipidome dans les lésions de la substance blanche à l'aide d'un modèle expérimental de traumatisme crânien chez la souris, reproduisant la pathologie humaine. Les expériences seront réalisées chez 71 souris dont l'analgésie et l'anesthésie seront monitorées durant toute la durée de l'expérience. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux stables afin de limiter tout stress et modification de hiérarchie. Les lipides, présents principalement dans la substance blanche cérébrale, sont situés dans la gaine de myéline, impossible à reproduire in vitro. Il est donc nécessaire de réaliser des études chez l'animal entier soumis à un modèle de traumatisme crânien qui reproduit la pathologie humaine. L'ensemble des lipides sera étudié par chromatographie liquide haute résolution couplée à la spectrométrie de masse. Cette technique analytique permet sur un même échantillon d'identifier toutes les classes de lipides et de les quantifier. Ainsi cette étude a pour objectif d'identifier un ou des marqueurs lipidiques témoignant de lésion de la substance blanche débutante et/ou comme marqueur de sévérité de lésion de la substance blanche post-traumatique.

3314. Le contrôle de la biodisponibilité des nanoparticules est important pour leurs applications futures in vivo. Or toutes ces applications portent un danger dû à l'accumulation ou à la toxicité des nanoparticules. Il n'existe pas pour l'instant de stratégie permettant d'éliminer les nanoparticules de l'organisme une fois que leur rôle thérapeutique ait été accompli. Le but de ce projet est de développer une stratégie visant à contrôler la biodisponibilité des nanoparticules et d'empêcher ainsi leurs accumulations dans les organes. Nous proposons ainsi de profiter du caractère non-invasif et inerte des réactions chimiques dites « bioorthogonales » (une réaction chimique qui peut avoir lieu dans un milieu biologique complexe sans interférer avec les processus biochimiques natifs) pour cibler et éliminer des nanoparticules chez l'animal vivant. Nous proposons de fonctionnaliser convenablement des nanoparticules afin de permettre leur modification in vivo par une réaction chimique de type « click » qui conduira à leurs éliminations de l'organisme. Ce travail concernera trois types de nanoparticules : (1) des quantum dots ultra-brillants utilisés classiquement pour l'imagerie en biologie ; (2) des nanoparticules d'or connus pour leurs faibles toxicités et utilisées pour l'imagerie chez l'animal vivant; (3) des nanotriangles développés comme plateforme de

transport de composés pharmacologiques. La possibilité d'éliminer de l'organisme ces différents types de nanoparticules (avec des caractéristiques et des profils de biodistribution différents) permettrait d'évaluer le caractère robuste de la stratégie. Les réactions dites « bioorthogonales » sont des réactions chimiques qui peuvent avoir lieu dans un milieu biologique complexe sans interférer avec les processus biochimiques natifs. Nous proposons de profiter du caractère non-invasif et inerte de ces réactions pour cibler et éliminer des nanoparticules chez l'animal vivant. Le contrôle de la biodisponibilité des nanoparticules peut être important pour les applications futures des nanoparticules in vivo. Or toutes ces applications portent un danger dû à l'accumulation et à la toxicité des nanoparticules. Dans ce but nous proposons de fonctionnaliser convenablement trois types de nanoparticules afin de permettre leur modification in vivo par une réaction chimique de type « click » qui conduira à leurs éliminations de l'organisme.

Pour étudier la possibilité d'éliminer des nanoparticules de l'organisme d'un être vivant, il est indispensable d'utiliser comme modèle un animal dans son ensemble et sa complexité. Le remplacement par des modèles alternatifs n'est pas possible.

Pour réduire le nombre d'animaux dans les analyses pilotes, nous allons utiliser des souris C57BL6Ncr1 non-modifiés génétiquement et provenant des analyses de la reproduction dans les pièces d'hébergement d'animalerie et destinés au sacrifice. La taille des groupes expérimentaux sera fixée à n=6 animaux/traitement (taille validée pour les autres analyses biochimiques ainsi que pour les études pharmacocinétiques) et pourra être réduit en fonction de la variabilité biologique observée.

Dans le cadre de raffinement, la toxicité des nanoparticules sera préalablement testée in vitro. Les nanoparticules seront administrées par injections intra-péritonéales. Afin d'éviter les souffrances, l'état de l'animal sera suivi après administration des composés. L'identification de symptômes de détresse entraînera la réduction de la durée du test ou l'élimination des nanoparticules concernées des tests. Les techniques standards de prélèvements permettront d'obtenir des échantillons sanguins et les tissus. Au total, 219 animaux seront utilisés dans ce projet.

3315. Le contexte clinique de notre projet concerne le traitement des tumeurs cérébrales, et plus particulièrement : comment améliorer, grâce à des nanoparticules, l'efficacité de la radiothérapie, traitement majeur de ces tumeurs.

La finalité de ce projet est double :

1-Etudier la distribution corps entier et cérébrale de nanoparticules fluorescentes ayant un potentiel thérapeutique, après administration par différentes voies (intraveineuse, intra tumorale, cérébro-ventriculaire). Les résultats permettront de proposer des modalités thérapeutiques adaptées au traitement des glioblastomes par radiothérapie fractionnée.

2-Etudier la possibilité d'augmenter grâce aux irradiations la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et évaluer l'impact en terme de (re)distribution ou (re)localisation des nanoparticules dans le cerveau.

Cette approche préclinique doit permettre d'évaluer le meilleur schéma d'administration pour une nanoparticule donnée.

Notre projet cherchant à développer de nouvelles stratégies de traitements applicable à l'homme, il est nécessaire après les évaluations d'efficacité des nanoparticules in vitro, de caractériser et d'optimiser leur utilisation in vivo. Notamment, il est nécessaire de définir la voie d'administration la plus adaptée pour chaque nanoparticule, permettant le ciblage de la tumeur cérébrale et limitant la toxicité aux autres organes. Pour faire suite aux expérimentations in vitro qui montrent le potentiel thérapeutique des nanoparticules étudiées, l'étude préclinique sera réalisée sur un modèle animal de souris porteuse d'une tumeur intracérébrale avec pose de fenêtre intracrânienne. Le remplacement des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est dans ce contexte clairement pas possible puisque la distribution et la toxicité in vivo de nanoparticules dépendent de phénomènes biologiques complexes (adhésion des nanoparticules aux protéines plasmatiques, phagocytose, voies et vitesse d'élimination...). Cette étude préclinique nécessitera au total 118 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). Enfin, en conformité avec la règle des 3R, le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les souris seront anesthésiés dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées (implantation de tumeur, injection des nanoparticules, imagerie), et mis à mort dès lors que l'un des points limites sera atteint (Raffinement) : notamment, un test d'éviction d'obstacles permet un suivi d'éventuels traumatismes causés par l'opération, et d'évaluer le comportement (exploratoire entre autres) de l'animal.

De plus, nous utiliserons des techniques d'imagerie non invasive permettant notamment de réduire les souffrances de l'animal (Raffinement) et de réitérer nos observations dans le temps sur un même animal (Réduction).

3316. Le projet concerne une action de formation d'une durée de deux jours en direction de personnes appelées à travailler sur le modèle poisson (étudiants, animaliers, techniciens, ingénieurs, enseignants, chercheurs). Elle s'adresse donc à des personnes souhaitant se former tout au long de leur vie (formation continue) ainsi qu'à des étudiants (formation initiale). L'objectif est de former les participants aux bonnes pratiques sur les poissons, dans le respect de la réglementation et de l'éthique, de façon à ce qu'ils mobilisent ces enseignements dans leurs activités professionnelles pouvant relever de domaines variés, comme la recherche, l'agronomie, l'écologie ou encore la toxicologie.

Il s'agit de maîtriser le modèle biologique en termes :

- d'exigences physiologiques et comportementales : maintien/manipulation des poissons (densité d'élevage, qualité de l'eau), bien-être des poissons (physiologie du stress et de la douleur).

- anatomiques (savoir réaliser les prélèvements des différents organes).

De façon plus détaillée, la formation comprend une partie théorique (réglementation, éthique, techniques de maintenance et d'élevage de poissons) et une partie pratique (manipulation des poissons, méthodes d'anesthésie, de mesures biométriques, de prélèvements, d'analyses d'hormones et de mise à mort).

Les objectifs sont de former les personnes à la réalisation de gestes pratiques et de projets scientifiques nécessitant l'utilisation de poissons (absence de méthodes alternatives, et donc remplacement des animaux non envisageable). Ils seront sensibilisés au respect de la réglementation en vigueur et aux règles éthiques, avec en particulier la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) également appliquée dans le cadre de ce projet.

Pour la partie pratique, afin de recourir au nombre de poissons juste nécessaire pour répondre aux objectifs pédagogiques de la formation (réduction), nous prévoyons de recourir au maximum à 296 poissons par an, soit un cycle de formation (initiale et continue). Ce nombre de poissons correspond à l'effectif maximal de participants pouvant être formés sur un an (soit 37 personnes). Le nombre de poissons sera réparti en deux lots : un lot de poissons correspondant à une espèce carnivore (perche commune ou sandre, selon disponibilité) et un lot de poissons omnivores (gardon ou rotengle, selon disponibilité). L'intérêt de recourir à ces deux catégories d'espèces est d'ordre pédagogique et réside dans les différences anatomiques de ces deux groupes (système digestif en particulier, en lien avec leur régime alimentaire).

Le projet comprend une seule procédure de classe modérée quant à son degré de sévérité. Cette procédure intéresse les techniques d'anesthésie des poissons (avec une comparaison de méthodes) et de prélèvement de sang. Ce sont des pratiques de base qu'il convient de maîtriser dans les différents domaines d'activités visés par la formation. Les différentes méthodes d'anesthésie seront décrites en fonction des contraintes expérimentales puis testées. Ne seront concernés par cette procédure que les poissons ne présentant aucun des points limites intéressant l'activité de nage, le comportement alimentaire ou encore l'apparition de tout signe de maladie. Les méthodes d'anesthésie testées sur les représentants d'une espèce de chaque lot sont:

- une anesthésie par le froid, engendrant un ralentissement du métabolisme du poisson. En effet, la température corporelle des poissons suit la température du milieu environnant.

- une anesthésie chimique. Nous aurons recours à deux substances anesthésiques (MS222 et huile de girofle avec l'eugénol comme principe actif) dans le cadre de cette procédure.

Nous mesurerons, en fonction des méthodes d'anesthésie et des espèces de poissons, les délais et durées de phase d'endormissement, jusqu'à la disparition des mouvements operculaires, correspondant au stade III de l'anesthésie, soit le stade d'endormissement le plus profond. C'est durant ce stade que nous formerons les participants au prélèvement de sang (prélèvement d'1 mL maximum, au niveau du pédoncule de la nageoire caudale). Les poissons seront ensuite placés dans une bassine dite de réveil ; lorsqu'ils auront retrouvé leur comportement pré-anesthésique (généralement en moins de 10 minutes), ils pourront alors être replacés dans leur bassin d'origine.

En termes de raffinement, toutes les manipulations et les gestes expérimentaux portés sur les animaux seront au préalable réalisés par un enseignant chercheur compétent (niveau 1 du Diplôme Universitaire en expérimentation animale). Les participants seront ensuite guidés tout au long des différentes étapes à réaliser sur les poissons. L'enseignant veillera au respect des consignes transmises (manipulation des animaux, contrôle des gestes, vérification des doses d'anesthésiant, du volume de sang prélevé).

Au terme de ce projet, les poissons ne seront pas gardés en vie. Nous formerons les participants aux différentes méthodes conformes à la réglementation en vigueur de mise à mort des poissons. Nous présenterons les différentes raisons qui peuvent nous amener à choisir une méthode en particulier. La formation se poursuivra par l'étude anatomique des poissons (dissection et prélèvements des différents organes) et des analyses d'indicateurs de stress à partir des échantillons de sang. Il s'agit de variables très classiquement étudiées en expérimentation sur le poisson et qu'il convient de parfaitement maîtriser.

3317. Le Bisphénol A (BPA), est un polluant alimentaire pouvant affecter la fonction thyroïdienne. Un bon équilibre de cette fonction pendant la grossesse est requis pour un développement optimal du système nerveux central (SNC). Chez l'animal, une exposition de femelles gestantes au BPA a des répercussions sur le développement du SNC, le comportement et les capacités cognitives de leur descendance. Les objectifs de ce projet sont donc, d'une part, de préciser l'effet perturbateur thyroïdien du BPA pendant la gestation dans une espèce animale pertinente par rapport à l'Homme et, d'autre part, de relier ces altérations à des marqueurs de modifications du métabolisme de structures cérébrales critiques pour le développement neurocognitif. Le développement du SNC est complexe et résulte de nombreux processus. C'est donc une problématique qui ne peut être envisagée qu'à travers des approches intégratives regroupant tous les niveaux d'organisation et de régulation du fœtus (interactions mère-fœtus, interaction entre différents types cellulaires dans le SNC, interaction système endocrinien /cerveau...). Un tel niveau de complexité ne se retrouve qu'in vivo. Ce projet sera mené sur le modèle ovin en raison de la grande similitude existant avec l'Homme tant en termes de régulation de la fonction thyroïdienne qu'en termes de physiologie de la gestation. Les protocoles longitudinaux avec des traitements séquentiels des mêmes animaux et l'utilisation de méthode d'exploration générant un grand nombre de données sur un même individu permettent de limiter de façon conséquente le nombre d'animaux. L'hébergement et les soins aux animaux respectent le mode de vie et la caractère grégaire de cette espèce (hébergement au près ou en boxes collectifs, foin ad libitum..). Toute les procédures chirurgicales sont effectuées sous anesthésie générale et traitement antalgique. Dans un premier temps, nous déterminerons la plus faible dose de BPA affectant la fonction thyroïdienne de brebis gestantes. Plusieurs doses différentes de BPA doivent être testées. Un protocole par augmentation progressive des doses par paliers successifs tout au long de la gestation sera mis en place afin de limiter à 2 lots de 10 brebis chacun tout en augmentant le nombre de doses testées pour une détermination fine de cette dose minimale active. Une fois la dose seuil identifiée, il faudra confirmer dans un protocole plus classique avec 3 doses repères en plus du solvant, administrées sur toute la durée de la gestation chacune à 1 lot d'animaux différents : une dose forte à effet avéré, la dose journalière admissible réglementairement définie pour le BPA et une dose faible représentative de l'exposition humaine.

Un minimum de 6 animaux dans chaque lot est nécessaire pour pouvoir discriminer les effets du traitement de la variabilité interindividuelle naturelle soit 24 brebis.

La deuxième partie du projet visera à étudier l'impact sur le SNC du nouveau-né soit, d'un traitement au BPA associé à une diminution des concentrations en hormones thyroïdiennes chez la mère, soit, d'une diminution de ces hormones indépendamment de tout traitement chimique. Cette partie du projet sera basée sur l'analyse des profils métaboliques globaux de différentes structures cérébrales des agneaux nouveau-nés. Cette méthode globale permettra d'optimiser le nombre d'informations recueillies sur un même animal. Toutefois, l'exploitation statistique des résultats requiert d'avoir au moins 6 individus du même sexe pour chaque groupe soit 16 femelles gestantes (le sexe des agneaux n'étant pas connu avant la naissance) dans chacun des trois groupes (48 brebis). L'identification des structures cérébrales présentant des modifications des profils métaboliques ainsi que la nature même de ces modifications contribueront à une meilleure compréhension des mécanismes d'action et des conséquences de perturbations de la fonction thyroïdienne sur le développement du SNC.

3318. Le psoriasis est une maladie inflammatoire de la peau d'origine inconnue et non contagieuse, affection dermatologique qui touche 2 à 3 % de la population mondiale, atteignant de manière équivalente les hommes et les femmes. Le psoriasis en plaques, appelé également psoriasis vulgaris, est la forme la plus courante du psoriasis (plus de 90 % des cas). Dans sa forme bénigne et typique, le psoriasis se caractérise par des lésions rouges et squameuses du cuir chevelu, des genoux et des coudes, associées à une atteinte des ongles. Dans les cas graves, l'atteinte cutanée peut être généralisée (érythrodermie) et il peut exister des atteintes des articulations. Cette dermatose évolue de façon chronique avec des poussées entrecoupées de périodes de rémissions de durée variable au cours desquelles les lésions sont minimales. Aucun traitement permettant la guérison n'est connu ; le traitement proposé permet uniquement de contrôler l'évolution de la maladie, en permettant la régression transitoire plus ou moins complète des lésions. Le traitement est adapté en fonction de la gravité et du retentissement sur la qualité de vie des patients.

Les causes précises du psoriasis sont inconnues bien que, dans près de 30 % des cas, une prédisposition familiale existe, surtout si des facteurs externes viennent se rajouter. L'épiderme se renouvelle trop rapidement, en seulement quatre à six jours, au lieu des trois semaines habituelles ce qui engendre des inflammations localisées. Les cellules épidermiques s'accumulent à la surface de la peau et forment une couche de pellicules blanches appelées squames. Parfaitement inoffensives, celles-ci ont pourtant le désavantage d'être inesthétiques.

Le but de ce projet est de développer et valider aux niveaux pharmacologiques et comportemental un modèle de psoriasis chez la souris, en utilisant 2 souches différentes : Hairless Skh-1, souris dépourvue de poils très utilisée pour la recherche en Dermatologie, et BALB/c, souris pourvue de poils. Nous utiliserons un maximum de 64 souris femelles âgées de 6 semaines pour ce projet, réparties en 2 séries expérimentales.

La 1ère série expérimentale sera réalisée sur 32 souris, 16 Hairless Skh-1 et 16 BALB/c, réparties en groupes de 8 souris avec pour chaque souche un groupe sans induction de psoriasis (SIP) et un groupe avec induction de psoriasis (AIP). Les procédures appliquées seront a) le rasage des poils sous anesthésie gazeuse pour les souris BALB/c, b) l'application cutanée pendant 7 jours (J1 à J7) d'une pommade neutre pour les groupes SIP et d'une pommade contenant de l'Imiquimod, agent inducteur de psoriasis, pour les groupes AIP, c) l'évaluation comportementale de animaux dans un champ ouvert (open-field) pendant 15 minutes 24 heures après la dernière application cutanée (J8) avec enregistrement vidéo (vidéo-tracking et vidéo classique) pour la quantification de différents paramètres, d) un prélèvement de sang avant à la mise à mort des animaux pour le dosage de biomarqueurs (J8).

Les résultats de cette première série expérimentale conditionneront la réalisation de la 2ème série expérimentale : la souche de souris qui a le mieux répondu à l'induction du psoriasis sera utilisée et en cas de réponse positive des 2 souches, seule la souche Hairless Skh-1 sera utilisée.

La 2ème série expérimentale sera donc réalisée sur 32 souris, Hairless Skh-1 ou BALB/c, pour la validation pharmacologique et comportementale du modèle. Les 32 souris seront réparties en 4 groupes de 8 souris : un groupe SIP traité avec une pommade neutre, un groupe AIP traité avec cette même pommade neutre, un groupe AIP traité avec du Zorac® (rétinoïde utilisé pour le traitement de cette pathologie), et un groupe AIP traité avec du Daivonex® (analogue de la vitamine D pour le traitement des plaques étendues de psoriasis). Les mêmes procédures que celles décrites dans la 1ère série expérimentale seront utilisées, avec une procédure supplémentaire concernant le traitement des animaux par application cutanée des différentes pommades testées pendant 5 jours (J8 à J12), l'évaluation comportementale étant effectuée à la fin de l'induction du psoriasis avant le début des traitements (J8) et 24 heures après la fin des traitements (J13).

Les animaux seront placés à 2 par cage (18.9 x 29.6 x 12.8 cm) pour l'ensemble des groupes expérimentaux, en cycle de lumière inversé pour réaliser l'évaluation comportementale pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et une feuille de sopalin sera disposée dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Il n'existe pas de modèles in vitro permettant l'évaluation comportementale de composés (Remplacement) mais nous utiliserons un nombre réduit d'animaux mais suffisant pour mettre en évidence des différences significatives selon notre expérience des modèles en Dermatologie et dans nos conditions expérimentales (Réduction).

Des observations quotidiennes seront effectuées et l'atteinte des points limites définis (perte de poids de plus de 20%, affaiblissement (cachexie), convulsions, tremblements, paralysie, vocalises...) entraînera la sortie d'étude et la mise à mort des animaux selon les recommandations éthiques.

Compte-tenu de l'augmentation constante de l'incidence du psoriasis dans la population européenne et mondiale, le développement de ce modèle d'étude permettant ensuite d'évaluer des composés en développement présente un enjeu socio-économique certain afin de développer des traitements efficaces contre cette pathologie chez l'Homme.

3319. Le système immunitaire nous défend contre les infections et les tumeurs. Son activité doit être finement contrôlée afin de favoriser l'élimination des pathogènes ou des cellules cancéreuses tout en prévenant le développement des immuno-pathologies, provoquées par une activation exacerbée ou inappropriée du système immunitaire. Afin de mieux comprendre les déficits du système immunitaire menant à une sensibilité accrue aux infections, aux immuno-pathologies et au développement du cancer, il est essentiel d'étudier les mécanismes de contrôle. Cette recherche fondamentale a d'ores-et-déjà permis de développer des thérapies innovantes.

Nous étudions les mécanismes qui contrôlent la génération des lymphocytes T dans le thymus, un organe qui se trouve à proximité du cœur. Il s'agit surtout d'élucider le développement des lymphocytes T dits « régulateurs » qui nous protègent contre des pathologies auto-immunes et inflammatoires. Cette recherche devrait nous mener à une meilleure compréhension des origines de ces pathologies et permettra ainsi le développement de thérapies innovantes et potentiellement curatives.

Nous étudions les mécanismes qui contrôlent le système immunitaire suite à la transplantation d'organes et avons d'ores-et-déjà développé une approche expérimentale, basée sur les lymphocytes T régulateurs, qui permet, chez la souris, de définitivement prévenir le rejet des greffes sans utilisation de médicaments immunosuppresseurs.

Nous cherchons à comprendre comment les lymphocytes T acquièrent et maintiennent leurs fonctions spécialisées leur permettant de lutter efficacement contre les différents types d'agression que nous pouvons subir. Cette recherche permettra d'identifier de nouvelles molécules sur lesquelles agir dans de nombreuses pathologies.

Dès que possible nous remplaçons l'expérimentation sur la souris en ayant recours à des approches d'étude in vitro. Ces expériences nous permettent de bien cibler et ainsi de raffiner nos analyses in vivo, essentielles pour étudier la pertinence physiologique de nos résultats. Cette approche combinée permet de réduire de façon importante le nombre d'animaux utilisés dans nos nombreux projets de recherche, qui se limitera ainsi à 5112 souris sur cinq ans. Dans toutes nos expériences, nous suivons très fréquemment l'état de santé de nos souris par observation de leur comportement. En cas de signes externes de souffrance (cachexie, prostration, hypothermie, poils hérissés) persistants plus de 24h les animaux sont euthanasiés. Nous déterminons également fréquemment le poids de nos souris qui seront euthanasiées quand elles auront perdu plus que 20% de leur poids au début de l'expérience. Dans nos expériences sur les pathologies immunitaires, nous déterminons des indicateurs de la maladie dans l'urine, le sang, ou encore d'autres et euthanasions nos animaux quand certaines limites ont été atteintes. La grande expérience de notre laboratoire dans ce domaine, documenté dans la meilleure littérature scientifique internationale, nous permet de limiter ainsi la souffrance de nos souris au strict minimum et de l'éviter si possible.

L'ensemble des projets de notre équipe, impliquant de l'expérimentation in vitro, des modèles animaux ainsi que des échantillons issus de patients, permettra de mieux comprendre le contrôle des réponses immunitaires et ainsi de développer de nouvelles thérapies contre des pathologies très sévères chez l'homme.

3320. Le taux de fer dans le sang chez l'homme est régulé par une hormone, l'hepcidine, synthétisée par le foie. Plus l'expression de l'hepcidine est basse plus il y a de fer dans le sang. Ce fer sanguin est transporté par une protéine appelée transferrine dont on peut mesurer la saturation par le fer en fonction du rapport entre la quantité de fer et de transferrine. Plus il y a de fer dans le sang plus la saturation de la transferrine est élevée. Chez les patients atteints d'hémochromatose génétique le taux d'hepcidine est anormalement bas entraînant un excès de fer dans le sang, et donc une élévation de la saturation de la transferrine. Ce fer trop abondant va se stocker dans l'organisme, notamment dans le foie, et peut entraîner l'apparition de complications graves et/ou invalidantes.

Un objectif important est d'augmenter l'expression de l'hepcidine, anormalement basse chez ces patients, afin de réduire leur taux de fer dans le sang et donc la saturation de la transferrine, limitant ainsi le stockage du fer dans le foie. Nos résultats expérimentaux sur des souris normales ont montré que l'acide valproïque est une molécule capable d'augmenter l'expression de l'hepcidine et de réduire la saturation de la transferrine sanguine. Nous disposons de souris mimant les hémochromatoses génétiques observées chez l'homme (obtenues par mutation du gène HFE). Elles développent une surcharge en fer dans le foie.

L'objectif de la présente étude sera de leur administrer l'acide valproïque, et d'évaluer son effet pour limiter, voir même empêcher, l'apparition d'une surcharge en fer. L'acide valproïque, ou un soluté contrôle, seront administrés par voie orale deux fois par semaine à des souris âgées de 10 semaines qui auront établi une surcharge en fer dans le foie, afin de déterminer s'il est possible de la réduire. De même, l'acide valproïque, ou un soluté contrôle, seront administrés par voie orale deux fois par semaine à des souris âgées de 3 semaines, qui n'auront pas encore développé une surcharge en fer, afin de déterminer s'il est possible de prévenir son apparition.

Ce protocole est prévu pour répondre à la règle des 3R. Réduire le nombre d'animaux à un nombre minimal, permettant des études statistiques fiables, calculé ici à 17 souris contrôles et 17 souris traitées par expérience. Le nombre total d'animaux est de 68. Pour le Raffinement, le protocole ne devrait pas entraîner de douleur significative. Des points limites sont toutefois définis et seront observés en cas d'évènement inattendu. Les animaux seront anesthésiés avant le prélèvement.

Remplacer, l'étude fait suite à une expérimentation in vitro mais la saturation de la transferrine ne peut se doser que dans le sang. Une étude précédente a permis de déterminer la dose, la voie, et un rythme d'administration minimale dû à la rémanence de l'effet biologique de la molécule. Le passage à un modèle pathologique intégré est nécessaire pour avoir une

appréciation réelle de l'efficacité de l'acide valproïque dans des conditions d'utilisation réelles. Cette étude permettra de plus de disposer des paramètres de tolérance.

3321. Un des problèmes majeurs de santé publique, derrière le cancer, est l'ensemble des maladies liées à l'âge. Depuis les années 60 l'espérance de vie a augmenté de plus de 20 ans ; Les maladies progressent en nombre et en sévérité avec l'âge, impactant sur l'autonomie des patients, avec en chef de file la maladie d'Alzheimer (AD). Les principaux symptômes incluent la démence et perte de mémoire, et dans la plupart des cas des signes précoces comme des difficultés à résoudre des problèmes simples et tâches familières, avec des changements d'humeurs et de personnalités (anxiété, stress...). Les formes précoces d'AD sont souvent associées à des mutations du gène App, ou de gènes impliquées dans la maturation de cette protéine. Néanmoins dans le cas de la trisomie 21, qui conduit dans 50% des cas à une AD, aucune de ces mutations n'a été observée. Des formes tardives d'AD (Late Onset AD) existent également et ne dépendent pas des mutations App, ni des autres gènes de maturation Psen1, Psen2. Ces formes tardives « LOAD » ont été associées avec d'autres gènes par des études génétiques chez l'homme.

Nous proposons dans ce projet 2 axes : d'une part étudier 3 des gènes candidats pour ces LOAD que sont Amphiphysin 1 (Bin1), Clusterin (Clu), Complement receptor 1 (Cr1). Nous avons créé à l'ICS 3 lignées transgéniques associées à ces 3 gènes. BIN1 et CLU sont des protéines connues pour leur rôle dans la migration des neurones et leur capacité à reconnaître et suivre les gradients de molécules chimiques d'orientation ; mais aussi dans la communication entre les neurones, afin que les messages nerveux soient transmis efficacement. CR1 est naturellement associé aux pathologies de l'inflammation. Au niveau neuronal, l'inflammation des neurones va accélérer le dépôt des plaques amyloïdes. Des anomalies dans la production de ces protéines entraînent précocement le développement des symptômes d'Alzheimer tardif.

Le second axe va se focaliser sur l'étude de gènes associés à la trisomie 21 dans le développement d'Alzheimer, grâce à des lignées de souris déjà existantes (Cbs, Dyrk1a) ou nouvellement créées (transgénique Abcg1)

L'étude de ces 6 modèles sera poursuivie par l'élaboration de nouveaux groupes d'animaux combinant la modification des gènes d'intérêt avec des modèles existants développant un Alzheimer précoce. La totalité de ces expériences nécessiteront l'utilisation de 1920 animaux ; de plus l'ensemble des tests comportementaux ne présentent pas de souffrance sévère pour l'animal. Ces travaux pourraient permettre de mieux comprendre la physiopathologie de l'AD, de prévenir le développement pathologique, en diagnostiquant de manière préventive, les allèles chez les personnes porteuses ; Ces derniers pourraient bénéficier de suivis cliniques adaptés et de traitements précoces pour ralentir le plus longtemps possibles l'apparition des premiers symptômes.

3322. La cachexie cancéreuse correspondant à un état d'amaigrissement et une perte de masse musculaire qui contribue significativement à la morbidité et mortalité dans la pathologie cancéreuse. Les origines peuvent être multiples comme la sécrétion de molécules par la tumeur elle-même, l'anorexie, ou encore le traitement de chimiothérapie. Plusieurs études ont montré que le traitement en lui-même pouvait induire une perte de masse musculaire et entraîner une fatigue, mais la connaissance des mécanismes n'est pas encore très claire. L'implication de molécules inflammatoires tel que les cytokines ou encore les glucocorticoïdes apparaît comme évident dans d'autres pathologies à fond inflammatoire comme le sepsis. Nous voulons ici caractériser les effets de quatre traitements de chimiothérapies, actuellement utilisés dans la lutte contre les cancers gastriques, et regarder leurs effets sur la perte de masse et fonction musculaire. De plus l'effet d'un myorelaxant (Dantrolène) sera utilisé pour voir s'il peut avoir un effet préventif et protecteur sur le muscle. En effet, cet inhibiteur de canaux calciques s'est montré très efficace pour ses propriétés anti-inflammatoires dans le modèle d'inflammation systémique septique, en contrant les troubles de concentrations calciques dans le muscle induit par l'inflammation. Quatre groupes seront donc réalisés : les contrôles (n=20), les témoins négatifs recevant le dantrolène (n=20), le groupe recevant le traitement de chimiothérapie (n=20), et celui avec le traitement de chimiothérapie et dantrolène (n=20), soit au total 80 rats.

Nous travaillons dans le souci de la règle est 3R.

Réduction : ce nombre a été calculé de façon à permettre une validation statistique des résultats expérimentaux, tout en tenant compte des exigences de réduction.

Remplacement : l'utilisation d'un modèle animal est inévitable car nous travaillons sur des mécanismes intégratifs et donc sur l'organisme en entier.

Raffinement : tout au long du protocole les conditions de stabulation seront réalisées dans un souci de bien-être de l'animal. Toutes les procédures expérimentales sont réalisées par des personnes formées et habituées à travailler avec des animaux de laboratoires. De plus, les prélèvements de tissus et sang seront maximisés lors du sacrifice.

L'intérêt de ce projet est de chercher des thérapeutiques visant à améliorer le traitement des patients atteints de cancer.

3323. Actuellement, un produit est couramment utilisé pour traiter les problèmes osseux chez les chevaux. Ce produit est administré par voie intraveineuse et peut parfois lors de son administration entraîner des problèmes digestifs (coliques) à résolution spontanée. L'objectif de cet essai est d'étudier si ce produit administré par voie intramusculaire, à la même dose que celle faite en intraveineuse, serait bien toléré localement (par dosage dans le sang d'un marqueur de tolérance, à savoir la créatine kinase) et au niveau digestif par les chevaux et si son activité serait la même (par étude des concentrations sanguines du produit au cours du temps, on parle alors de bioéquivalence). Un produit concurrent est actuellement utilisé par voie intramusculaire chez le cheval, pour la même affection, et ce projet viserait à comparer la tolérance locale du produit de référence avec celle de ce produit.

Si la bioéquivalence et une bonne tolérance locale étaient démontrées, il serait envisagé d'étendre l'AMM du produit testé à la voie intramusculaire, ce qui rendrait l'administration du produit plus facile.

Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque cheval recevra successivement une administration de chacun des trois traitements, à savoir une toutes les 4 semaines.

L'idée est d'étudier ce traitement sur l'espèce concernée, le cheval, en utilisant le nombre minimal de chevaux permettant d'avoir une puissance statistique suffisante pour étudier les résultats obtenus. Cet essai doit se dérouler sur 12 chevaux régulièrement utilisés dans un centre équestre pour éventuellement identifier une gêne qui résulterait des injections intramusculaires afin le cas échéant de le signaler dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP). De plus, afin de s'assurer du bon état de santé des chevaux, tous les chevaux participant à l'étude seront observés matin et soir afin de détecter un éventuel trouble, même les jours où ils n'auront pas eu d'administration et seront pesés régulièrement. Compte tenu de la nature de l'essai, les chevaux continueront sans interruption leurs activités sportives au cours et après l'essai. Cet essai se fera en conformité avec les lignes directrices européennes sur l'espèce cible.

3324. Le virus de la diarrhée épidémique porcine (DEP) provoque d'importantes diarrhées, des vomissements et des déshydratations chez les porcs atteints. Ce virus (vDEP) s'est propagé depuis les années 1970 et est resté endémique dans certains pays européens. En 2013, une épizootie (épidémie frappant les animaux) très sévère de DEP est apparue aux Etats-Unis provoquant la perte de 7 millions de porcelets en moins d'un an. Elle est toujours d'actualité et sa rapidité de propagation motive une vigilance accrue à l'égard de cette maladie en Europe. Les cas de DEP aux Etats-Unis ont permis d'isoler deux types de souches: des souches dites INDEL et des souches dites non INDEL qualifiées de plus virulentes. Malgré les études réalisées sur ce virus, des incertitudes sur la pathogénicité de ces différentes souches ainsi que sur les conséquences de leur introduction dans les élevages porcins européens et plus particulièrement français subsistent. Ce projet sur l'étude comparative de souches INDEL et non INDEL de vDEP vis-à-vis de la transmission et de l'immunité induite notamment digestive lors de l'infection vise à amener une meilleure compréhension de la différence de pathogénicité entre ces souches. Le porc étant l'espèce cible et aucune méthode alternative n'étant disponible, ce projet nécessite le recours à l'expérimentation animale. Deux procédures expérimentales seront réalisées sur 86 porcs âgés de 4 semaines: une première pour comparer les caractéristiques de transmission des souches INDEL et non INDEL et une deuxième pour étudier la réponse immunitaire comparée au niveau digestif. Le nombre d'animaux utilisés est le plus faible possible tout en permettant l'obtention de résultats statistiquement robustes. Des points limites seront précisément définis pour que les animaux soient euthanasiés avant que la souffrance ait atteint un seuil non acceptable, les porcs seront surveillés quotidiennement pour intervenir au plus vite si les points limites sont atteints.

3325. Les anticorps sont des molécules qui ont la propriété de se "mouler" sur leur cible. Ils peuvent être générés par des processus de vaccination. En effet, ils sont sécrétés par des cellules du système immunitaire qui peuvent être isolées, immortalisées, et clonées. Les anticorps monoclonaux sont alors utilisés comme médicament à "action ciblante", ou en recherche pour "détecter" le produit étudié ; dans des domaines très variés allant de l'agronomie à la santé humaine.

L'expérimentation animale présentée dans ce projet est effectuée dans le cadre de la recherche et le développement d'anticorps monoclonaux utilisés dans le domaine du diagnostic immuno-hématologique, et / ou cancérologique. Pour certains antigènes, il n'est pas possible de travailler avec des prélèvements humains pour générer des anticorps monoclonaux. Dans ces cas, seul l'immunisation d'animaux, généralement la souris, permet d'obtenir ces outils précieux. C'est notamment le cas pour les antigènes des systèmes Cartwright (YT) ou Dombrock (DO) pour citer les plus connus.

Pour ce projet réalisable sur 5 ans, le nombre maximal d'animaux prévu est de 300 souris balb/c. Le règle des 3R sera respectée au mieux : Remplacer : Il n'existe pas de méthodes alternatives pour la génération d'anticorps monoclonaux de haute affinité et/ou de haute spécificité. De plus, l'obtention de lignées cellulaires a pour but d'éviter l'immunisation d'un grand nombre d'animaux pour produire des sérums. Réduire : Pour chaque antigène, une à deux procédures pourra être engagée, avec au maximum deux lots de souris par type d'immunogène. Chaque lot sera constitué de 5 animaux au maximum.

Raffiner : L'état de santé des animaux est contrôlé après chaque injection par le suivi des poids pendant quelques jours. En cas de souffrance modérée, l'injection de morphine est prévue dans les protocoles. Enfin, pour chaque projet d'immunisation, les conditions d'immunisation et les réponses observées sont consignées dans un fichier. Une analyse rétrospective des expériences réalisées sera effectuée dans le but de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour chaque type d'immunisation et / ou type d'antigène.

3326. Le but de ce projet est de créer et/ou de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines. Notre travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles. Pour comprendre le rôle physiologique des gènes impliqués, et comment les mutations sont responsables de ces pathologies, nous avons dans un premier temps utilisé des modèles cellulaires. Nous planifions maintenant d'utiliser des souris pour comprendre à la fois la physiologie et la pathophysiologie in vivo. Dans le but de mieux comprendre les fonctions des protéines impliquées dans ces pathologies et leurs interactions, dans le muscle sain et pendant le développement des pathologies, nous prévoyons d'utiliser 14 modèles murins pour les myopathies congénitales.

Les souris sont requises pour ces expériences pour nous permettre de comprendre les propriétés physiologiques des différents muscles après modification génétique. Les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines chez les souris, et de mieux comprendre la pathophysiologie des maladies musculaires. Les souris seront analysées in vivo / in situ / in vitro et les tissus seront prélevés pour des expériences in vitro ultérieures

(REPLACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum une PE/jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 15 souris / groupe sera utilisé pour s'assurer que l'étude soit statistiquement et scientifiquement valable. Afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, les souris seront surveillées quotidiennement pour éviter toute souffrance. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront euthanasiés prématurément si nécessaire)(RAFFINEMENT).

Un maximum de 5400 souris sera utilisé (360 souris / lignée, 14 lignées).

3327. Le marché mondial des adjuvants de vaccins est en progression depuis de nombreuses années. En effet, si leur intérêt a été démontré depuis plusieurs décennies, une meilleure efficacité et une meilleure tolérance sont sans cesse recherchées. Avant d'être commercialisés, les adjuvants doivent être évalués sur le plan immunitaire. L'expérimentation sur souris est la première étape et constitue un modèle incontournable pour le criblage de nouveaux produits. Ce modèle est également pertinent car beaucoup de kits et de réactifs sont développés en immunologie, ce qui facilite grandement les investigations.

L'évaluation de l'immunité des adjuvants repose sur l'utilisation d'un vaccin contenant un antigène neutre : l'ovalbumine. L'innocuité sera appréciée par l'observation des réactions locales (dépôts, granulomes, nécroses) au site d'injection. Lorsque ces dernières seront trop importantes, les animaux concernés seront directement euthanasiés. Le cobaye sera également utilisé sur vaccin placebo afin d'observer de manière plus précise via des coupes de muscles, l'innocuité des formulations pour des adjuvants proches d'être commercialisés. L'évaluation de l'efficacité du vaccin, sera réalisée par un suivi sérologique des anticorps et par l'identification après euthanasie des souris, des acteurs cellulaires et humoraux issus d'organes lymphoïdes (rate, ganglions...). L'analyse de ces paramètres sont confrontées à 2 lots témoins : Antigène seul et adjuvant de référence.

L'adjuvant de référence est un gold standard dont on connaît l'innocuité et l'efficacité. Il a 2 intérêts majeurs :

- son profil d'innocuité est bien définie et il est très bien toléré et n'engendre pas de réaction locale importante de type nécrose. Il permet ainsi de définir le niveau de sensibilité des souris face à l'injection. Des dérives sur le plan de l'innocuité, sur un lot de souris OF1, ont déjà été observées dans le passé après injection avec cet adjuvant de référence, par l'observation de réactions locales inhabituelles. Dans ce cadre, il nous sert de témoin contrôle vis à vis des formulations testées.

- au niveau de l'efficacité, cet adjuvant génère de forts titres anticorps IgG1 et IgG2a anti-OVA chez la souris. Au même titre que l'innocuité, ceci nous permet d'identifier les écarts sur des lots de souris mais surtout de positionner les nouvelles formules testées au regard des performances de cet adjuvant de référence.

La règle des 3 R sera appliquée :

- Remplacement : Au sein de ce projet, l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales est nécessaire. Il n'existe en effet pas d'alternative suffisamment prédictive, dans la mesure où le système immunitaire est complexe et fait intervenir de nombreux organes et acteurs cellulaires et/ou humoraux. Les modèles in vitro existants ne permettent pas d'apporter une vision globale de la réponse immunitaire induite.

- Réduction : Le nombre d'animaux sera réduit au maximum mais il doit être cependant suffisant afin d'avoir une bonne représentabilité pour l'exploitation des données générées. Les groupes seront constitués de 5 souris

- Raffinement : Les vaccinations sont indolores et réalisées avec des aiguilles stériles très fines. Le site d'injection est systématiquement désinfecté à l'alcool avant la pique. Les prélèvements sanguins au sinus rétro orbitaire est la méthode la moins invasive permettant la collecte de volume de sang suffisant. Les prises de sang sont suffisamment bien espacées dans le temps afin de ne pas trop manipuler les animaux et obtenir une cinétique d'anticorps spécifiques à court, moyen et long termes. Dans le cas où des réactions locales excessives et inacceptables apparaîtraient après vaccination, les animaux seront euthanasiés par CO2.

Sur les 5 années, un maximum de 2750 souris et 30 cobayes sera utilisé dans ce projet.

3328. La trisomie 21 ou Syndrome de Down s'accompagne de déficit cognitif avec des patients présentant un QI proche de 50. Plusieurs études menées avec des modèles de souris mimant le Syndrome de Down ont permis de conclure que les performances cognitives réduites sont dues en partie à des dysfonctionnements de la mémoire explicite, avec notamment une augmentation de l'activité inhibitrice. Cette activité inhibitrice est dû à un neurotransmetteur (c.à.d. composés chimiques libérés par les neurones et agissant sur d'autres neurones) appelé acide gamma-aminobutyrique (GABA). Celui-ci se fixe sur des récepteurs spécifiques appelés récepteurs GABA et composés de plusieurs sous-unités. Cette fixation entraîne une diminution de l'activité nerveuse des neurones et intervient dans de nombreux processus physiologiques comme la mémorisation. Pour contrer l'augmentation de cette activité inhibitrice mise en évidence dans ces modèles murins de trisomie 21, nous nous proposons de jouer sur la quantité d'une sous-unité des récepteurs GABA par l'extinction d'une copie du gène de la sous-unité Alpha5. Ainsi, en diminuant l'expression de ce gène, nous comptons diminuer le nombre de récepteurs fonctionnels et ainsi diminuer l'activité inhibitrice exacerbée chez la souris trisomique, et ainsi diminuer les déficits mnésiques. Ces travaux auront le double but de préciser le rôle de la sous-unité Alpha5 des récepteurs Gaba dans les processus mnésiques (dans un contexte normal et pathologique) et de confirmer le potentiel de cette voie de signalisation comme cible thérapeutique pour le Syndrome de Down. Cette étude nécessite des analyses comportementales évaluant la mémoire et qui ne peuvent se faire que sur un organisme vivant. Nous allons donc évaluer la mémoire chez la souris en utilisant des tests spécifiques sous 4 conditions différentes qui sont : un contexte normal (contrôle), un contexte trisomique (contrôle de présence de déficit), un contexte normal avec l'extinction du gène (rôle de la sous-unité dans la mémorisation), un contexte pathologique avec l'extinction du gène. Ces tests mnésiques ont déjà montré dans ce modèle du Syndrome de Down un déficit marqué. Nous étudierons donc le résultat obtenu avec ces mêmes tests avec une cohorte de 60 animaux. Afin de

minimiser le nombre de souris utilisées, plusieurs tests seront réalisés avec les mêmes animaux. La cohorte se décompose comme suit : 15 animaux sans modification génétique (contrôle), 15 animaux trisomiques (confirmation du phénotype), 15 animaux avec extinction d'une copie du gène de la sous unité alpha 5 du récepteur gaba (rôle de cette sous unité dans les processus mnésique) et 15 animaux trisomiques avec extinction d'une copie du gène de la sous unité alpha 5 du récepteur gaba (rôle de cette sous unité dans les déficits mnésiques dû au contexte de la trisomie). Le test statistique utilisé sera un test ANOVA avec tukey test en post hoc. Notre expérience nous permet d'évaluer à 15 animaux par groupe pour avoir un résultat significatif. De plus, L'ensemble des tests comportementaux n'entraîne pas de stress ou souffrance sévère pour l'animal. Le suivi du bien-être animal est primordial pour le bon déroulement des analyses comportementales. Ainsi, tout au long du projet, les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur santé à tout temps. A notre connaissance, cette expérience n'a jamais été réalisée.

3329. La chirurgie de la cataracte est l'acte chirurgical le plus fréquent en France et l'endophtalmie aigue post opératoire constitue la complication la plus redoutée après cette chirurgie. L'endophtalmie aigue peut aboutir à la perte fonctionnelle voire anatomique de l'œil. Le traitement repose actuellement sur l'association d'une antibiothérapie probabiliste par voie intra-vitréenne. Avant de débiter le traitement, un prélèvement oculaire (humeur aqueuse ou vitré) est réalisé et envoyé en analyse microbiologique. L'identification du germe par les techniques classiques (culture, PCR) peut prendre plusieurs jours et les prélèvements peuvent être négatifs. La culture reste la meilleure technique pour identifier le germe responsable mais elle nécessite du temps. L'identification rapide du germe incriminé permettrait d'adapter rapidement l'antibiothérapie et d'améliorer la prise en charge des patients atteints d'endophtalmie aigue (antibiothérapie ciblée sur le germe incriminé, diminution du risque de résistance).

L'objectif de ce projet est de mettre au point un test de détection rapide de germe dans un prélèvement de vitré par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et d'un analyseur de temps de vol (TOF, Time of Flight mass spectrometry). Afin de valider ce test de détection rapide et avant utilisation chez l'homme, un modèle animal est nécessaire car il n'existe pas de méthode alternative.

Nous utiliserons un modèle lapin qui sera inoculé, après anesthésie, par du *Staphylococcus aureus* en injection intra-vitréenne (œil droit). Afin de réduire le nombre d'animaux, une injection de sérum physiologique sera réalisée dans l'œil gauche de chaque lapin afin de servir de contrôle.

L'identification de germe sera réalisée par Maldi-Tof à partir du vitré des animaux dès l'apparition de signe d'endophtalmie. Ce projet nécessitera un total de 10 animaux. L'expérimentation sera faite en animalerie confinée A3 ou les animaux disposeront de nourriture et d'eau à volonté. Le milieu sera enrichi par une plateforme et des cubes de bois à grignoter.

3330. L'hémophilie est une maladie monogénique liée à l'X dont l'origine est un déficit en facteur VIII (hémophilie A) ou en facteur IX (hémophilie B) de coagulation. L'hémophilie se traduit donc par un déficit de la coagulation sanguine en réponse à une hémorragie. Les hémophiles de type A ou B non traités présentent des symptômes tels que des saignements excessifs en cas de blessure et parfois même des hémorragies spontanées qui peuvent être fatales si non traitées.

L'activité biologique des facteurs VIII ou IX s'évalue en pourcentage de la normale. L'individu normal étant considéré comme ayant 100% d'activité. Si l'activité est indétectable (inférieure à 1%), il s'agit d'une hémophilie sévère, si l'activité est comprise entre 1 et 5%, l'hémophilie est dite modérée; au-delà et jusqu'à 30% l'hémophilie est mineure.

L'intervention au niveau de l'activité biologique de ces facteurs peut avoir un bénéfice substantiel pour les patients avec hémophilie sévère.

Le traitement que nous souhaitons développer pour l'hémophilie B est basé sur l'utilisation de vecteurs lentiviraux qui, suite à une injection systémique, sont capables de cibler les hépatocytes et permettre la sécrétion de facteur IX dans le flux sanguin à des niveaux thérapeutiques.

Des études précédentes ont montré l'efficacité d'une telle stratégie dans des modèles murins et canins pour l'hémophilie B, ce qui permet d'envisager ce type de thérapie génique chez le primate non humain et en finalité chez le patient humain.

Nous utiliserons des vecteurs lentiviraux exprimant le transgène cDNA pour le facteur IX humain (hFIX). Deux types de vecteurs seront utilisés : lentivirus présentant des niveaux normaux de marqueurs de surface CD47 (LV) et lentivirus présentant des niveaux élevés de ces marqueurs CD47 à la surface de leur enveloppe (LV-CD47).

Des études précédentes chez le chien ont montré qu'une injection de lentivirus induit une inflammation transitoire qui peut être contrôlée avec des corticostéroïdes et des anti-inflammatoires. Néanmoins une telle réaction est indésirable et nous pensons que cela est dû à une transduction des cellules immunes par les vecteurs pseudotypés avec VSV-G (glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculeuse). Pour cette raison nous allons comparer ici un vecteur lentiviral VSV-G classique (LV) avec un vecteur lentiviral exprimant un niveau important de CD47 en surface (LV-CD47).

Le design expérimental de cette étude pilote inclus 7 macaques *nemestrina* et 2 macaques *fascicularis*.

L'objectif principal est d'évaluer la toxicité et l'efficacité des particules LV versus LV-CD47.

Les animaux recevront une administration par voie intraveineuse lente des vecteurs, selon les groupes suivants:

- groupe 1 contrôle : 1 animal recevra l'excipient du produit à l'essai (formulation de vecteurs)
- groupe 2 : 3 *nemestrina* et 1 *fascicularis* recevront le vecteur LV-hFIX
- groupe 3 : 3 *nemestrina* et 1 *fascicularis* recevront le vecteur LV-CD47-hFIX

Préalablement à l'injection des 7 primates nemestrina, nous souhaitons tester le protocole d'anti-inflammatoire ainsi que la solution de formulation des vecteurs chez 2 macaques fascicularis. Ce qui nous permettra d'en évaluer la tolérance, valider les procédures, voire d'en améliorer les techniques opératoires, avant son utilisation chez le macaque nemestrina.

Le choix des macaques pour cette étude s'est porté sur les macaques nemestrina car ceux-ci ne sont pas réfractaires à une transduction cellulaire par les lentivirus, alors qu'actuellement aucune donnée ne permet de dire s'il y a transduction par les lentiviraux après injection IV chez les fascicularis. Les 2 macaques fascicularis recevront donc aussi les lentiviraux afin de voir s'ils sont substituables aux macaques nemestrina pour les études futures.

Nous pensons que 3 animaux (3 Nemestrina, 1 fascicularis) seront suffisants pour évaluer la toxicité aiguë après administration du lentivirus (analyses sanguines et immunologiques).

Si un ou plusieurs animaux développent une toxicité suite à l'administration du vecteur LV, mais non suite à l'administration du LV-CD47, les études suivantes seront conduites avec le vecteur LV-CD47.

L'expression du facteur IX sera monitorée chez tous les animaux, mais aucun test statistique ne sera réalisé compte tenu du faible nombre d'animaux.

Néanmoins, si les taux de facteur IX ont tendance à être plus élevés dans un groupe comparé à un autre, ces informations seront pris en compte ainsi que les résultats de toxicité afin de poursuivre les études translationnelles et le développement clinique.

L'administration expérimentale par injection intraveineuse lente se déroulera sous anesthésie générale (anesthésie fixe avec relai gazeux). Afin de limiter toute réaction d'hypersensibilité, un traitement anti inflammatoire (association d'un corticoïde et de deux antihistaminiques) sera administré par voie intraveineuse préalablement à l'administration expérimentale.

Cet acte étant très peu douloureux, aucun protocole analgésique ne sera mis en place d'emblée pour cette procédure. Par contre, étant donné la longueur de l'anesthésie, une attention toute particulière sera apportée à la surveillance du maintien d'une température corporelle satisfaisante pour l'animal. Un système de réchauffement à air pulsé sera mis en place.

Les prélèvements sanguins, réalisés au cours de l'étude, seront réalisés sous protocole anesthésique permettant d'obtenir une anesthésie de courte durée (environ 10 min.).

Les macaques seront en outre hébergés par groupes de 2 ou 3 dans la mesure du possible (hors période de suivi post opératoire par exemple) afin de favoriser leurs échanges sociaux et favoriser leur bien être.

L'état général et l'alimentation des animaux seront surveillés quotidiennement par les techniciens animaliers et le vétérinaire du Centre. Le centre dispose également d'un programme d'enrichissement pour les macaques, qui sont toujours hébergés au moins par deux quand cela est possible. Le programme d'enrichissement regroupe un certain nombre d'activités (qui sont suivies via un cahier d'enrichissement) :

- distribution de fruits frais et secs cachés dans la litière ou déposés en hauteur
- visionnage de films
- mise à disposition de jouets
- aménagement de l'habitat (miroirs et de chaînes traversantes pour favoriser les déplacements verticaux).

3331. Ce projet fait appel à différentes procédures expérimentales à visée éducative et à différents modèles animaux (article R 214-89). La formation des étudiants (de Licence à Master 2) en Biologie et plus particulièrement en physiologie animale nécessite que ceux-ci acquièrent un minimum d'expérience dans le domaine de la manipulation des animaux vivants et la réalisation d'expérimentations courantes qu'ils seront amenés à reproduire ultérieurement dans leur carrière (techniciens, ingénieurs ou chercheurs). Ils doivent ainsi apprendre à anesthésier correctement des animaux, injecter des substances pharmacologiques ou encore recueillir des paramètres physiologiques. Différentes séances de Travaux Pratiques (TP) sur animaux vivants (rats, turbots et truites arc en ciel), anesthésiés et analgésiés, sont réalisées afin d'étudier les variations de plusieurs paramètres physiologiques dont le rythme cardiaque, la pression artérielle.... elles relèvent de procédures sans réveil (Art 214-122). Nous travaillons dans le souci de la règle des 3 R. Une attention particulière est portée afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, de raffiner l'environnement et remplacer les animaux autant que possible en travaillant avec des interfaces et logiciels qui permettent d'étudier les grandes fonctions physiologiques sans être invasives chez l'homme (règles des 3 R, article R214-105). Par année, 20 turbots, 60 truites arc en ciel et 20 rats sont commandés respectivement en TP de L3 et M1, soit un total sur les 5 années du projet de 100 turbots, 300 truites arc en ciel et 100 rats.

3332. Le diagnostic précis et précoce des tumeurs, ainsi que le développement de thérapies ciblées sont deux axes majeurs de développement en cancérologie. Dans ce contexte, les nanoparticules sont apparues comme des candidats prometteurs au cours des deux dernières décennies. En effet, les nanoparticules présentent de nombreuses propriétés qui améliorent à la fois leur détection par différentes techniques d'imagerie et permettent leur utilisation en thérapie après activation par des stimuli externes.

Dans ce cadre, nous développons des nanoparticules à base d'or et/ou d'oxyde de fer. Les premières études réalisées sur ces particules montrent qu'elles ne présentent pas de toxicité, qu'elles sont détectables par différentes techniques d'imagerie et qu'elles s'accumulent dans les tumeurs de manière passive.

Nous voulons maintenant étudier leur propriétés thérapeutiques pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie et/ou de l'hyperthermie. Cette étude préclinique est nécessaire avant de pouvoir réaliser des essais cliniques chez l'homme.

Dans ce cadre, la souris nude immunodéficiente constitue un modèle simple à mettre en œuvre pour le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les souris sont hébergées dans un environnement contrôlé dépourvu de germes pathogènes qui permet qu'elles ne souffrent pas de leur défaut d'immunité. Les souris sont surveillées quotidiennement, ce qui permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Dans ce projet, nous travaillerons sur un modèle sous-cutané de mélanome, et nous utiliserons 280 souris.

En effet d'après notre expérience, pour les études d'évaluation d'un effet thérapeutique, 10 souris par conditions sont nécessaires à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

3333. L'épilepsie ne peut se résumer à une activation hyper-synchrone de neurones dont le fonctionnement est altéré, se traduisant sur l'électrocorticogramme (ECoG) de surface par des crises ou des pointes épileptiques intercritiques. Les mécanismes physiopathologiques complexes qui sous-tendent cette pathologie nécessitent une approche globale des interactions entre les systèmes neuronaux et vasculaires, les cellules gliales, et les modifications métaboliques. Le couplage neurovasculaire participe au fonctionnement cérébral physiologique et pathologique. Toutes augmentations, même transitoires, de l'activité des cellules gliales et des neurones, se traduit par une augmentation des besoins énergétiques. Pour répondre à cette augmentation des besoins énergétiques, il s'établit une augmentation du débit sanguin cérébral ainsi qu'une augmentation de la concentration en hémoglobine oxygénée [HbO] et une diminution de la concentration en hémoglobine désoxygénée [HbR]. Lors des crises épileptiques, ou des pointes épileptiques intercritiques outre l'activation hyper-synchrone d'une population plus ou moins étendue de neurones, il existe des modifications du métabolisme local. Il est ainsi décrit dans la littérature des modifications hémodynamiques préalables aux pointes épileptiques. Ceci ouvre le champ à de nombreuses questions sur les mécanismes à l'origine de ces pointes intercritiques. Cependant il est nécessaire d'évaluer si les modifications hémodynamiques décrites dépendent du type de pointe et des mécanismes physiopathologiques qui leurs sont liés. Dans ce projet nous souhaitons modéliser les interactions entre les différents compartiments (neuronal, glial, vasculaire) qui participent à l'unité neurovasculaire. L'évaluation de l'impact des pointes épileptiques par une analyse multiéchelle permettant de prendre en considération la complexité des interactions entre les différents compartiments au-delà de la simple altération de la balance excitato-inhibitrice a une implication clinique évidente. Cette étude ne peut se faire que sur l'animal vivant et anesthésié. Nous utiliserons des rats mâles adultes Sprague-Dawley (300 – 350 g) hébergés dans l'animalerie centrale de l'établissement. Le bien-être des animaux (alimentaire, sanitaire et sociale) sera contrôlé par le personnel spécialisé pendant la période pré-expérimentale. Les rats seront hébergés en groupe de deux rats par cage. Les cages seront climatisées et enrichies (cachette/jeux). Les animaux auront un accès libre à la nourriture et à l'eau. Chaque animal sera pris en charge pour la gestion éventuelle de la souffrance et du stress. Durant la période expérimentale, chaque rat sera anesthésié par une injection intrapéritonéale d'uréthane qui sera éventuellement répétée tout au long du protocole chirurgical. Des capteurs d'électrocorticographie (ECoG) ainsi que des détecteurs et des émetteurs de lumière infra-rouge seront disposés à la surface du cortex. Des électrodes d'électrocardiographie (activité cardiaque) ainsi que des capteurs de respiration disposés sur la peau du rat permettront de monitorer les paramètres vitaux pendant toute la période expérimentale. L'enregistrement de l'ECoG permettra de monitorer l'activité cérébrale pour les besoins expérimentaux. Les expérimentations seront réalisées dans le noir pour permettre l'analyse des mesures de la spectroscopie dans le proche infrarouge. Chaque expérimentation consistera en l'enregistrement d'une période de référence des activités spontanées, ECoG et hémodynamiques locales. Les enregistrements seront poursuivis jusqu'à 180 min après application sur le cortex d'un agent pharmacologique. A la fin de chaque expérimentation, les rats seront euthanasiés par une administration intrapéritonéale d'une solution euthanasique et reconduit à l'animalerie pour se conformer aux procédures concernant les animaux sacrifiés. Pour tester six produits pharmacologiques dans deux modèles différents d'épilepsie nous utiliserons 264 rats. Cet effectif est suffisant pour la puissance des analyses statistiques.

Ce projet ambitionne de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu au cours des pointes épileptiques et notamment concernant les mécanismes du couplage neurovasculaire associé.

3334. Le traumatisme crânien est un problème majeur de santé publique fréquent, et potentiellement grave tant à court terme (risque vital) qu'à long terme (handicap). Malheureusement, il n'existe, à ce jour, toujours pas de traitement pour les patients. La recherche expérimentale étudie les mécanismes à l'origine des lésions de la substance blanche cérébrale, jusqu'ici largement sous-estimées, méconnues et potentiellement responsables de lourdes séquelles neurologiques observées même à distance du traumatisme crânien. Ainsi, l'espoir d'améliorer le pronostic de cette pathologie repose sur la découverte de cibles thérapeutiques pour les lésions de la substance blanche et les désordres neurocomportementaux conséquents. Pour cela, une description complète des mécanismes potentiellement impliqués dans l'apparition des lésions de la substance blanche est nécessaire et représente l'objectif de ce projet. Il sera étudié l'évolution dans le temps de l'apparition de l'inflammation, de la mort de cellules cérébrales, ainsi que les lésions de la substance blanche à l'aide d'un modèle expérimental de traumatisme crânien chez la souris, reproduisant la pathologie humaine. Les expériences seront réalisées chez 597 souris dont l'analgésie et l'anesthésie seront monitorées durant toute la durée de l'expérience. La bonne reproductibilité et le faible taux d'échec (10%) de ce modèle expérimental permet de limiter le nombre d'animaux par groupe. La mise en place d'un point limite ainsi que l'observation quotidienne du comportement des animaux permettront d'identifier toute souffrance et douleur. Ce modèle expérimental est extrêmement reproductible et n'entraîne qu'une très faible mortalité, ce qui en fait un modèle de sévérité modérée. Ces deux éléments permettent de limiter le nombre d'animaux par groupe. De plus, les animaux seront hébergés en groupes sociaux stables afin de limiter tout stress et modification de hiérarchie. Une partie des travaux de ce projet a déjà été

réalisée in vitro sur des cultures cellulaires. Cependant, les mécanismes impliqués dans les lésions de la substance blanche mettent en jeu plusieurs types cellulaires étroitement impliqués et situés dans différentes structures cérébrales qu'il est impossible de reproduire in vitro. Il est donc indispensable d'associer, aux études in vitro, des études chez l'animal entier soumis à un modèle de traumatisme crânien qui reproduit la pathologie humaine.

3335. Les maladies cardiovasculaires sont à l'origine de près de 150 000 décès chaque année en France. Les artères de résistance de petit calibre permettent une régulation fine des débits sanguins et une perfusion optimale des tissus. La dysfonction de ces artérols entraîne un défaut de perfusion des organes cibles (cœur, cerveau, reins). L'augmentation anormale (et inexpliquée) du tonus de ces artères ainsi que la diminution de leur capacité à se dilater contribue aux complications liées à l'hypertension, l'insuffisance cardiaque ou le diabète. Les artères de résistance sont sensibles aux stimuli locaux et aux forces mécaniques générées par le flux sanguin (cisaillement) et la pression (étirement). A long terme, ces contraintes mécaniques entraînent un remodelage structurel délétère des vaisseaux. La caractérisation des déterminants impliqués dans le contrôle de la réactivité et du remodelage micro vasculaire permettrait d'envisager de nouvelles thérapies pour lutter contre les pathologies vasculaires.

Les nucléotides extracellulaires sont des molécules libérées dans le système vasculaire en réponse à des stress mécaniques comme la pression ou le cisaillement ou encore par le manque d'oxygène ou l'inflammation.

Ces nucléotides activent localement des récepteurs (P2) dont l'activation entraîne la constriction des artères et également des effets à plus long terme sur la prolifération et la migration des cellules vasculaires.

Ce projet vise à mettre en évidence un rôle de facteur de danger joué par les nucléotides dans le contexte des pathologies vasculaires au premier plan desquelles l'hypertension. Pour cela nous utiliserons une lignée de souris transgéniques modifiées/invalidées pour une molécule impliquée dans la signalisation par les nucléotides (souche C57Bl6/J, souris transgéniques : CD39 KO). La souris est un bon modèle pour la maladie humaine, car l'organisation de son ADN et l'expression de ses gènes sont très similaires à celles de l'homme (95% du patrimoine génétique identique). L'absence ou la sélectivité relative des outils pharmacologiques disponibles pour étudier la signalisation par les nucléotides extracellulaires fait de ces animaux un outil d'étude approprié et puissant. Dans cette étude, les protocoles d'hypertension, d'infarctus du myocarde incluront 15 souris par groupe (8 par groupe pour le protocole de transfert adoptif de moelle osseuse). L'ensemble de ces investigations représente un total de 290 souris. Le nombre de souris choisit est réduit au minimum (ce nombre est choisi de manière à obtenir des données exploitables en tenant compte de la dispersion des résultats). Cette étude se fera dans le respect de la règle des 3 R de manière à assurer autant que possible une Réduction des animaux utilisés le Raffinement des techniques opératoires d'analgésie et d'euthanasie ainsi que le Remplacement le cas échéant par des techniques in vitro.

3336. Le brassage génétique est un mécanisme clé pour la survie et l'évolution des populations animales. Il est assuré par les migrations d'individus entre populations lors des phases de dispersion des juvéniles ou les déplacements de reproduction des adultes. Ces déplacements ne doivent donc pas être contrecarrés par les infrastructures linéaires de transport (autoroutes, canaux de navigation, réseau ferré à grande vitesse) ou par la nature anthropique du territoire (urbanisation, paysage issu de culture intensive). Enjeu environnemental majeur, cette problématique est aujourd'hui prise en compte au plan national par la mise en place de la Trame Verte et Bleue (TVB), déclinée en régions par les Schémas Régionaux de Cohérence Ecologique (SRCE). Ces politiques visent à assurer le maintien ou la restauration de la connectivité du paysage.

Le présent projet s'inscrit dans cette problématique et fait suite à une première étude (2012-2015) qui a montré l'impact de certaines barrières sur le flux génétique de différentes espèces de mammifères sauvages, notamment chez la Martre des pins (*Martes martes*). Toutefois, les barrières identifiées ne sont pas complètement imperméables et comportent des zones de franchissement. L'objectif de ce projet est d'identifier ces zones et de caractériser les structures et éléments paysagers (passages à faune, zones de franchissement, corridors forestiers) permettant aux mammifères terrestres de franchir les barrières. Ce travail est basé sur trois méthodes d'étude :

1- Le suivi, par collier GPS, des déplacements d'individus appartenant à deux espèces particulièrement sensibles à la fragmentation du paysage : la Martre des pins pour son très fort attachement au milieu forestier et le Cerf élaphe (*Cervus elaphus*) pour sa très forte sensibilité aux infrastructures linéaires. Cette étude porte sur des animaux sauvages et nécessite la capture et l'anesthésie de ces animaux pour la pose d'un collier GPS, la pose d'une puce électronique d'identification individuelle et des prélèvements biologiques en vue d'une étude génétique. Un maximum de 28 cerfs et 66 martres seront équipés de collier GPS et suivis au cours des 4 années du projet.

2- A l'instar des travaux que déjà réalisés sur la Martre, ce projet comporte une analyse génétique des populations de cerfs visant à évaluer l'impact des barrières potentielles sur le flux génétique de cette espèce. La collecte des échantillons portera sur 540 animaux tués à la chasse au cours des 4 années du projet.

3- Afin de renforcer nos résultats, nous poserons des appareils photographiques automatiques sur certains ponts enjambant des autoroutes et des Ligne à Grande Vitesse afin d'évaluer la fréquentation de ces ouvrages par la faune sauvage.

Une attention particulière sera portée au bien-être des animaux pour la partie nécessitant leur manipulation (« suivi GPS »). La capture des martres s'effectuera à l'aide de boîte à fauve (30 x 30 x 100 cm) qui enferme l'animal sans le blesser et sans maintenir aucune partie de son corps. Le relevé des pièges aura lieu tous les matins à l'aube afin de limiter la durée de contention des animaux. Les cerfs seront capturés par téléanesthésie (fusil hypodermique). Aucun animal ne sera évidemment mis à mort et les martres (comme les cerfs) seront anesthésiées par voie intramusculaire afin de limiter la souffrance et l'angoisse pouvant être ressenties lors des manipulations. Le bien-être des animaux (position ad hoc, couverture pour maintenir la température, humidification des cornées) ainsi que la surveillance de leur état physiologique seront assurés tout

au long de la vingtaine de minute que durent les manipulations. L'ensemble de ces manipulations se dérouleront sur le site de capture, une injection d'antidote lèvera l'anesthésie dès la fin des manipulations et les animaux seront relâchés dès leur reprise de vigilance.

Au plan appliqué, les résultats de cette étude permettront d'évaluer l'état de la connectivité forestière régionale pour la faune sauvage et de définir les éléments permettant la mise en transparence des barrières au déplacement de cette faune. Ils pourront servir de référence dans les protocoles de restauration des corridors et dans l'établissement des mesures compensatoires des nouveaux travaux d'aménagement.

3337. L'augmentation endémique de la prévalence et de l'incidence du diabète de type 2 (DT2) ainsi que de l'obésité est internationalement reconnue. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 347 millions de personnes sont diabétiques dans le monde. En 2004, le diabète a tué près de 3,5 millions de personnes et le même organisme évalue que le nombre de décès par diabète va doubler entre 2005 et 2030. Un autre élément, peut-être encore plus préoccupant et qui signe la gravité du problème, est l'apparition du DT2 chez l'enfant et l'adolescent, phénomène anecdotique, voire totalement inconnu, il y a une vingtaine d'années.

On attribue classiquement cette véritable explosion de la maladie au style de vie occidental. Le DT2 est une maladie multifactorielle, résultant de l'interaction entre des facteurs de prédisposition génétique et des facteurs d'environnement (obésité, sédentarité, surnutrition...). Sur le plan génétique, il s'agit d'une maladie polygénique et multigénique (les gènes de prédisposition ne sont pas les mêmes d'un groupe d'individus à l'autre), sans qu'aucun gène majeur n'ait été identifié à ce jour, en tout cas pour les formes courantes de la maladie. La physiopathologie du DT2 peut schématiquement être résumée à deux anomalies interdépendantes : d'une part la diminution de la sensibilité des tissus-cibles (foie, tissu adipeux blanc, muscle squelettique) aux effets de l'insuline et d'autre part une détérioration progressive de la masse anatomique et de la fonction de la cellule β du pancréas endocrine, siège de la production d'insuline.

Du fait du caractère polygénique (impliquant plusieurs gènes) de la maladie chez l'homme, les modèles animaux utilisés dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements médicamenteux miment différentes facettes de la maladie ; il peut s'agir de modèles présentant une hyperglycémie et/ou une obésité et/ou une insulino-résistance, choisis en fonction du mécanisme d'action présumé du produit à tester et donc de la cible pharmacologique. Actuellement il existe différents modèles de rats utilisés dans le cadre de la recherche d'un antidiabétique efficace à long terme ; les plus couramment utilisés sont des rats développant spontanément un diabète.

Ces études d'efficacité à long terme réalisées *in vivo* ne sont entreprises qu'après avoir prouvé une sélectivité cible-dépendante, une efficacité dans des tests cellulaires *in vitro* ainsi qu'après avoir étudié le profil pharmacocinétique des produits à tester. Ces études peuvent être réalisées comme première étude de preuve de concept chez l'animal lorsque la cible d'intérêt n'est pas exprimée chez la souris ou en deuxième intention après avoir réalisé dans un premier temps une étude chez la souris. Dans ce dernier cas, l'intérêt est de pouvoir générer une preuve de concept dans l'espèce utilisée pour des études de toxicologie.

L'effet à long terme sur le métabolisme glucidique et lipidique ne peut être évalué qu'après un traitement aigu ou chronique de plusieurs semaines (selon le candidat médicament à tester) chez l'animal et requiert la complexité d'un organisme vivant intégrant toutes les interactions hormonales et neuronales, ce qui n'est pas le cas sur des cellules ou organes isolés. Il n'y a donc pas de méthode substitutive.

Les animaux sont hébergés en groupe tout au long de l'expérimentation et leur environnement est enrichi d'un bâtonnet en bois favorisant les comportements des rongeurs.

Les techniques d'imagerie (dédiées à la quantification du tissu adipeux par exemple) sont non invasives et sans incidence sur le bien-être des animaux.

On estime à environ 80 le nombre d'animaux par étude et on suppose pouvoir réaliser 8 études par an (soit sur 5 ans environ 3200 animaux).

3338. Les traitements actuels utilisés en chimiothérapie font appel à des molécules qui, si elles restent dans la circulation sanguine et/ou se distribuent de façon générale avec une absence de spécificité d'organes ou de tissus, peuvent générer une toxicité dite périphérique. L'objectif de ce projet est de coupler le traitement à un nano-objet dans le but d'optimiser la biodistribution de la molécule et ainsi améliorer le ratio bénéfice-risque des traitements systémiques en oncologie (amélioration d'efficacité, réduction de toxicité). Il s'agit donc de comparer la biodistribution de la composition thérapeutique (molécule thérapeutique + nano-objet) et de la molécule thérapeutique (traitement de référence utilisé chez les patients).

Le nano-objet est une nanoparticule organique qui est synthétisée avec des matières premières approuvées par les autorités sanitaires américaines. Différentes compositions thérapeutiques (molécule thérapeutique + nano-objet) seront testées durant ce projet afin d'évaluer l'apport de différents nano-objets sur la biodistribution des différentes molécules thérapeutiques. Dans un premier temps, chaque composition thérapeutique sera testée sur animaux sains, puis les compositions thérapeutiques pertinentes seront évaluées sur animaux porteurs de tumeurs.

Les études de biodistribution menées durant ce projet permettront d'évaluer l'accumulation de la composition thérapeutique versus le traitement de référence dans les organes et tissus sains ainsi que dans la tumeur (sur les animaux porteurs). Cette évaluation sera faite par imagerie optique ou imagerie par rayon X (Computed Tomography) selon les possibilités de marquage du nano-objet considéré (marquage avec des molécules fluorescentes ou marquage avec des molécules radio-opaques). Ces techniques présentent l'avantage d'être non invasive et de pouvoir réaliser des observations à différents pas de temps sur le même animal. Ceci permet de restreindre le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir ces informations.

Pour la première partie, au maximum 40 souris nude par composition thérapeutique (10 compositions) seront incluses. Pour la seconde partie, au maximum 80 souris nude par composition thérapeutique (10 compositions) et par lignée tumorale (3 modèles) seront incluses. Au maximum, 2800 animaux seront utilisés sur la durée du projet. La sélection de cette espèce de rongeur est basée sur le fait que le modèle de tumeur humaine xéno greffée chez la souris nude est le modèle de référence pour l'étude des traitements anti-cancéreux. Pour la seconde partie, le nombre maximum d'animaux requis a été défini en fonction du pourcentage de prise de greffe des modèles tumoraux utilisés et la nécessité d'obtenir un nombre suffisant d'animaux présentant une bonne prise tumorale afin d'obtenir des résultats représentatifs tout en limitant le nombre d'animaux pour chaque étude. Ceci permettra de ne pas compromettre l'objectif scientifique du projet en évitant notamment de devoir dupliquer les expériences si le pourcentage de prise de greffe devait être trop faible.

Le nombre de 8 animaux par groupe a été choisi afin d'obtenir des résultats représentatifs et pertinents tout en limitant le nombre d'animaux par groupe et de manière à prendre en compte l'hétérogénéité de croissance tumorale lorsque applicable. Par ailleurs, la détermination de points limites précis ainsi que des mesures permettant de soulager la douleur ou l'inconfort ont été établis afin de réduire, supprimer ou soulager au maximum l'inconfort, la douleur et l'anxiété subie par les animaux. La complexité des mécanismes biologiques fait que le modèle animal choisi ne peut être remplacé par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants.

3339. Le coronavirus de la dinde (TCoV) est avec le coronavirus de la bronchite infectieuse du poulet l'un des deux coronavirus aviaires les plus importants en termes d'impact économique. La souche virale TCoV-080385d a été isolée en France en 2008 chez des dindes présentant des signes cliniques cohérents avec une maladie multifactorielle dénommée « complexe entéritique du dindonneau » (PEC), maladie qui regroupe plusieurs troubles intestinaux survenant chez la dinde avant sept semaines d'âge et en général au cours des trois premières semaines de vie, transmise par voie oro-fécale. Le TCoV a été plus fréquemment détecté dans les lots de dindonneaux atteints de PEC que chez des lots témoins.

Notre projet a pour objectif de déterminer quel est le taux de reproduction du TCoV pour le dindonneau dans une population sensible, ce qui correspond au nombre d'animaux nouvellement infectés par un animal infectieux pendant toute sa période d'excrétion. Ce protocole expérimental reprend les paramètres appliqués lors d'une étude pilote réalisée en 2015 à ceci près que les données statistiques nous ont indiqué la nécessité d'un échantillonnage régulier durant les 14 premières heures suivant l'exposition des sujets naïfs à des sujets infectés. L'estimation de ce paramètre constitue une étape importante dans l'étude des possibilités de dissémination du virus (futurs études : dynamique des populations de TCoV lors du passage d'oiseau à oiseau par contact direct).

La procédure expérimentale demandée (reproductible une seconde fois en cas d'échec) fera appel à l'étude de 32 dindonneaux (soit 64 au total) suivis de 1 à 45 jours. Les expérimentations conduites seront faites dans le respect de la règle des 3R, en particulier, l'effectif retenu correspond au nombre d'animaux permettant la mise en œuvre du test statistique (modèle SIR) qui permet d'estimer le taux de reproduction. L'espèce cible étant la dinde, et du fait qu'il n'existe pas de solutions alternatives pour déterminer le taux de reproduction du virus chez l'hôte, le projet nécessite le recours à l'expérimentation animale.

En conditions expérimentales, le virus étudié induit seulement des infections ne provoque pas de symptômes ou provoque seulement une entérite (inflammation des muqueuses intestinales) modérée et transitoire, ne s'accompagnant pas de mortalité ou de souffrance visible chez les animaux inoculés (inoculation du virus par voie orale). Du fait de l'absence de symptômes évidents, l'infection des animaux inoculés sera mise en évidence par un test moléculaire dans des prélèvements cloacaux. A J0, J21 post inoculation et lors de l'euthanasie à J36, une prise de sang sera réalisée.

3340. Les recherches menées au sein du laboratoire ont pour but de développer des molécules bifonctionnelles associant chimiquement une partie HBP (hydroxybisphosphonate) à un principe actif. De par la forte affinité de l'HBP pour le tissu osseux, celui-ci permettrait de vectoriser différents types de molécules au niveau osseux dans le but d'augmenter les concentrations au niveau de l'os (pour les applications ciblées) et en diminuant les concentrations circulantes (pouvant être responsable d'effets secondaires). Cette vectorisation peut s'appliquer pour les anticancéreux (dans le cadre des tumeurs osseuses telle que l'ostéosarcome), mais il est également possible de vectoriser des anti-inflammatoires, antalgiques ou des agents utilisés pour l'imagerie par exemple.

Ce projet consiste à déterminer la MTD (Maximum Tolerated Dose) des composés en administration unique et de comparer leur profil de toxicité. Ces composés (5 au total) ont été retenus au préalable pour leurs propriétés anti-tumorales dans des modèles murins. Le but est de sélectionner le candidat qui présentera le moins de signes de toxicité. Aucune méthode alternative (étude in-vitro par exemple) ne permet de reproduire tous les paramètres toxicologiques qui sont liés à un individu dans sa globalité. L'utilisation d'animaux est donc indispensable pour atteindre les objectifs de ce projet.

Les protocoles incluront 36 rats (6 rats par groupe), à savoir 6 rats CT (contrôle), et 5 autres groupes traités avec la molécule cible, à des concentrations différentes. Au total sur 2 ans, un maximum de 180 rats seront utilisés, soit 5 molécules cibles testées, de manière individuelle ou en même temps afin de limiter le nombre de groupe contrôle et ainsi respecter la règle des 3R. Les molécules seront injectées par voie IV (intraveineuse) à J0 en bolus lent, dans la veine caudale. Les animaux seront hébergés en cage individuelle afin de pouvoir quantifier la consommation d'eau et de nourriture, ces cages seront toutes équipées d'un enrichissement (tube PVC) afin de limiter tout stress lié à l'isolement des animaux. Une analyse de la formulation sanguine sera faite à J7 et le protocole se terminera à J21 par des analyses hémato-biochimiques et histopathologiques.

Une analyse de toxicité sera donc réalisée et passera par:

- le suivi quotidien des animaux (2 fois par jour)
- la prise du poids (3 fois par semaine)
- l'observation des signes cliniques (toutes les heures jusqu'à 7h suivant l'injection et deux fois par jour ensuite)
- l'analyse des paramètres hématologiques (NFS) réalisés à J7 et J21 afin de quantifier l'hémato-toxicité et biochimiques (calcium, potassium, sodium, urée, créatinine, ALAT, ASAT, ALP, CK, CK-MB, CRP...) à J7 et J21, afin de quantifier la toxicité rénale, hépatique, musculaire et cardiaque.
- une analyse HPLC (high performance liquid chromatography) à partir de prélèvements sanguins (1h, 3h, 6h et 24h post-injection) pour valider l'exposition au produit et corrélérer en fonction des doses administrées
- une analyse histopathologique BPL (Bonnes Pratiques de Laboratoire) post-mortem des organes et des os réalisée en fin de protocole (J21) à partir de coupes histologiques, précise également cette toxicité.

Le respect du bien-être animal passera donc par des conditions d'hébergement adéquates (avec la présence un enrichissement dans la cage), un suivi quotidien des animaux, l'instauration de points limites pertinents et précoces et la mise en place de mesures adaptées (traitement analgésique et euthanasie par des méthodes reconnues).

Ce projet est donc la dernière étape préliminaire aux études de toxicologie réglementaire répondant aux guidelines ICH (International Council for Harmonisation), afin de retenir une molécule qui pourra alors être administrée chez le patient dans le cadre des essais cliniques. L'objectif final étant de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques aux patients atteints de pathologies diverses liées à l'os.

3341. Les maladies inflammatoires peuvent avoir d'importantes conséquences à court terme, même être mortelles (par exemple la septicémie) et conduire à une dégradation importante des conditions de vie à long terme (par exemple l'asthme et la colite). En raison des interactions complexes entre les différents tissus dans le processus de l'inflammation, des modèles in vivo restent un moyen IRREMPLACABLE pour étudier ces troubles. Dans nos efforts continus pour améliorer les traitements médicaux, nous souhaitons améliorer les connaissances concernant les modèles permettant d'étudier l'inflammation en utilisant le modèle intranasal LPS déjà largement utilisé au laboratoire. Les LPS (acronyme de lipopolysaccharides) sont une classe de macromolécules d'origine bactérienne qui provoque une réponse inflammatoire importante chez les animaux et chez l'Homme. L'administration de LPS dans les poumons par le nez provoque une réponse inflammatoire rapide et locale. Contrairement à d'autres modèles d'inflammation, ce test peut être effectué rapidement (en 24 heures) avec moins d'effets négatifs pour l'animal comparé à d'autres modèles d'inflammation tels que la colite, et est généralement moins invasif que les modèles d'asthme existants. Ainsi, le modèle LPS intranasal pourrait offrir un raffinement important pour les études sur l'inflammation s'il peut être mieux validé et plus largement adopté.

Nous souhaitons donc comparer le modèle LPS intranasal avec d'autres modèles d'inflammation. En effet, le modèle de colite induite par le DSS nécessite de plus grands groupes d'animaux du fait d'une variabilité des résultats obtenus en raison du produit utilisé (le dextran sodium sulfate, DSS). Ainsi, cette technique pourrait aussi être un moyen très efficace de réduire le nombre total de souris utilisées dans les études sur l'inflammation. Si ce test fonctionne comme espéré, avec des résultats robustes en terme d'inflammation comparable voire meilleurs à d'autres modèles d'inflammation tels que les septicémies, la colite, ou des modèles d'asthme existants, nous serons en mesure de promouvoir ce test comme un remplacement possible dans le dépistage des gènes impliqués dans régulation de l'inflammation ou des médicaments anti-inflammatoires.

REDUCTION : En utilisant les données existantes pour le calcul des tailles des groupes, ce protocole est optimisé pour minimiser le nombre d'animaux nécessaires, ainsi un maximum de 260 souris sera utilisé dans ce projet pour une évaluation et une validation complète de 5 gènes suspectés d'être impliqué dans le processus inflammatoire.

RAFFINEMENT : Nous avons également mis en place des critères de suivi rigoureux pour éviter toute détresse inutile aux animaux. De plus, afin de réduire le stress à son minimum, les procédures seront réalisées sous anesthésie générale.

3342. La production de gaz à effet de serre (GES) dans les systèmes de production de ruminants est particulièrement préoccupante en raison de leur implication dans le changement climatique mondial. Parmi les GES, le méthane est produit dans le rumen par la fermentation microbienne anaérobie de composants d'alimentation. Les ruminants sont la principale source agricole de ce gaz à effet de serre puissant qui a un potentiel de réchauffement global 25 fois supérieur à celui du CO₂. La production de méthane représente aussi une perte d'énergie pour l'animal de 6% à 8% de l'apport alimentaire. Il est donc essentiel de réduire ces émissions de méthane, et les additifs alimentaires sont une voie de réduction reconnue comme efficace.

L'objectif de cette étude est de vérifier si l'effet antiméthanogène obtenu à l'occasion d'un traitement à la naissance sera maintenu durant la vie.

Pour cela, 30 animaux seront utilisés à partir de la naissance et pour une période maximale de 8 mois dans une première étape. La performance productive des femelles à l'âge adulte pourra être suivie au cours des lactations successives.

L'élaboration de ce projet tient compte du principe des 3R :

- Actuellement, il n'existe pas de modèle in vitro pouvant se substituer au modèle animal pour ce type d'expérimentation.
- L'utilisation de 30 animaux est nécessaire du fait de la variabilité individuelle : les valeurs physiologiques et métaboliques mesurées dans ce projet ont une variabilité qui impose un nombre minimum de 10 ~12 individus par traitement afin d'obtenir des données statistiquement représentatives. On prévoit un nombre légèrement plus élevé d'animaux (15) pour cette expérimentation relativement longue pour faire face à des possibles réductions des effectifs dues à, par exemple, des problèmes reproductifs des femelles, des problèmes individuels de santé, etc.

- Les animaux seront dans un environnement très similaire à des conditions d'élevage commerciales en France durant la majeure partie du projet. Les animaux font l'objet d'une surveillance régulière par des personnels animaliers compétents, afin de détecter les animaux malades ou en détresse. La consommation alimentaire des velles sera mesurée quotidiennement et une pesée des animaux sera réalisée chaque semaine afin de vérifier la courbe de croissance des velles et de s'assurer de l'adéquation du régime alimentaire distribué. En cas de problème, des actions correctives appropriées seront employées. Néanmoins, tout évènement particulier sera renseigné dans le cahier d'expérimentation et signalé aux personnes responsables du projet qui, au besoin, prendront les décisions adaptées pour garantir le bien-être et la santé des animaux, en accord avec la SBEA de l'établissement utilisateur. Ainsi, tout animal présentant des signes de maladie sera écarté de l'expérimentation et traité par un vétérinaire. Les procédures prévues sont de classe légère (voir ci-dessous). Elles seront effectuées par des personnels compétents et entraînés pour ces procédures.

3343. La muqueuse intestinale représente une très grande surface d'échanges entre l'hôte et l'environnement. Son homéostasie, indispensable à la bonne santé de l'hôte, résulte d'un état d'équilibre entre cette muqueuse, le système immunitaire et le microbiote intestinal. Toute perturbation de cette homéostasie peut se traduire par des troubles mineurs, mais aussi par des pathologies invalidantes voire mortelles. Le microbiote représente un acteur majeur de cette homéostasie notamment via son rôle protecteur vis-à-vis des agents pathogènes extérieurs. Toute modification du microbiote (dysbiose) peut avoir des répercussions au niveau périphérique (intégrité de la muqueuse) mais également au niveau central notamment via l'axe intestin-cerveau. Cela peut se traduire par l'apparition d'une hypersensibilité à l'origine de douleurs viscérales, d'une inflammation qui peut être auto-entretenu avec l'implication du système immunitaire ou d'effets pro-tumoraux.

Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est l'une des affections les plus fréquemment rencontrées en gastroentérologie. Il se caractérise par des désordres intestinaux qui s'accompagnent d'hypersensibilité colique et de douleurs abdominales. Actuellement, la prise en charge thérapeutique de ces douleurs est très limitée, en partie à cause du manque d'efficacité des traitements disponibles, d'où la nécessité de développer de nouveaux outils pharmacologiques. Ainsi, afin de tester de nouvelles molécules dans des conditions mimant ces pathologies, il est indispensable de développer un modèle animal présentant des origines communes à ce qui est observé chez le patient et permettant donc de reproduire ces pathologies douloureuses. Il a été montré qu'une inflammation intestinale induite par une infection bactérienne (*E.coli* pathogène) peut entraîner des perturbations de la sensibilité colique et des modifications comportementales à distance de l'infection. On parle alors de SII post-infectieux (SII-PI).

L'objectif de ce projet est de mettre en place un modèle *in vivo* post-infectieux pour étudier la physiopathologie du SII-PI d'origine non inflammatoire. En effet, la complexité de cette pathologie faisant intervenir plusieurs organes rend impossible l'utilisation d'un modèle cellulaire *in vitro*. *Citrobacter rodentium* est un modèle de colite murin *in vivo* pertinent pour étudier la réponse de l'hôte suite à une infection bactérienne. En effet, ce pathogène murin présente des similitudes avec les entérobactéries pathogènes humaines de genre *E. coli* aux propriétés d'adhésion et d'invasion (AIEC). Ces AIEC sont décrites comme jouant un rôle dans le développement de la maladie de Crohn, une pathologie inflammatoire chronique de l'intestin, et comme pouvant être responsables des perturbations de la sensibilité colique pendant les phases de rémission de la maladie. De plus, les lésions induites au niveau de la muqueuse du côlon sont similaires à celles retrouvées chez l'Homme (hyperplasie de la muqueuse du côlon, inflammation). En outre, ce modèle a été caractérisé comme induisant une hypersensibilité viscérale 30 jours après l'infection alors que le pathogène avait été totalement éliminé du tractus digestif. Cette donnée renforce la pertinence de ce modèle post-infectieux. Au travers de ce modèle, nous espérons comprendre les mécanismes sous-jacents à l'apparition de ce SII-PI et caractériser de nouvelles cibles thérapeutiques.

Le modèle utilisé sera donc murin. Toutes les expérimentations réalisées utiliseront le nombre d'animaux minimum de façon à tirer des conclusions statistiquement fiables. Nos données statistiques préliminaires concernant l'hypersensibilité colique nous indiquent qu'il est nécessaire d'utiliser un nombre minimum de 10 animaux par lot, et deux expériences indépendantes, pour obtenir des résultats statistiquement fiables et exploitables. Nous utiliserons donc 40 animaux au total répartis de la façon suivante : pour chaque expérience, nous aurons 20 animaux répartis en 2 groupes (infectés et non infectés) de 10 animaux chacun (uniquement des mâles). De plus, afin de respecter la règle des 3R « Réduire, Raffiner, Remplacer » tout au long de ces expérimentations, des points limites précis (perte de poids supérieure à 20%, présence de sang dans les fèces pendant plus d'une semaine, diminution de la motricité spontanée, posture voûtée, poils piqués) sont proposés de façon à réduire la souffrance des animaux les plus atteints.

3344. L'arthrose est une pathologie qui, dans les pays aux populations vieillissantes, constitue un véritable problème de santé publique. Elle affecte entre 10 et 15 millions de personnes en France et les personnes âgées sont les plus exposées avec 70% des plus de 65 ans présentant des signes d'arthrose. Cette pathologie affecte essentiellement les genoux, les mains, les hanches et les étages lombaires et cervicaux de la colonne vertébrale. L'arthrose est une maladie dégénérative liée à l'âge, mais elle peut apparaître suite à une déstabilisation de l'articulation engendrée par un traumatisme (rupture des ligaments croisés, lésions méniscales etc.....). Actuellement, les différentes solutions thérapeutiques existantes, ne permettent pas de traiter ou d'endiguer le processus arthrosique. Les traitements proposés traitent essentiellement les symptômes douloureux de l'arthrose (analgésiques et anti-inflammatoires). Aujourd'hui, l'enjeu des recherches consiste, notamment, à trouver des traitements ciblant les mécanismes moléculaires de l'arthrose. Parmi, les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de l'arthrose, les processus d'autophagie et de sénescence, 2 processus largement impliqués dans le vieillissement, semblent également jouer un rôle dans l'apparition de cette pathologie. La protéine anti-âge Klotho, a été

étroitement liée à ces 2 processus, or il a également été mis en évidence une corrélation entre certains polymorphismes du gène codant pour la protéine klotho et l'arthrose.

Les objectifs de cette étude sont doubles:

D'une part, nous voulons évaluer l'implication la protéine klotho et des processus d'autophagie et de senescence lors de l'apparition d'une arthrose induite ou liée à l'âge. D'autre part, nous souhaitons également utiliser des techniques de suivi longitudinal des paramètres de la marche (CatWalk) pour évaluer les éventuelles modifications fonctionnelles lié à l'apparition de l'arthrose. Cette technique a été montrée capable de détecter des troubles de la marche suite à une d'arthrose induite chimiquement ou chirurgicalement de façon unilatérale.

Dans ce but, nous allons réaliser 2 procédures expérimentales afin de suivre l'apparition de l'arthrose, ces 2 procédures expérimentales utiliseront au total 55 souris C57BL/6.

La procédure expérimentale n°1 consistera à induire une ostéo-arthrose chez ces souris par une méthode chirurgicale en sectionnant le ligament médial ménisco-tibial de façon uni- ou bilatérale qui mime l'étiologie traumatique de la maladie . 40 souris seront utilisées pour cette procédure, réparties en 5 groupes, chaque groupe comportera 8 animaux. Après l'opération, la progression de l'arthrose sera suivie, dans chaque groupe, toutes les 2 semaines jusqu'à 16 semaines post-induction en appréciant les variations de la démarche (utilisation du Catwalk). A 16 semaines post-induction, les souris seront euthanasiées et le degré d'arthrose sera évalué par analyses microscanner et histochimiques. La protéine klotho et les marqueurs des processus d'autophagie et de senescence seront évalués par des techniques biochimiques, histochimiques et immuno-histochimiques.

La procédure expérimentale n°2 a pour but de voir si le suivi des paramètres de la démarche peut permettre d'observer de façon longitudinale l'apparition d'une arthrose spontanée liée à l'âge chez des souris C57BL/6 vieillissante, connues pour développer une arthrose entre l'âge de 18 et 24 mois. 15 souris seront suivies entre l'âge de 18 mois et 24 moi par enregistrement des paramètres de la marche (Catwalk). A 24 mois d'âge, les souris seront euthanasiées et le degré de l'atteinte arthrosique sera évalué par analyse microscanner et histochimie. La protéine klotho et les marqueurs des processus d'autophagie et de senescence seront évalués par des techniques biochimiques, histochimiques et immuno-histochimiques.

Nous espérons que la mise en place du suivi longitudinal des modifications fonctionnelles de la démarche permettra de définir des seuils de modifications fonctionnelles traduisant l'apparition de l'arthrose. En effet, les cinétiques d'apparitions de l'arthrose sont variables d'un individu à l'autre, ce qui oblige souvent à réaliser des évaluations histologiques à différents temps et donc d'utiliser un plus grand nombre d'animaux. L'obtention de ces seuils de modification fonctionnelle minimale permettra de réduire le nombre d'animaux utilisé lors des futures expérimentations. Afin de réduire la douleur lors des expérimentations, une analgésie péri-opératoire immédiate est prévue par administration de buprénorphine en pré et post chirurgie ainsi que l'ajout de meloxicam dans l'eau de boisson pendant les 5 jours post chirurgie. Par ailleurs, les souris seront observées quotidiennement la première semaine après la chirurgie puis 2 fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation.

3345. L'objectif de ces études est de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires des réponses immunitaires mise en jeu par les vaccins. Ces études portent principalement sur les adjuvants vaccinaux et consisteront à définir leur mode d'action. Ces travaux sont importants pour la Santé Publique car les vaccins figurent parmi les plus grands succès de la recherche en biologie appliquée à la Santé.

Les vaccins représentent par ailleurs une source d'inquiétude au sein de la société civile. Ces études ont pour objectifs (1) de mieux comprendre les vaccins existants en particulier appréhender certains effets secondaires au travers du mode d'action des adjuvants et (2) favoriser le développement de nouvelles stratégies vaccinales muqueuses avec des adjuvants plus sûrs et parfaitement documentés quant à leur fonctionnement sur le système immunitaire. Ce deuxième objectif ambitionne de développer des vaccins contre les infections respiratoires bactériennes ou virales qui représentent une menace perpétuelle pour la Santé Publique en particulier dans des populations sensibles tels que les nouveau-nés, les jeunes enfants ou les personnes âgées.

Il est évident que la complexité des interactions des vaccins avec le système immunitaire de l'animal ne peut être reproduite uniquement dans des tests in vitro. Pour ces raisons, nos investigations nécessitent des tests chez l'animal, plus particulièrement la souris et certaines de ses déclinaisons immuno-déficientes. Il est notable que la réponse aux vaccins et adjuvants étudiés au laboratoire repose sur la réponse immunitaire innée qui est universelle et très conservée entre les mammifères, en particulier la souris et l'homme.

Nos études répondront à la règle des 3 « R » : Réduire, Remplacer et Raffiner à l'aide de systèmes modèles in vitro autant que cela est possible pour caractériser les vaccins et adjuvants. Toutes les approches permettant une analyse multiparamétrique seront mises en oeuvre pour obtenir le maximum de données exploitables par animal et ainsi de limiter le nombre utilisé. Les modèles in vitro de tests des vaccins et adjuvants seront par ailleurs privilégiées comme alternatives à l'expérimentation animale.

Les expériences seront généralement composés de 3 groupes de souris vaccinées (antigène seul, antigène + candidat adjuvant, et antigène + adjuvant de référence). Pour les expériences d'efficacité de la vaccination, 10 souris par groupes seront nécessaires alors que 5 souris par groupe seront utilisées pour les analyses multiparamétriques visant à disséquer les mécanismes de mise en place de l'immunité adaptative. Ainsi chaque année, nous nous proposons de réaliser 5 expériences de vaccination, 10 expériences sur le mode d'action incluant des animaux génétiquement immuno-déficients, et 1 expérience sur des souris chimérisées (4 groupes de 10 souris) soit 340 souris par an.

La vaccination ne provoque pas d'altération générale chez l'animal (procédure de classe légère). Les doses, les voies d'administration et les fréquences de vaccination utilisées n'induisent pas de douleur modérée ou sévère. Les vaccinations chez l'animal participent surtout à modéliser de futures interventions vaccinales qui pourraient être réalisés chez l'homme.

3346. L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) est une des causes principales de mortalité, avec une prévalence de 10% entre 65-69 ans. L'ischémie critique des membres inférieurs (ICMI), stade ultime de l'AOMI, nécessite une chirurgie de revascularisation et, en cas, d'échec, une amputation du membre.

Avant les premiers essais de thérapie cellulaire à visée angiogénique effectués chez l'Homme, des modèles animaux d'ischémie aiguë du membre inférieur avaient été décrits dans la littérature, mimant le stade ultime de l'AOMI. Notre équipe de recherche s'est engagée dans un programme de thérapie cellulaire permettant de favoriser l'angiogenèse par l'implantation intramusculaire dans le membre ischémié de patients au stade ICMI, de cellules autologues issues de la moelle osseuse.

Les résultats des essais cliniques nationaux et internationaux sont mitigés du fait de l'hétérogénéité des produits de thérapie cellulaire (PTC) et du nombre limité de patients. Il est donc nécessaire aujourd'hui de revenir à l'expérimentation animale afin de définir les protocoles de thérapie cellulaire de demain. Au cours de ce projet animalier nous souhaiterions reproduire l'ICMI en effectuant une ligature de l'artère fémorale chez la souris.

Il est indispensable de :

1. Bien connaître le site d'ischémie, futur site d'implantation des PTC,

Chez les patients, l'ischémie crée un environnement défavorable à la survie cellulaire. Ces remaniements délétères pourraient expliquer pourquoi certains des patients ont été amputés très précocement.

Vingt-cinq souris de souche BALB/c nous permettront de mettre au point le modèle d'ischémie aiguë du membre inférieur et d'optimiser ce projet (points limites, douleur, analgésie, faisabilité des tests,...).

Trente souris de souche BALB/c nous permettront de comparer le site d'ischémie chez une souris jeune (7 semaines) versus une souris âgée (entre 16 et 18 mois). En effet, les patients candidats à la thérapie cellulaire sont âgés et présentent de nombreux facteurs de risque cardiovasculaire.

2. Afin de définir de nouvelles modalités de thérapie cellulaire :

Les PTC humains prélevés lors de l'essai clinique (seuls ou en association avec quatre autres types cellulaires) seront injectés dans le muscle ischémié de la souris Nude. Ces Souris, à réaction immunitaire réduite, sont nécessaires pour la tolérance d'un matériel d'une autre espèce. Dix souris Nude seront utilisées pour confirmer la validité du modèle.

Les souris seront randomisées en 5 groupes (6 souris par condition). Nous disposons d'une quinzaine de PTC issus de la moelle osseuse; nous utiliserons donc un total maximal de 521 souris Nude.

Des tests comportementaux ("Mouse Grimace Scale" et "Tarlov Score") nous permettront d'évaluer la douleur et le degré d'ischémie. Un test fonctionnel de mesure du périmètre de marche et des analyses de flux sanguin par Laser Doppler nous permettront de suivre l'efficacité clinique de la thérapie cellulaire chez l'animal. Des analyses tissulaires par spectroscopie Raman seront programmées avant et après la chirurgie. Les mesures physiques et biologiques des différents paramètres ont été optimisées à J3, J7 et J14 pour être regroupées. De plus ces tests permettent de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'étude. Les souris seront sacrifiées au 16ème jour post-opératoire. Des analyses histologiques, transcriptomiques et protéomiques seront effectuées sur les biopsies musculaires.

Ce modèle d'étude d'ischémie aiguë du membre inférieur ne peut être remplacé par un modèle in vitro car il fait intervenir des interactions complexes entre le matériel cellulaire administré et les tissus biologiques vivants (muscle, vaisseaux, facteurs environnementaux, physiques ou biologiques).

Les cellules humaines injectées sont préparées sous atmosphère stérile. L'ischémie aiguë peut conduire à une auto-amputation de l'animal mais le plus souvent la régénération vasculaire est très rapide chez le rongeur (en 2 semaines). Nous effectuerons tous les gestes chirurgicaux sous anesthésie générale et la prise en charge de la douleur sera poursuivie par administration de Buprénorphine. Les animaux seront sous surveillance rapprochée pendant l'hébergement (mesure du poids, apparence physique, comportement). Nous prévoyons un enrichissement des cages durant l'hébergement.

Les points limites de cette étude sont une perte de poids supérieure ou égale à 20% ou un score "Mouse Grimace Scale" supérieur ou égal à 2 ou une auto-amputation.

L'administration de la buprénorphine sera réévaluée pendant la phase de mise au point du protocole et en fonction des résultats des tests sur la douleur « Mouse Grimace Scale ».

Les animaux présentant un score aux tests sur la douleur « Mouse Grimace Scale » de 2 (« severe ») auront une dose d'analgésique majorée. Si le score sévère persiste l'animal sera euthanasié.

3347. Le trouble anxieux généralisé est un problème de santé publique majeur touchant 4 à 8% de la population mondiale. Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) sont prescrits en 1ère intention mais sont limités, entre autres, par un taux élevé de rechute et un délai d'action retardé. En se basant sur leur mécanisme d'action, une étude récente suggère que le récepteur 5-HT4 pourrait être un nouvel espoir de traiter rapidement et efficacement les troubles anxieux.

Ainsi, ce projet expérimental a pour objectif l'étude mécanistique et comportementale d'un traitement par un agoniste du récepteur 5-HT4 chez la souris.

Premièrement, nous étudierons les conséquences comportementales d'une administration unique d'un agoniste du récepteur 5-HT4, versus une benzodiazépine, un antidépresseur et un antagoniste du récepteur 5-HT4, dans une souche de souris anxieuse (BALB/cJrj). L'étude des caractéristiques comportementales sera évaluée par différents tests non invasifs prédictifs de la réponse anxiolytique. Afin de vérifier si la réponse thérapeutique induite par l'agoniste du récepteur 5-HT4 peut être

prédite par l'expression d'un biomarqueur périphérique, l'expression de la protéine β -arrestine 1 sera étudiée au niveau sanguin.

Deuxièmement, nous identifierons les circuits impliqués dans les effets anxiolytiques rapides de l'agoniste du récepteur 5-HT₄. Pour ce faire, la technique d'optogénétique sera utilisée, permettant grâce à l'utilisation d'un virus, d'inhiber l'activité neuronale à l'aide d'une fibre optique. Des injections locales et à dose unique de l'agoniste du récepteur 5-HT₄ dans différentes régions cérébrales, couplée simultanément à la technique d'optogénétique permettront d'identifier ces circuits.

Pour l'ensemble de ce projet, 570 souris BALB/cJrj seront utilisées, en prenant en compte la règle des 3R. Il s'agit de réduire le nombre d'animaux, de raffiner la qualité des expériences et de remplacer si possible l'expérimentation animale. Dans l'état actuel des connaissances, modéliser in vitro ou in silico des troubles de l'humeur n'est pas possible. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire pour étudier ces pathologies. Dans le protocole que nous proposons la technique d'optogénétique permet d'utiliser chaque animal comme son propre contrôle ce qui permet de réduire de façon importante le nombre d'animaux nécessaire tout en générant des données de forte valeur informative. Au cours de ce projet des anesthésiques et des analgésiques seront utilisés dès que nécessaire.

Globalement, l'ensemble de ce projet permettra de mettre en évidence une nouvelle cible pour le traitement des troubles anxieux. Ce projet détaillera à la fois les effets comportementaux, les voies cérébrales impliquées et étudiera un biomarqueur potentiel pour évaluer précocement la réponse des animaux au traitement. Ce seront des éléments clés dans la perspective d'un passage à la clinique

3348. L'IL-15 est une cytokine de la même famille que l'IL-2 (Proleukin®) qui a l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement des cancers du rein métastatique et du mélanome métastatique. L'IL-15 joue un rôle important dans la surveillance immunitaire, ce qui en fait un candidat de choix pour la mise en place de stratégies immunothérapeutiques antitumorales. Elle présente plusieurs avantages par rapport à l'IL-2, comme une toxicité plus faible et une activité améliorant la survie des lymphocytes mémoires. Pour ces différentes raisons, l'IL-15 est considérée par le National Cancer Institute comme ayant un potentiel thérapeutique supérieur à l'IL-2 en oncologie. Notre laboratoire a développé une version optimisée de l'IL-15 (RLI), qui se comporte comme un agoniste de 50 à 100 fois plus puissant in vitro. Les résultats in vivo montrent que le RLI est également plus efficace que l'IL-15 ou l'IL-2 pour ralentir la croissance tumorale dans certain modèle murin. Afin d'augmenter son potentiel anti-tumoral, nous avons fusionné le RLI à un fragment Fc d'une IgG1 humaine. Deux Fc-RLI ont été créés: le RLI-monomérique avec un RLI sur un seul des deux brins du fragment Fc et le RLI dimérique avec un RLI sur chacun des brins du fragment Fc. Ces Fc-RLI ont pour but de cumuler l'augmentation de la durée de demi-vie du RLI et son activité immunostimulatrice afin de générer une réponse immunitaire plus efficace. A terme, ces Fc-RLI seront les premiers pas vers la création d'une immunocytokine. L'avantage attendu de ces Fc-RLI est d'augmenter les fonctions immunostimulatrices du RLI tout en réduisant les doses nécessaires ce qui limiterait la toxicité et le nombre d'injections. A ce stade du développement, nous avons peu de recul sur la toxicité de ces molécules et sur les doses optimales à injecter. Ainsi, nous devons mesurer les paramètres d'élimination d'une telle molécule, mais aussi analyser les mécanismes immunitaires in vivo mis en jeu et en évaluer la toxicité. Ces informations indispensables au développement de cette nouvelle approche ne peuvent qu'être qu'obtenues in vivo. Ce projet se terminera par l'évaluation du potentiel thérapeutique de cette approche sur différents modèles tumoraux: tumeurs métastatiques ou encore des tumeurs solides greffées à des souris. Pour leur facilité de manipulation, nous travaillerons uniquement sur des modèles murins. Le but de ce projet est à la fois de comprendre le fonctionnement de ces Fc-RLI mais aussi de les comparer notamment sur l'intérêt de la dimérisation du RLI. Environ 700 souris sont prévues pour étudier les aspects pharmacocinétique/pharmacodynamie et l'efficacité anti-tumorale de ces deux Fc-RLI et environ 300 souris seront utilisées pour anticiper le régime d'administration potentiel d'une future phase I clinique. Afin de respecter les 3R, les protocoles expérimentaux seront préparés en avance.

Pour réduire : les modèles tumoraux seront réalisés sur un nombre réduit de souris en amont pour vérifier la prise de greffe et la fonctionnalité du modèle. Si les premières expériences ne sont pas concluantes, elles ne seront pas dupliquées afin de réduire l'utilisation des souris.

Pour Remplacer, nous utiliserons aussi des modèles in vitro pour évaluer dans un premier temps l'efficacité de nos molécules et leur apport pour la cytotoxicité contre des cellules tumorales.

Enfin, des mesures de raffinement seront prises afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux. Les souris seront ainsi surveillées quotidiennement à partir de chaque expérimentation. Lors des études sur souris saine, si un quelconque signe de souffrance est observé (l'insuffisance respiratoire étant le principal effet secondaire attendu pour les fortes doses) les souris seront sacrifiées et les doses injectées seront ensuite réduites. Pour les comparaisons des populations cellulaires entre les différents traitements, nous utiliserons des analyses de variance. Le nombre répétition de chaque expérimentation dépendra des résultats des premières expérimentations réalisées. Dans le cas des expérimentations sur l'efficacité anti-tumorale, nous utiliserons plusieurs critères évaluant la souffrance des animaux

- Une perte de poids supérieure à 10%

- Un animal qui semble prostré, isolé

3349. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont les cellules permettant le renouvellement des cellules du sang (globules blancs et globules rouges) tout au long de notre vie. Dans certains cas pathologiques, les cellules hématopoïétiques se dérèglent et sont à l'origine de cancers comme les leucémies. D'un point de vue thérapeutique, la destruction de toutes les cellules hématopoïétiques, y compris les CSH, peut s'avérer nécessaire pour éradiquer le cancer. Il faut alors réaliser une greffe de CSH pour remplacer les cellules détruites qui ensuite redonneront toutes les autres cellules sanguines. De nos jours,

différentes techniques sont utilisées pour obtenir des CSH comme le prélèvement de moelle osseuse, la mobilisation en périphérie de progéniteurs médullaires ou les cellules du sang de cordon. Cependant, une caractérisation claire de ces CSH est toujours manquante pour pouvoir les isoler spécifiquement et éventuellement les amplifier. Beaucoup de données sont actuellement disponibles chez la souris, ce qui n'est pas le cas chez l'homme. Notre travail au laboratoire consiste à étudier ces CSH pour affiner leur caractérisation phénotypique (expression de marqueurs à leur surface) et fonctionnelle. Cependant, le test fonctionnel de référence permettant d'étudier le caractère souche des cellules est la greffe dans des souris immunodéficientes de type NSG qui tolèrent la présence de cellules humaines. Si les cellules injectées sont capables de reformer une hématopoïèse lors de greffes successives dans des souris, cela démontre que ces cellules sont bien des cellules souches. Nous travaillons sur différents axes de recherche complémentaires afin d'avancer sur la connaissance fine des CSH humaines. Nous étudions à la fois des aspects fondamentaux de la biologie des CSH mais aussi leurs relations avec leur microenvironnement. Pour mener à bien nos travaux, nous réalisons systématiquement des tests exhaustifs pour caractériser in vitro les cellules que nous obtenons, soit de cultures, soit de prélèvements. Dans un but de réduction du nombre d'animaux, seules les populations cellulaires exprimant les marqueurs correspondant à la définition d'une cellule souche sont ensuite greffées à des souris immunodéficientes pour valider in vivo leur fonctionnalité.

L'ensemble de ces expériences permettra d'augmenter les connaissances sur les cellules souches hématopoïétiques et permettra à terme d'améliorer la qualité des greffes à des patients. Pour cela, la greffe à des animaux est un prérequis préclinique.

Les expériences de greffes hématopoïétiques sont les seules disponibles pour démontrer le caractère souche de cellules hématopoïétiques. Aucune méthode de remplacement permettant d'éviter le recours à l'expérimentation animale n'est à ce jour connue. Nous tentons au maximum de raffiner toutes nos expérimentations de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux et d'annihiler ou de diminuer le plus possible le stress et la douleur. Les conditions de conditionnement subléthal par myéloablation et les techniques d'injections sont maintenant bien définies dans la littérature. Toute injection ou prélèvement en intraveineux se fait sous anesthésie pour réduire le stress subi par la souris et faciliter la manipulation. Ce test engendre peu de douleur à l'animal. Dans certains cas peu fréquents, nous pouvons être amenés à effectuer des greffes de cellules directement en intra-osseux dans le fémur. Cette technique engendrant une douleur plus importante (traitée par antalgiques) est réservée uniquement au cas où les cellules souches que nous étudions n'auraient pas de capacité intrinsèque de migration dans la moelle.

Nous faisons des lots de 5 souris à chaque fois et groupons les expériences pour ne pas multiplier les contrôles et ainsi réduire le nombre de souris. Nous estimons notre besoin à 50 souris par an (soit 200 souris au total).

3350. Le cortex préfrontal est une zone corticale fondamentale dans la gestion cérébrale de la communication sociale. Les grandes pathologies du système nerveux central (autisme, schizophrénie, dépression) sont associées à un dysfonctionnement du cortex préfrontal. La schizophrénie touche 1 à 2 % de la population et la dépression à une occurrence de l'ordre de 7%. Nos travaux visent à identifier le rôle de certains récepteurs membranaires dans les physiopathologies liées au cortex préfrontal. Pour cela nous avons mis en place l'élevage d'une lignée de souris déficiente pour le gène codant un récepteur à un neurotransmetteur suspecté dans la dépression. L'objectif de notre étude est d'établir si l'absence de notre gène d'intérêt confère une résistance au stress répété qui est à l'origine de la dépression.

Notre objectif est d'évaluer le rôle de ce récepteur sur le fonctionnement neuronal à l'aide d'études réalisées in vitro sur des tranches de cerveaux suite à des tests de stress répétés de contention chez la souris. Ces stress répétés ont été démontrés pouvant affecter un grand nombre de comportements et déclencher l'expression de maladies comme la dépression. Cette procédure de contention est le moyen le plus largement utilisé pour réaliser une procédure chez l'animal car elle est simple et ne génère pas de souffrance chez l'animal. Nous avons établi notre projet de recherche en tenant compte de la règle des 3Rs. Ainsi, nous avons mis en place un protocole expérimental permettant de réduire au maximum le nombre de souris nécessaire. Ainsi, nous avons estimé qu'il nous faudra 320 souris pour garantir la validité statistique de l'étude réalisée sur trois ans. Un modèle animal est utilisé car une étude sur le stress est nécessaire pour tester le rôle de ce récepteur membranaire. A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour cette étude selon la référence « the European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL-ECVAM) ». Dans un souci de raffinement, nous allons veiller au bien être des animaux qui seront élevés en milieu enrichi.

Les procédures expérimentales ont été conçues de sorte à supprimer toute souffrance psychique et/ou physique des souris et un point limite a été défini pour les souris. Il comporte une évaluation de la perte de poids, de l'apparence physique et du comportement de l'animal.

3351. Les anticorps sont aujourd'hui l'objet de toutes les attentions. En effet, du chercheur académique ayant besoin d'un anticorps à usage recherche, de la société de biotechnologie ou de la big pharma voulant en développer un à visée diagnostique ou thérapeutique, les anticorps sont, aujourd'hui, utilisés par tous les acteurs du monde de la biologie. Il faut donc être en mesure de fournir à tous ces utilisateurs, des anticorps répondants à leurs besoins. Différentes techniques de génération d'anticorps existent sur le marché, chacune avec leurs avantages et inconvénients. On peut regrouper ces différentes techniques sous 3 grandes méthodes. La première repose sur l'immunisation d'animaux avec l'antigène, sous différentes formes possibles, en vue d'induire une réponse immunitaire contre celui-ci et de récupérer ensuite les anticorps spécifiques de cet antigène dans le sang ou d'autres organes de l'animal immunisé. La deuxième consiste à construire des banques contenant des millions de séquences d'anticorps différents, de faire exprimer chaque anticorps de la banque via une technique spécifique, et ensuite de screener chacun de ces anticorps contre l'antigène afin d'isoler les anticorps spécifiques

reconnaissant l'antigène. La troisième technique consiste elle à screener des échantillons sanguins de milliers de patients contre un antigène particulier afin de trouver un anticorps d'intérêt. Les 2 dernières méthodes, compte tenu de leur coût très élevé, s'adressent quasi exclusivement au développement d'anticorps à visée diagnostique ou thérapeutique. En revanche, la première méthode peut être utilisée pour n'importe quelle application de l'anticorps final obtenu. Notre technique pour générer ses anticorps appartient à cette méthode. Elle consiste à introduire directement dans certaines cellules de l'organisme un ADN ou un ARN codant l'antigène. L'antigène est alors produit localement par l'organisme et le système immunitaire, identifiant cet antigène comme ne faisant pas partie du « soi », déclenche une réponse immunitaire contre lui et, in fine, des anticorps spécifiques de cet antigène sont alors produits. Cette technique, développée dans les années 1990, est néanmoins peu efficace car l'ADN/ARN ne pénètre difficilement dans des cellules, in vivo, et la réponse immunitaire induite est faible voire inexistante.

Notre société a mise au point des vecteurs synthétiques permettant une délivrance efficace de l'ADN au cœur des cellules à la fois in vitro mais aussi in vivo. Ainsi, après injection intramusculaire d'un plasmide encodant un antigène, formulé avec nos vecteurs synthétiques, une forte quantité d'antigène est produite par les fibres musculaires transfectées. Cette importante production locale d'antigène est aussi associée à une stimulation du système immunitaire inné grâce à un mécanisme de délivrance cytoplasmique de l'ADN plasmidique, médié par les vecteurs. Ce double effet permet ainsi le déclenchement d'une forte réponse immunitaire dirigée contre l'antigène et ainsi, l'obtention d'anticorps d'intérêt.

Afin de respecter la règle des 3R dans notre projet, nous limiterons le nombre d'animaux utilisé en précédant nos études in vivo par des études in vitro pour définir le meilleur vecteur à utiliser par projet. Une fois cette sélection réalisée, chaque projet est réalisé sur un groupe de 15 souris, hébergées par groupe de 5 dans des cages avec enrichissement sous forme de nid. Dans certains cas, la nécessité de produire une grande quantité d'anticorps nous amènera à l'utilisation de rats et non de souris pour limiter la quantité d'animaux utilisés. Dans ce cas, les rats sont hébergés par deux ou trois, eux aussi avec enrichissement. Selon les données antérieures de l'entreprise, on peut estimer à 450 le nombre de rongeurs utilisés en 5ans (souris ou rats). Le remplacement des animaux par les méthodes décrites précédemment ne peut être envisagé dans un contexte de recherche académique du fait de leur coût, ce qui correspond à la quasi totalité de nos clients.

3352. L'annexine A1 est une protéine intervenant dans de nombreux processus biologiques. Nous avons montré sa participation dans les mécanismes de dissémination des tumeurs dans un modèle préclinique de mélanome. De ce fait, elle pourrait être une cible intéressante dans le contrôle de la formation de métastases. Nous avons la possibilité de bloquer cette action invasive par l'utilisation d'anticorps fournis par le Pr D'Acquisto. Ce projet comportera donc l'utilisation de souris pour évaluer l'effet de cet anticorps sur des souris témoins et ensuite sur des modèles de mélanome. Plusieurs modèles seront étudiés permettant de focaliser soit sur le départ de cellules métastatiques d'une tumeur primitive, soit sur l'installation de ces cellules dans l'organe cible. Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Des cellules de mélanome modifiées pour exprimer de la bioluminescence seront utilisées pour permettre un suivi des métastases in vivo en imagerie optique sans sacrifier les animaux. La procédure expérimentale induit peu de douleur, afin de surveiller les souris elles seront observées et pesées régulièrement. In fine l'étude proposée permettra de fournir des résultats sur la pertinence de cibler l'annexine A1 dans le contrôle de la dissémination métastatique du mélanome. Le nombre d'animaux nécessaire est de 240 souris pour la durée du projet.

3353. Le contrôle central de la balance énergétique implique un réseau neuronal fortement régulé et distribué au niveau de l'hypothalamus et du complexe vagal dorsal (CVD). Des dysfonctionnements de ce réseau neuronal conduisent à des désordres métaboliques (diabète ou obésité). Au sein de ces structures, les neurones exprimant la pro-opiomélanocortine (POMC) jouent un rôle prépondérant dans la détection du glucose circulant et de facteurs de satiété comme la leptine. Les miARN sont des ARN non codant de 22 à 26 nucléotides qui régulent l'expression des gènes par appariement spécifique avec des ARNm cibles. Alors que les miARN ont été impliqués dans diverses fonctions biologiques, leur implication éventuelle dans la régulation de la balance énergétique au niveau central est mal connue. Dans ce contexte, nous avons entrepris d'identifier et de caractériser les miARN potentiellement impliqués dans la modulation d'expression de la POMC. Nos résultats montrent que l'expression de miR-383 et miR-488 est augmentée à la fois dans l'hypothalamus et le CVD de souris Ob/Ob qui sont déficientes en leptine. Dans la continuité de ce travail, nous avons développé un modèle de souris transgéniques qui présentent une perte de l'expression de DICER, enzyme clé dans la maturation des miARN, dans les cellules exprimant la POMC. Nos observations préliminaires suggèrent un rôle important des miARN dans le contrôle de la balance énergétique. Nos résultats originaux nous permettent de proposer un projet de recherche qui vise à évaluer l'impact de l'absence totale des miARN dans les cellules à POMC sur différents paramètres qui sous-tendent la balance énergétique : le comportement alimentaire et les dépenses énergétiques. Dans un second temps, il apparaît nécessaire de clarifier le rôle de nos miARN d'intérêt précédemment cités dans le contrôle du système mélanocortinergique. Pour l'ensemble de nos expériences, un lot de 130 animaux sera nécessaire. La règle des 3R (réduire, remplacer et raffiner) a été appliquée dans la mise en place de notre étude. En particulier, un même groupe d'animaux aura été utilisé dans différentes approches afin de réduire le nombre d'animaux. Certaines expériences (injection intracérébroventriculaire, utilisation de cages métaboliques) peuvent engendrer un stress chez l'animal (perte de poids par exemple). Et de ce fait les animaux ont bénéficié d'un suivi strict afin de détecter toutes manifestations ou dommages liés à la procédure expérimentale.

3354. Les coccidioses aviaires sont des maladies dues à l'infection par des protozoaires parasites, les coccidies du genre *Eimeria*, qui sont très fréquentes et d'un intérêt sanitaire et économique majeurs. Les parasites se développent dans le tube

digestif des oiseaux et entraînent une mauvaise absorption de la nourriture et des lésions plus ou moins profondes de l'épithélium intestinal. Les coccidioses sont ainsi caractérisées par des retards de croissance, de la diarrhée, de la morbidité illustrée par de l'apathie et de la prostration, parfois de la mortalité. Elles affaiblissent les oiseaux et favorisent l'émergence d'autres troubles liés à des agents pathogènes opportunistes.

La lutte ciblée contre les coccidioses se fait principalement de deux façons :

-la prophylaxie par l'administration de vaccins vivants atténués ou par l'incorporation d'additifs coccidiostatiques dans l'aliment des oiseaux,

-le traitement médicamenteux après diagnostic d'un cas dans l'élevage.

Les additifs coccidiostatiques et les produits de traitement sont peu nombreux et sont confrontés à l'émergence de phénomènes de résistance chez les parasites. Les vaccins disponibles sont peu nombreux, onéreux, et tous utilisent des coccidies vivantes.

Nous disposons au laboratoire de modèles de reproduction expérimentale de l'infection coccidienne et de la coccidiose induite ce qui va nous permettre pour ce projet d'étudier le cycle de développement de coccidies, leur pouvoir pathogène et d'investiguer des approches nouvelles pour le contrôle du développement parasitaire et des coccidioses, chez le poulet, la dinde et la pintade. Cette démarche s'intègre dans l'accroissement des connaissances sur les coccidies et dans la recherche et l'évaluation de mesures susceptibles de renforcer les moyens de lutte contre ces parasites.

Les modèles disponibles permettent :

-de collecter et d'étudier des stades de développement parasitaire à différents moments du cycle des parasites,

-de mesurer les performances zootechniques des volailles parasitées : poids, gain de poids et indice de consommation,

-et d'évaluer des critères pathologiques pour les volailles : morbidité, dégradation de l'aspect des matières fécales, excrétion parasitaire et lésions au niveau du tube digestif. Pour ce projet, 1.600 oiseaux conventionnels seront utilisés. Le recours aux animaux est indispensable car il n'existe pas de méthode alternative valable (culture cellulaire, évaluation in vitro). Les volailles sont d'abord élevées dans des animaleries exemptes de coccidies afin de préserver la sensibilité des oiseaux, puis transférées dans les animaleries destinées aux essais et infectées par voie orale avec des coccidies et des doses infectieuses adaptées aux besoins. Le suivi dure au maximum huit jours après la date d'infection parasitaire. Dans les études d'efficacité de produits, ces derniers peuvent être administrés dans l'aliment ou via l'eau de boisson.

3355. Les animaux en captivité ont peu de contrôle sur leur environnement et ce manque voire la perte de contrôle affecte leur bien-être. A un degré moindre, l'impossibilité de prévoir les événements survenant en élevage conditionne également l'état de bien-être des animaux en élevage. A l'inverse un événement positif fortement prévisible, à la suite d'un conditionnement classique ou pavlovien, se traduit entre autres par une augmentation transitoire de l'activité locomotrice. Ces comportements d'anticipation positive qui facilitent les comportements consommatoires, sont définis depuis peu comme une expression d'émotions positives. Cependant cet accroissement d'activités comportementales pendant la période de prévision, c'est à dire l'intervalle entre le signal (SC) et la récompense (SI), peut également être interprété comme une expression de frustration liée à l'impossibilité d'agir sur l'obtention de la récompense. A la différence du conditionnement classique, en conditionnement opérant c'est l'animal qui exécute une tâche spécifique pour obtenir la récompense. Ainsi, l'observation d'un accroissement transitoire du niveau d'activités de l'animal entre la réalisation de la tâche opérante et la récompense convoitée ne peut pas être considéré comme une expression de frustration étant donné que l'animal contrôle l'obtention de la récompense. Les recherches sur l'effet de la contrôlabilité a principalement porté sur le contrôle d'événements aversifs. À notre connaissance, il ya peu de connaissance de l'effet de la prévisibilité et de la contrôlabilité d'événements positifs.

L'objectif de notre étude est d'évaluer comment la contrôlabilité et la prévisibilité pour une récompense alimentaire affectent le comportement et le tonus parasympathique chez les agneaux. Plus précisément, est-ce que le contrôle et la prévision de la récompense se traduisent par des expressions comportementales et cardiaques différentes en qualité et/ou quantité?

Trente-six agnelles de race Romane et âgées de 6-8 mois seront réparties dans trois traitements, 12 agnelles entraînées dans un protocole de conditionnement opérant pour associer une tâche donnée et la distribution d'une quantité donnée d'aliment (AO), 12 agnelles entraînées dans un conditionnement classique pour prévoir à partir d'un signal lumineux la distribution de la même quantité d'aliment (AC), et 12 agnelles "yoked" c'est à dire celles qui reçoivent la même quantité d'aliment mais sans pouvoir contrôler ni prévoir la distribution (AY). Les agnelles sont systématiquement testées en triade : lorsque l'agnelle AO réalise la tâche apprise (passer la tête dans une lucarne) pour obtenir quelques secondes après une quantité donnée de concentré, le signal lumineux est simultanément déclenché pour l'agnelle AC et les 3 agnelles reçoivent en même temps la même quantité fixée de concentré. Après l'acquisition du lien entre la tâche opérante et la récompense, le délai entre l'exécution de la tâche et l'obtention de la récompense sera augmenté par palier de 5 secondes pour tenter d'atteindre 60 secondes. Une étude précédente basée sur un conditionnement classique nous avait permis de valider ce délai. Les triades des animaux seront définies pour toute la durée de l'expérience et la progression des paliers dépendra des performances de chaque agnelle AO. Chaque triade sera entraînée quotidiennement à raison d'une séance/jour d'une quinzaine de minutes. Durant ces séances quotidiennes, les agnelles de la triade seront conduits ensemble de leur parc d'élevage jusqu'à la plate-forme de test où elles seront placées dans 3 boîtes individuels et adjacents.

Etant donnée la variabilité individuelle dans les performances d'apprentissage, l'effectif initial de 12 animaux par traitement est le minimum pour s'assurer qu'au moins 8 animaux parviennent à acquérir le conditionnement opérant (AO) ou classique (AC). Le choix de la tâche à acquérir pour les AO qui est basé sur leur forte propension à explorer des cavités, garantit une probabilité maximale de réussite en conditionnement opérant. Les 36 agnelles seront hébergées dans 3 parcs indoors (3x12)

attendants la plate-forme de test. Les animaux d'une même triade seront hébergés dans le même parc pour réduire les opérations de tri et seront déplacés ensemble du parc d'élevage à la plate-forme (30 m ± 10 m). La durée totale du projet est de 3 mois.

3356. Depuis plusieurs années, le sandre, *Sander lucioperca* est devenu une espèce d'intérêt pour la diversification de l'aquaculture européenne. En effet, en plus de sa valeur récréative, la qualité de sa chair et sa valeur commerciale en font une espèce d'une grande importance économique. Jusqu'à aujourd'hui, la demande croissante en sandre était presque exclusivement fournie par les populations sauvages déclinantes (lacs, rivières...). Les populations aquacoles sont quant à elles faiblement représentées. Le but du projet va donc être de développer l'aquaculture du sandre afin d'approvisionner le marché. Pour cela, connaître et contrôler son cycle de reproduction afin d'obtenir des oeufs et des larves de qualité pour reconstituer les stocks de géniteurs futurs est indispensable.

Le cycle de reproduction des poissons est un processus compliqué régulé par un ensemble d'hormones indispensables à la fonction de reproduction. Pendant ce processus, une étape va être importante pour la réussite de l'aquaculture : la phase de maturation des ovocytes, précédant l'ovulation et permettant de rendre ces derniers aptes à la fécondation. Or en aquaculture, cette étape ne se déroule pas correctement ce qui aboutit à l'absence d'ovulation et de ponte chez les poissons. Pour éviter cela et synchroniser les pontes, nous savons que des traitements hormonaux, à base de molécules régulatrices de la fonction de reproduction, sont utilisés. Certains traitements sont efficaces chez le sandre pour induire l'ovulation ; toutefois, aucun n'est idéal ayant chacun leurs avantages et leurs inconvénients (pourcentage d'ovulation insuffisant, quantité d'oeufs produits, temps d'action trop long, déclenchement de la réponse immunitaire du poisson...). Enfin, au niveau physiologique, l'effet de ces traitements sur la reproduction est inconnu. Or, connaître l'effet de tels traitements sur la fonction de reproduction est indispensable pour développer l'élevage de cette espèce.

Dans le cadre de ce projet, l'objectif sera donc d'améliorer la reproduction du sandre en déterminant quel serait le meilleur traitement pour induire la reproduction du sandre. A cette fin, nous étudierons les effets déclenchés par ces traitements sur la reproduction du sandre sauvage au niveau physiologique (concentrations hormonales, pourcentage d'ovulation...). Nous utiliserons 81 femelles au total (9 poissons par groupe) qui seront anesthésiées et injectées avec l'un des 5 traitements étudiés. Le nombre de poissons par groupe a été calculé afin d'obtenir une puissance statistique suffisante mais aussi nécessaire pour espérer obtenir un résultat significatif tout en respectant la règle des 3R (réduction). Pour l'étude de l'effet des traitements sur la régulation des concentrations hormonales, 3 prises de sang, sous anesthésie, seront effectuées. Il n'est pas possible d'avoir recours à des modèles cellulaires ou moléculaires (remplacement non envisageable). Nous déterminerons aussi leurs effets sur les performances de reproduction (pourcentage d'ovulation). Au cours de l'expérience, l'apparition des points limites (changement de l'activité de nage, du comportement alimentaire, apparition de nécroses ou de champignons) sera surveillée et la moindre souffrance de l'animal déclenchera sa sortie de l'expérience (raffinement).

3357. La cornée est normalement non vascularisée ce qui fait d'elle un tissu relativement épargné par le système immunitaire. Lors des greffes de cornées, les réactions de rejets ne sont cependant pas rares (20% des patients dans la première année post greffe). Pour certains patients à haut risque, les taux de rejets peuvent aller jusqu'à 50%. Le traitement préventif habituel est un collyre à la cortisone agissant comme immunosuppresseur local et prescrit au long cours. Cependant l'observance peut être mauvaise, et des oublis répétés peuvent provoquer un rejet. Le traitement pourrait favoriser également des rejets à bas bruit. L'Ozurdex est un dispositif médical sous forme d'un implant résorbable de petite taille déjà utilisé en ophtalmologie pour des pathologies rétinienues. Le principe actif contenu dans l'Ozurdex est une antirejet : il contient du dexaméthasone qui est relargué de façon continue pendant 4 mois jusqu'à résorption complète de l'implant. Nous émettons l'hypothèse qu'un relargage continu de dexaméthasone sous la conjonctive, au plus près de la cornée et dès le jour de la greffe, préviendrait le rejet de manière plus efficace que les collyres. C'est pourquoi nous souhaitons évaluer l'efficacité d'un dispositif de relargage retard d'immunosuppresseur (dexaméthasone) implanté dans la conjonctive sur la diminution du rejet de greffe cornéenne. Etape préclinique qui pourrait éventuellement conduire à un essai clinique dans un but d'amélioration du processus médical et de la qualité de la vie des patients.

La cornée de lapin est similaire à celle de l'homme au niveau de l'anatomie et de l'histologie. L'avantage principal de l'utilisation du lapin pour cette étude est que le rejet est de 100% après une allogreffe de cornée sans traitement immunodépresseur. La chirurgie qui sera effectuée correspondant au type de greffe de la cornée couramment utilisé en clinique humaine: la kératoplastie transfixiante. Deux groupes de lapins seront donc constitués. Un seul oeil sera opéré pour chaque lapin. Les groupes contrôles auront un placebo en collyre (groupe contrôle 1) et de la dexaméthasone en collyre, 3 fois par jour (groupe contrôle 2). Au total, 10 lapins receveurs seront inclus dans ce projet.

En complément de son intérêt préclinique, cette étude permettra également de créer un modèle animal facile à entretenir dans le laboratoire pour toutes les études sur les développements de nouvelles techniques de greffe de cornée et de greffons in vitro. Il n'existe en effet pas de modèle animal satisfaisant pour la greffe de cornée en dehors de certains singes, du chat et du porc. Le bioengineering de greffons lamellaires endothéliaux est actuellement dans une phase de grand développement et le besoin d'un modèle animal facile à utiliser pour tester ces nouveaux greffons devient urgent. Cette étude devrait donc nous permettre de créer un modèle animal facile à entretenir dans une animalerie standard et moins sensible sur le plan éthique que les modèles chat et singe.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérés grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant

/anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés dans des cages adaptées avec paroi transparente pour interagir avec ses congénères; dans un environnement enrichi (jeux kong, plateforme de repos, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

3358. Le virus Ebola a été initialement identifié en 1976 dans le Nord de la République Démocratique du Congo (ex Zaïre), au cours d'une épidémie de fièvre dont personne ne connaissait la cause. Un taux de mortalité de 88% (280 personnes décédées) était l'un des plus élevés pour une maladie d'origine virale. Depuis cette première épidémie, plus d'une trentaine ont été recensées en Afrique totalisant environ 2500 cas jusqu'à 2013. L'année 2014 a été marquée par l'apparition d'une épidémie à virus Ebola sans précédent faisant plus de 11 000 victimes. Les virus Ebola sont des virus hautement pathogènes classés de niveau 4. Ils sont responsables pour la plupart, de fièvres hémorragiques virales (FHV) le plus souvent fatales chez les primates humains et non humains, lors d'une transmission par contact avec les fluides biologiques. Le but de cette étude est de mieux comprendre les mécanismes précis de la maladie à virus Ebola en étudiant le rôle d'une protéine du virus, la shedGP. Pour cela les tissus des animaux infectés par ce virus seront étudiés par des techniques de microscopie afin de mieux comprendre le fonctionnement de ce virus. Au préalable de cette expérience, une grande étude in vitro a été menée afin de remplacer au maximum l'expérimentation in vivo par de l'expérimentation in vitro (Remplacer). Afin de confirmer les données in vitro, nous utiliserons 30 cochons d'Inde dans cette étude car ces animaux constituent un bon modèle pour l'infection à virus Ebola et ont par le passé été très étudiés par notre équipe. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous n'utiliserons que 3 animaux par temps et par groupe ce qui nous permettra d'obtenir une réponse qualitative complète à nos questions (Réduire). Un enrichissement de l'environnement (nourriture spécifique, litières différentes, jeux) sera réalisé afin d'augmenter le bien-être animal (Raffiner). Ainsi une attention toute particulière est amenée à appliquer la règle des 3R (Réduire, Remplacer, Raffiner) dans ce protocole.

3359. Le virus Ebola est responsable chez l'homme d'une maladie très grave, hautement contagieuse, avec un taux de mortalité moyen de 50%, pouvant aller jusqu'à plus de 80% dans la récente épidémie qui a frappé l'Afrique de l'Ouest. Le développement de vaccins et de traitements repose sur la possibilité de tester leur efficacité sur un organisme entier. Des essais ont été menés directement chez l'homme lors de l'épidémie mais ces recherches doivent se poursuivre en l'absence de cas humains en préparation de crises futures.

La recherche sur la maladie à virus Ebola a eu beaucoup recours aux primates non humains chez lesquels il est possible de reproduire les symptômes des formes graves humaines. Cependant, ces recherches posent des problèmes éthiques évidents et il serait préférable de pouvoir utiliser des rongeurs. Jusqu'à présent, la souris n'était pas reconnue comme un modèle satisfaisant car les symptômes qu'elle développe sont différents de ceux de l'homme. Toutefois, une étude publiée fin 2014 a montré que des lignées de souris génétiquement très différentes répondaient très différemment à une même infection par le virus Ebola, certaines mimant les formes graves de la maladie humaine. Cette observation ouvre deux perspectives majeures : remplacer les primates non humains par des petits rongeurs pour le développement de traitements et de vaccins, et étudier les mécanismes qui contrôlent ces différences de sensibilité.

Dans ce projet, nous allons tester plusieurs lignées de souris pour valider ces différences et pouvoir choisir le meilleur modèle murin pour tester ensuite l'efficacité de traitements et de vaccins. Des petits groupes de souris de ces lignées seront infectées dans des conditions standardisées. Plusieurs prélèvements seront réalisés pour suivre l'évolution de l'infection. L'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement pour interrompre la procédure sitôt que l'animal développera atteindra les points limites de la procédure. Les effectifs des groupes ont été calculés au plus juste tout en permettant de mettre en évidence les différences attendues. Au total, 80 souris seront utilisées au cours d'une procédure. Afin de raffiner l'expérimentation, une attention particulière sera portée sur l'enrichissement de confort (nids coton) et sur l'enrichissement de stimulation (abri en carton).

Pour des raisons de sécurité et de bien-être des animaux, tous les gestes (inoculation, prélèvements) seront réalisés sous anesthésie générale.

3360. La douleur occupe une place importante dans notre société, impactant à la fois sur la productivité et le coût de la santé. A l'heure actuelle, dans le cas de douleurs aiguës ou chroniques sévères, il n'existe aucun traitement thérapeutique autre que l'utilisation des opiacés. De fait, la seule alternative à la tolérance analgésique reste la rotation des molécules opiacées en milieu clinique. Le développement de nouvelles molécules analgésiques est donc un challenge extrêmement important. Récemment, un fragment d'une protéine essentielle du métabolisme énergétique a été caractérisé comme possédant une forte activité analgésique. Notre objectif est de déterminer si l'activité analgésique du fragment de cette protéine représente une alternative à l'utilisation de la morphine en testant son activité sur des modèles de souris ayant des douleurs chroniques (neuropathie mimant une sciatique) ou ayant des douleurs aiguës (injection intraplantaire d'une substance irritante).

Le but de cette étude est (1) de caractériser le mode d'action du fragment, (2) de déterminer le plus petit peptide dérivé ce fragment possédant une activité analgésique et (3) de définir l'effet du fragment d'intérêt sur la physiologie. Le but de ce projet est de développer, à terme, une nouvelle molécule analgésique palliant la morphine. Un nombre minimum d'animaux à tester de 378 a été établi et se base sur les approches nécessaires au projet qui implique un nombre important d'animaux contrôles.

Afin de respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer), un total de 378 souris mâles sera utilisé lors de ces études : ce nombre correspond au nombre minimal d'animaux par groupe (soit 8) permettant de valider les données connues et de valider notre preuve de concept en incluant les contrôles (Injection de salin) et en identifiant à la fois la cinétique de l'analgésie, les doses efficaces, la toxicité potentielle et le mode d'action des peptides d'intérêts.

Concernant le bien être des animaux, l'administration des peptides induit une analgésie au bout de 3h et cette analgésie perdure au moins 3h. Concernant les voies d'administration, les injections I.P. sont considérées comme peu douloureuses. Des tests de sensibilité mécanique (Filaments de Von Frey) seront utilisés pour déterminer si les animaux ont développé une analgésie suite à l'administration des peptides. Ils correspondent aux tests utilisés dans la majorité des articles évaluant la nociception

3361. La création d'abords vasculaires pour l'hémodialyse par implantation d'une prothèse, en alternative aux fistules artério-veineuses, reste une gageure. La solution utilisée en clinique repose sur des matériaux synthétiques non résorbables posant de nombreux problèmes (infections, thrombose). L'alternative serait d'implanter un substitut vasculaire (SV) acellulaire colonisable et remodelable par les cellules de l'hôte.

Un tel biomatériau sera optimisé pour recruter les cellules du patient à travers la paroi du SV pour reconstituer la structure normale d'un vaisseau capable de résister aux ponctions répétées.

L'un des axes de ce projet repose sur l'expérimentation animale : des études sur le rongeur (100 rats) seront nécessaires pour valider la conception du biomatériau doté de propriétés recrutrices de cellules de l'hôte. Les matériaux seront implantés dans la paroi abdominale des rats et explantés entre 1 et 6 semaines après l'implantation, avec sacrifice des animaux. Une analgésie adaptée et un suivi des animaux permettront de réduire la douleur et l'anxiété : surveillés quotidiennement pendant la semaine post-opératoire puis de façon hebdomadaire, les rats seront suivis pour la cicatrisation des plaies, par pesée, par observation du poil et des expressions faciales et absence de blessures. Pour limiter l'anxiété, les animaux, gardés en groupe de six dans un environnement enrichi (nid), seront acclimatés une semaine avant la chirurgie. Pendant la chirurgie, une cage après l'autre sera amenée en salle de chirurgie de l'animalerie pour diminuer les sources de stress (contact visuel, olfactif et sonore des animaux opérés). Après la chirurgie, chaque rat se réveillera dans une cage à part avant de réintégrer sa cage d'origine. Une fois les six animaux d'une cage opérés, la cage sera ramenée en stabulation.

Ce projet sera le prélude à des études futures visant à développer des pontages d'hémodialyse implantables chez le gros animal, puis sur l'humain.

3362. Le foie est un organe support de nombreuses infections, telles que les virus de l'hépatite C (VHC), de l'hépatite B (VHB), hépatite D (VHD) ou encore le parasite plasmodium falciparum responsable du paludisme. Les virus VHC, VHB, HVB demeurent un problème majeur de santé publique avec plus de 170 ,300 et 20 millions de porteurs dans le monde respectivement. Malgré l'existence d'un vaccin efficace contre le VHB, le nombre de patients infectés est considérable et les traitements actuels ne permettent pas de guérir définitivement de l'infection. Dans le cas du VHC, il n'existe pas de vaccin et malgré l'apparition de nouvelles molécules thérapeutiques permettant de réduire considérablement les charges virales et la gravité de la maladie, il reste très difficile d'éradiquer le virus, y compris suite à une greffe de foie lors des stades chroniques de la maladie. Les études dans les modèles in vitro d'infection par les virus hépatotropes notamment sont limitées : en effet les modèles cellulaires ne prennent pas en compte la complexité du cycle viral, la régulation du métabolisme énergétique et des voies métaboliques, l'architecture hépatique ou encore les composantes immunitaires.

Dans ce contexte, le modèle de souris humanisées pour le foie et infectées par ces virus est à ce jour, en dehors des primates, le modèle animal le plus pertinent pour cette étude.

Ces souris combinent une immunodéficience (absence de système immunitaire (SI) pour permettre une xénogreffe) et une pathologie hépatique ce qui permet de remplacer le foie des animaux par des cellules hépatique humaines. Ce modèle humanisé pour le foie est utilisé avec succès en recherche fondamentale sur les VHC et VHB mais aussi pour des tests de molécules thérapeutiques. Cependant, il n'est pas possible d'étudier la composante immunitaire dans ces infections dans les souris humanisées pour le foie, qui n'ont pas de système immunitaire.

L'objectif de ce projet est donc la mise en place de souris double humanisées pour le foie et le système hématopoïétique afin d'étudier la physiopathologie et les réponses immunes dirigées contre ces 2 pathogènes. L'utilisation de ce modèle une fois établie pourra être élargie à des études immunologiques ou métaboliques.

Au maximum, ce projet nécessite l'utilisation de 1810 souris sur une durée de 5 ans.

Ce projet consiste à mettre au point un modèle expérimental complexe et a été découpé en 4 procédures expérimentales en comparant plusieurs sources de cellules afin de travailler en système autologues (les cellules utilisées pour humaniser le foie et le SI seraient issues du même donneur).

Le nombre maximal d'animaux a été calculé sur l'hypothèse que les différentes sources de cellules (qui nécessitent des conditionnements et / un site d'injection différents) devront être comparées pour chaque question scientifique (si les sources cellulaires ne peuvent pas être discriminées plus tôt dans le développement du modèle).

Pour chacune des procédures, le nombre d'animaux a été réduit au nécessaire pour obtenir des résultats significatifs ($p < 0,05$, Mann & Whitney, Wilcoxon).

Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par un personnel compétent permet de limiter au maximum toute souffrance animale.

3363. Le virus de l'hépatite B (VHB) demeure un problème de santé publique majeur avec plus de 300 millions de porteurs chroniques dans le monde. Les traitements actuels ciblent efficacement l'enzyme polymérase du virus, permettant de contrôler sa réplication tant que le traitement est présent. Cependant ils ne permettent pas à ce jour d'inhiber la production des protéines virales qui exercent toujours leurs effets délétères, ni d'éradiquer le virus chez les patients infectés.

L'hépatite delta est la forme la moins fréquente des hépatites virales chroniques mais une des plus sévères. Le pathogène responsable est le virus de l'hépatite D (HDV), un virus défectif qui nécessite la présence simultanée d'une infection par le virus de l'hépatite B (HBV) pour

sa propagation. Même si la prévalence du HDV avait diminué dans les pays occidentaux au début des années 1990, suite à l'introduction de la vaccination contre le HBV et à d'autres mesures de prévention, on observe depuis plusieurs années une recrudescence des hépatites liées au HDV.

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

Il existe deux types d'infection par HDV: 1) la co-infection, au cours de laquelle le HBV et le

HDV sont transmis conjointement, et 2) la surinfection, lorsqu'un porteur du HBV est infecté par le HDV. Dans les deux cas, l'hépatite aiguë peut évoluer de manière sévère, voire fulminante. Si l'élimination spontanée des deux virus est la règle chez l'adulte après co-infection HBV-HDV, la surinfection HDV évolue en infection chronique dans environ 90% des cas. Puisque c'est le HDV qui domine habituellement dans cette situation, on parle d'une hépatite D chronique qui est souvent associée à une progression fréquente et rapide vers la cirrhose hépatique et un risque accru de développement de carcinome hépatocellulaire (CHC). Il n'est donc pas rare de trouver une cirrhose hépatique, voire un CHC, chez des patients âgés de 20-30 ans qui ont été infectés durant la petite enfance. Il existe néanmoins des patients dont l'évolution est plus favorable.

Les options thérapeutiques pour l'hépatite D chronique restent malheureusement limitées et des aspects importants de la virologie moléculaire, de la pathogenèse et de l'histoire naturelle de ce virus sont encore inconnus. Les études dans les modèles in vitro d'infection par HBV et HDV de lignées d'hépatocarcinome ou d'hépatocytes en culture primaires sont limitées et ne permettent pas de valider les molécules antivirales candidates en termes de métabolisme et pharmacologie, ni de caractériser et comprendre les infections / pathogenèse dans un contexte plus élaboré faisant intervenir des paramètres indispensables tels que la structure de l'organe foie, le métabolisme, le système immunitaire entre autres.

Le seul modèle animal infectable par le VHB et/ou VHD est le chimpanzé mais son utilisation est désormais proscrite pour des raisons éthiques. Le modèle murin humanisé représente une bonne alternative. Pour ces études, nous utiliserons un modèle murin immunocompétent non humanisé dans lequel les génomes viraux sont exprimés, permettant ainsi de reproduire des hépatites chroniques et de mimer la phase de portage chronique immunotolérant/non-inflammatoire qui est décrite chez les patients infectés par le VHB notamment.

Ce projet est donc déposé au titre d'une plateforme de souris humanisées, qui permettra à différentes équipes collaborateurs / partenaires de bénéficier de ce modèle d'étude in vivo.

Le nombre d'animaux utilisés par groupe expérimental dans chaque projet suivra l'esprit de la règle des 3R (réduction, raffinement, remplacement). Ainsi, le nombre de souris utilisé dans les protocoles a été optimisé afin d'obtenir des résultats statistiquement valables tout en minimisant leur nombre. Tout au long des expériences, nous veillerons au bien être des animaux et à réduire au maximum la souffrance ou l'anxiété des souris (définition précise des points limites, administration de médicaments pour supprimer la douleur si nécessaire, choix des méthodes d'injections les moins invasives etc...). Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est de 1525 souris. Ce projet couvrira les besoins expérimentaux d'au moins 3 équipes travaillant actuellement sur différents aspects des co-infections HBV/HDV, histoire naturelle, virologie fondamentale, réponse immune et test de molécules thérapeutiques

3364. Le cancer est une pathologie en très forte progression, tant par son incidence, sa mortalité que les coûts associés. L'OMS estime ainsi que la mortalité liée au cancer devrait augmenter de 51% entre 2002 et 2030, avec environ 11,5 millions de décès liés à cette pathologie en 2030 dans le monde. En parallèle, les traitements en oncologie restent encore trop inefficaces, avec un taux de réponse moyen d'environ 20%, et évoluent vers le ciblage de plus en plus spécifique des thérapies, avec un rapport efficacité/effets secondaires bien plus bénéfique pour les patients.

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

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

Il est désormais communément admis que les modèles de xénotransgreffe dérivés de tumeurs de patients, sans manipulation in vitro, sur des animaux immunodéficients reflètent mieux la biologie tumorale humaine que les tumeurs obtenues à partir de lignées cellulaires. L'établissement de ce type de modèles tumoraux offre la possibilité de représenter la diversité génétique des tumeurs et notamment des tumeurs qui ne répondent pas aux thérapies de référence. L'ensemble des échantillons tumoraux cliniques collectés seront amplifiés en souris immunodéficientes, puis centralisés dans une biobanque, pour être ensuite caractérisés, par nos collaborateurs, via des analyses moléculaires (génomique, transcriptomique, protéomique),

histologiques, biologiques et pharmacologiques. Plusieurs souches de souris, présentant des immunodéficiences plus ou moins importantes seront utilisées, ainsi que plusieurs types de greffe, dans le but de développer le modèle le plus approprié, pour caractériser les tumeurs des patients, et pour valider des traitements. Il semble que le microenvironnement est un impact non négligeable sur les prises de greffes tumorales, nous travaillerons donc sur des animaux préalablement humanisés, dits chimériques.

Le nombre de souris utilisé dans les protocoles a été optimisé afin d'obtenir des résultats valables tout en minimisant leur nombre et afin de respecter les 3R. Tout au long des expériences, nous veillerons au bien être des animaux et à réduire au maximum la souffrance ou l'angoisse des souris (définition précise des points limites, administration de médicaments pour supprimer la douleur si nécessaire, choix des méthodes d'injections les moins invasives etc...).

Ce projet a pour objectif de développer des modèles de cancers prédictifs innovants et hautement caractérisés et de faciliter la mise en place d'une médecine personnalisée en accélérant l'innovation thérapeutique et l'identification de thérapies anticancéreuses efficaces, avec un transfert rapide vers la clinique, au bénéfice direct des patients.

Le nombre d'animaux estimé pour ce projet est de 3986 sur une durée de 5 ans.

3365. L'efficacité de la chimiothérapie anticancéreuse repose sur sa capacité à induire la mort des cellules tumorales selon 2 modes d'actions : 1) directement, par toxicité de l'agent chimiothérapeutique au sein de la cellule tumorale et 2) indirectement, par induction d'une réponse immunitaire antitumorale. Notre équipe a récemment montré chez la souris que l'efficacité de la chimiothérapie anticancéreuse pouvait être améliorée en réduisant l'apport calorique des animaux avant d'initier le traitement antitumoral. Cette restriction calorique consistait soit en une période de jeûne de 48h soit à administrer des composés mimant la restriction calorique.

Notre laboratoire a pu identifier différentes molécules capables de mimer certains aspects métaboliques et biochimiques du jeûne (appelées CRMs pour "caloric restriction mimetics"). Le but de ce projet est d'étudier le rôle des lymphocytes T régulateurs (ou Tregs) dans l'apport bénéfique des CRMs aux chimiothérapies anticancéreuses. Les Tregs sont des cellules impliquées dans la tolérance immunitaire et immunosuppressives au sein des tumeurs.

Pour répondre à cette question, des animaux sont indispensables car il n'est pas possible d'étudier l'impact du système immunitaire sur la croissance tumorale dans des systèmes in vitro. Dans ce but, nous projetons d'utiliser au cours des 5 années à venir un maximum de 3960 souris (génétiquement modifiées ou non) dans lesquelles on peut induire la mort spécifique des Tregs. Des expériences de croissance tumorale seront réalisées dans ces deux groupes de souris afin de comparer l'impact des Tregs au cours de différents traitements anticancéreux. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si l'expérience initiale invalide l'hypothèse de travail. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les animaux bénéficient d'un milieu enrichi. Les animaux sont observés quotidiennement afin de surveiller leur bien-être. Dans le but d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au moment de l'expérimentation, l'anesthésie des animaux et la mise en place d'une grille de suivi strict pour application des points limites seront mis en place. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation redondante.

3366. Il est admis que l'hypertension artérielle (HTA) est un facteur de risque majeur de démences. C'est probablement une modification du fonctionnement ou de la morphologie du système vasculaire cérébral qui produit un dysfonctionnement du couplage neurovasculaire et donc une mauvaise alimentation neuronale. Nous avons montré que les changements gravitaires affectent le fonctionnement vasculaire cérébral : le changement gravitaire provoque une modification fonctionnelle et peut être des modifications structurales. La question qui reste posée est la suivante : ces modifications sont-elles en mesure de provoquer une modification des performances mnésiques ? La mémoire est un processus très complexe qui peut s'illustrer comme un processus comprenant trois phases l'apprentissage, la consolidation du souvenir et sa restitution ou son utilisation pour réaliser une sortie comportementale. Ainsi, si les changements gravitaires sont en mesure d'altérer la mémoire quelle sera la phase atteinte ? Lors de l'année 2015, nous avons pu mettre en place une première expérience et placer des rats en hypergravité, à 2G couplée à un test de mesure de performance mnésique par le test de transmission sociale de préférence alimentaire.

Cette expérience, nous a permis de définir la séquence expérimentale en mesure de donner un résultat scientifiquement exploitable. Nous souhaitons maintenant conduire les expériences nécessaires à montrer si un séjour en hypergravité pourrait modifier l'apprentissage et/ou la consolidation du souvenir. Les animaux placés en hypergravité présentent des troubles locomoteurs et de l'équilibre qui sont des biais importants pour tout type d'apprentissage spatial en labyrinthe, ou de transmission sociale de préférence alimentaire, basé sur des études éthologiques et utilisant un comportement inné, qui permet d'apprécier la persistance d'une mémoire olfactive associative. Ce test est parfaitement adapté au protocole car (1) l'animal ne subira aucune autre action qu'une présentation de nourriture dont le parfum sera modifié par ajout d'un composé alimentaire à des concentrations sans danger pour l'animal et (2) il permet de réduire le nombre d'animaux dans un test, répondant ainsi partiellement à la règle des 3R (ici réduire et raffiner). Les animaux pourront subir un léger stress, il y a donc une nécessité de faire un prélèvement de sang, consistant en l'évaluation longitudinale de la concentration sanguine de corticostérone libre par dosage plasmatique avant et après le protocole hypergravitaire. Ceci afin d'évaluer le niveau de stress

qui est très variable d'un individu à l'autre et qui peut influencer la qualité de l'interaction sociale et donc le résultat du test. Une mesure longitudinale permettra de réduire le nombre d'animaux, chaque individu étant son propre contrôle (la modification du taux plasmatique de corticostérone représentant une augmentation ou une baisse du stress de l'animal dû à la centrifugation). Ce protocole sera accompagné d'un traitement antiseptique de la zone de prélèvement. L'analyse a posteriori de la prise de poids de l'animal, des dosages d'hormone de stress permettront de définir le niveau de stress subi par les rats lors de leur séjour en hypergravité, seul susceptible d'affecter la qualité de vie des animaux (Raffinement maximal).

La capacité du plateau d'hypergravité est de 12 rats et chaque série d'expérience comprendra au maximum 24 rats : 12 rats contrôles (1G), 12 rats en hypergravité (2G). Nous avons décidé de procéder à deux séries d'expériences successives par ans et cela sur 3 ans, de façon à réduire le nombre de rats démonstrateurs (au nombre de 12) ceux-ci pouvant servir pour plusieurs expériences et ne faisant pas l'objet d'une demande d'autorisation de projet. De ce fait nous aurons besoin de 144 rats au total (2 séries*24 rats)*3ans). Le protocole fera l'objet de réévaluations constantes pour réduire le nombre d'animaux.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur et le stress sont rigoureusement contrôlés grâce à des points limites évalués en amont et gérés grâce aux moyens pharmacologiques appropriés à l'espèce et au projet expérimental. Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition en quantité suffisante (dose établie selon les besoins physiologiques de l'animal par jour) et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

3367. Récemment, de nombreux travaux ont précisé les mécanismes intimes conduisant à la réparation normale d'une plaie cutanée. Les différentes étapes (coagulation et inflammation, développement d'un tissu de granulation, encore appelé tissu de bourgeonnement, formation de la cicatrice) ont été mieux définies dans des conditions physiologiques. Cependant, la cicatrisation peut être gênée par la taille de la plaie, la présence d'un corps étranger, ou encore par une infection. Les plaies et les retards de cicatrisation sont un problème de santé publique qui s'accroît avec le vieillissement de la population et le développement des maladies métaboliques.

Plusieurs études ont montré l'implication de certaines petites molécules (cytokines) telles que l'interleukine 17 (IL-17), l'interleukine 22 (IL-22) ou encore l'oncostatine M, ou l'IL-1, dans la physiopathologie de l'inflammation cutanée chronique telle que le psoriasis qui se distingue de l'inflammation cutanée aiguë rencontrée au cours de la cicatrisation cutanée. L'analyse des effecteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans ces deux types de réactions inflammatoires constitue une voie de recherche fondamentale importante pour comprendre les mécanismes de régulation mis en jeu dans le but d'améliorer la prise en charge de patients atteints de pathologies cutanées chroniques ou aiguës.

Notre étude vise à déterminer le rôle joué par ces petites molécules dans un contexte de plaies infectées par différents pathogènes. Nos travaux précédents ont montré que ces cytokines, et en particulier deux d'entre elles, l'IL-17 et l'IL-22, pouvaient être à l'origine d'un retard de cicatrisation lorsque la plaie était infectée par deux bactéries particulièrement présentes sur la peau et dans l'environnement. Notre projet vise dans un premier temps à mettre en évidence le rôle de ces petites molécules vis à vis des bactéries qui peuvent coloniser une plaie et de déterminer les acteurs cellulaires responsables de la production de ces molécules. L'utilisation de souris transgéniques dépourvues d'expression d'une cytokine en particulier permettra de discriminer le rôle de chacune de ces molécules au cours de la réparation tissulaire en condition septique. Ces travaux pourraient à terme aider à la prise en charge des patients présentant des plaies infectées à l'aide de biothérapie en complément des traitements visant à éradiquer l'infection.

Un total de 532 souris au maximum sera nécessaire pour mener à bien ce projet. La règle des 3R a été prise en considération. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude interprétable sur le plan statistique. Si des expériences sont réalisées sur des modèles de peau reconstituée à partir de cellules issues de la peau humaine, il n'est pas encore possible de reconstituer une peau artificielle intégrant tous les acteurs cellulaires et moléculaires présents in vivo et donc de remplacer cette étude par des expériences in vitro. Enfin, la notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentations qui sont optimisées (sédation et analgésie pour toute manipulation douloureuse ou stressante) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales.

3368. Les maladies du retard mental sont parmi les maladies les plus souvent rencontrées dans les services de génétique médicale, et représentent 5 à 10% des coûts de santé publique. Pourtant, peu de choses sont encore connues sur les causes génétiques impliquées dans ces maladies. Un des objectifs principaux de nos études est d'identifier de nouveaux gènes associés au retard mental, en utilisant la souris comme modèle animal. Ainsi, nous analysons l'impact des 20000 gènes du génome de la souris sur la morphologie cérébrale en utilisant 78 paramètres quantitatifs, de façon systématique et non biaisée. Nous nous impliquons également dans l'étude génétique du syndrome 16p11.2, qui est le syndrome le plus fréquemment rencontré chez les patients avec de l'autisme et se caractérise par des troubles du retard mental et par des malformations cérébrales comme la macrocéphalie (augmentation du volume cérébrale). Aussi, les personnes atteintes de maladies du retard mental, par exemple le syndrome 16p11.2, région du génome où se trouvent nombreux des gènes que nous étudions, présentent fréquemment des troubles du métabolisme qui peuvent entraîner de l'obésité ou du diabète. En parallèle à ces approches génétiques à haut débit, nous développons des approches complémentaires, principalement axées sur la compréhension biologique des malformations cérébrales. Nous étudions plusieurs gènes (10 gènes au total) avec, pour objectif, de déterminer leur fonction précise dans le développement du cerveau, ainsi que les conséquences de leur inactivation sur le comportement de l'organisme entier. Aucun phénotype dommageable n'est attendu.

Ainsi, nous avons deux sous-objectifs principaux, le premier consiste à identifier des gènes impliqués dans le retard mental et pouvant être associés à l'obésité, le deuxième à étudier leur fonction précise dans le système nerveux central. Le premier objectif s'insère dans le cadre d'un programme plus large, l'International Mouse Phenotyping Consortium. Les partenaires de ce Consortium nous fournissent des échantillons de cerveaux de souris génétiquement modifiés afin d'étudier l'effet de l'inactivation d'un gène sur la morphologie cérébrale. Le deuxième objectif est atteint en analysant l'effet de l'inactivation de gène d'intérêt sur le comportement et l'homéostasie métabolique.

L'étude génétique et physiopathologique des maladies du retard mental ne peut être réalisée que sur animaux vivants. En effet, il est nécessaire d'évaluer l'effet de l'inactivation du gène d'intérêt sur le comportement de l'animale entier afin d'en déduire si celui-ci est responsable de troubles cognitifs ou pas. De même, il est nécessaire d'étudier la morphologie des neurones en utilisant des cultures primaires neuronales car aucun autre modèle de lignée cellulaire fiable permettant cette étude n'existe. Pour ces raisons, le REMPLACEMENT par d'autres modèles nous est impossible. Le nombre d'animaux sera REDUIT au minimum pour atteindre un pouvoir de détection statistique de 80% entre différents groupes d'animaux. Et enfin, toutes les précautions possibles seront prises pour RAFFINER nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux en les habituer aux tests et en utiliser anesthésique et antalgique.

Pour atteindre notre objectif scientifique, l'expérimentation animale in vivo sera utilisée sur un maximum de 900 souris pendant une période de 5 années (nous anticipons l'étude de 13 lignées avec en moyenne 3 groupes de 15 animaux pour l'étude comportementale et 3 groupes de 10 animaux pour l'étude du métabolisme pour chaque gène étudié).

3369. La maladie de parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative chronique en nombre de patients atteints. Le développement de différentes thérapeutiques symptomatiques et chirurgicales ont permis d'améliorer nettement la qualité de vie des patients, mais il existe toujours un manque de thérapeutiques capables de ralentir le développement de la maladie. Ce projet est destiné à mettre en œuvre des modèles animaux mimant les lésions de la maladie de Parkinson, afin d'évaluer les traitements médicamenteux innovants issus de la recherche et d'identifier des biomarqueurs qui pourront être utilisés lors des essais cliniques. Ces modèles sont basés sur l'utilisation d'une molécule neurotoxique (le MPTP) qui induit une lésion spécifique des voies neuronales touchées dans la maladie de Parkinson, chez l'homme comme chez l'animal. Les rongeurs sont les espèces les plus couramment utilisées dans le domaine des maladies neurodégénératives. Ces espèces présentent l'avantage de fournir des souches stables et bien caractérisées ce qui permet une bonne reproductibilité des modèles et donc une optimisation du nombre d'animaux à inclure dans les études. Ce projet est développé exclusivement chez les souris, le rat étant moins sensible au MPTP du fait d'un métabolisme différent.

Ces modèles concernent des études soit de courte ou moyenne durée, soit de longue durée (plusieurs semaines). Dans le premier cas il s'agira de modéliser des mécanismes physiopathologiques précis impliqués dans la maladie de Parkinson afin de valider les cibles biologiques travaillées. Dans le second cas, il s'agira d'induire un développement progressif des phénomènes de neurodégénérescence afin de s'approcher au plus près du décours temporel de la maladie de Parkinson, pour étudier le potentiel thérapeutique de molécules ou d'agents biologiques. Dans ces différents modèles seront évalués des biomarqueurs en lien avec les manifestations cliniques de la maladie de Parkinson (motricité, coordination motrice, sensibilité ...), des biomarqueurs biochimiques (dans le sang ou le liquide céphalo-rachidien), et des biomarqueurs cérébraux (biochimiques et histologiques).

Notre établissement s'attache à réduire au maximum l'usage des animaux dans le développement de nouvelles thérapeutiques. Ainsi les candidats-médicaments ne sont évalués dans ce type de modèles qu'après un tri important via des méthodes de biochimie et biologie cellulaire in vitro, permettant de retenir les quelques candidats les plus prometteurs, qui présentent le meilleur index thérapeutique vitro (rapport/activité/profil précoce ADME/toxicité potentielle). De plus ces modèles inclus à la fois des tests comportementaux et des mesures de paramètres biochimiques. Cela permet d'évaluer différents paramètres en parallèle réduisant ainsi le nombre d'études et permettant de corréliser ces différents marqueurs cliniques et biologiques. Ces informations sont nécessaires et indispensables pour la mise en œuvre des futurs essais cliniques de façon pertinente et sûre. Le cerveau est constitué de plusieurs types cellulaires différents qui interagissent pour la mise en œuvre des processus physiologiques mais aussi neurodégénératifs. Il présente de plus la particularité d'avoir une grande capacité de plasticité et d'être très dépendant de sa vascularisation. Cette dynamique du fonctionnement physiopathologique du cerveau et sa traduction en capacités mnésiques, associatives et motrices ainsi que le lien avec des biomarqueurs centraux et périphériques ne peuvent être évalué que par les études chez l'animal. A la demande du scientifique, un support du service biostatistiques sera apporté aux expérimentateurs pour l'élaboration du design expérimental, pour optimiser le nombre d'animaux utilisés dans les études et pour effectuer ou revoir les analyses statistiques.

Nous nous attachons à améliorer les conditions des études en optimisant les conditions d'hébergement (en particulier par l'enrichissement adapté aux besoins des rongeurs), en réduisant les contraintes de traitement par incorporation des produits dans la nourriture ou l'eau de boisson pour les études chroniques, quand cela est possible, en privilégiant les modèles transgéniques à phénotype non-dommageable, en utilisant les anesthésiques et analgésiques les mieux appropriés en cas de chirurgie pour préserver la validité du modèle tout en réduisant les douleurs liées aux incision de la peau. Pour l'ensemble des procédures des points limites généraux et spécifiques sont identifiés. Cela permet au personnel en charge des expérimentations et des soins aux animaux (formé à l'observation des signes cliniques) d'identifier rapidement toute manifestation inattendue et de prendre les mesures nécessaires dans l'intérêt de l'animal.

Ces études sont conçues et mises en œuvre par des personnels experts scientifiques formés spécifiquement à l'observation des animaux, et en lien constant avec les personnels de soins aux animaux, et les vétérinaires de l'établissement. Ces

procédures sont discutées et approuvées par le comité d'éthique avant leur mise en œuvre, et celle-ci se fait en lien avec la structure chargée du bien-être de l'animal, afin de permettre une amélioration constante des conditions de recours à l'animal. Le nombre maximal d'animaux utilisés dans le cadre de ces modèles est estimé à 1000 souris par an.

3370. Le cancer est une maladie qui touche l'ensemble de la population et qui est encore aujourd'hui un véritable fléau pour la société. En particulier, le médulloblastome est la tumeur cérébrale maligne la plus commune en pédiatrie qui se développe à partir des cellules du lignage granulaire du cortex du cervelet, partie du cerveau située à sa base et en arrière du tronc cérébral. Le taux de survie à 5 ans est de moins de 70%. Les traitements existants sont la chirurgie, la radiothérapie ainsi que la chimiothérapie, qui laissent d'importantes séquelles neuropsychologiques et cognitives aux jeunes patients. Notre équipe de recherche s'intéresse tout particulièrement à l'étude du rôle des signaux induits par les hormones peptidiques dans la progression tumorale, afin d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les objectifs du projet consistent, grâce à un modèle génétique de médulloblastome mimant la maladie humaine, à déterminer l'importance de ces signaux moléculaires dans son développement, et à caractériser précisément les étapes moléculaires qui pourraient représenter de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Il n'existe pas de modèle *in vitro* capable de remplacer ce modèle animal.

Le nombre d'animaux prévu pour ce projet (400) sur une durée de 5 ans, est le minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs compte tenu de l'incidence (15%) des tumeurs dans ce modèle génétique de médulloblastome. Des croisements génétiques permettant d'altérer la signalisation TGF- β dans ce modèle seront réalisées. Dès que les souris développent une tumeur, elles sont sacrifiées et les tumeurs utilisées pour des analyses moléculaires et cellulaires, qui permettront de comprendre les conséquences de ces altérations, sans que les souris aient subi aucune procédure chirurgicale ou autre durant leur vie.

En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux.

En conclusion, notre travail pourra apporter une avancée conséquente dans le domaine de la cancérologie tout en veillant à minimiser au maximum la souffrance des animaux.

3371. Une perturbation de la balance entre excitation (neurones glutamatergiques) et inhibition (neurones GABAergiques) dans le cerveau est à l'origine de maladies neurodéveloppementales associées à un retard mental comme le syndrome de Down (SD), mais aussi à l'apparition de maladies neurologiques telles que la schizophrénie et l'épilepsie.

Le gène *Dyrk1a* présent sur le chromosome 21 (en 3 copies dans le SD) est un bon candidat pour ces défauts: sa présence en trois copies entraîne chez les souris les mêmes déficits neurologiques que chez les personnes trisomiques. De plus, la perte de fonction de *Dyrk1a* entraîne un syndrome, appelé MRD7, de retard mental sévère associé à une diminution de la taille du cerveau, de l'épilepsie et des comportements autistiques.

Nous proposons d'analyser le rôle de *Dyrk1a* dans les neurones GABAergiques afin de comprendre l'impact de cette molécule sur les déficits neurologiques observés dans le SD et le MRD7. Pour ce projet, nous utiliserons le modèle souris car ces effets ne peuvent être observés que sur un organisme vivant proche de l'être humain.

Pour cette étude, nous utiliserons les modèles suivants :

-Ts1Yey, trisomique (modèle SD)

-Ts1Yey;*Dyrk1a*Dlx6aCre/+ dans lequel une copie du gène *Dyrk1a* a été inactivée dans les neurones GABAergiques, permettant le retour à deux copies de *Dyrk1a* dans ces neurones (sauvetage des déficits cognitifs observés dans le SD)

-*Dyrk1a*Dlx6aCre/+: perte d'une copie du gène *Dyrk1a* dans les neurones GABAergiques (modèle MRD7)

Une série de 5 tests de comportement portant sur les phénotypes observés dans le SD et le MRD7 (hyperactivité, mémoire, sociabilité) peu voire non-invasifs seront réalisés espacés d'environ une semaine en allant du moins au plus stressant, le premier test commençant à l'âge de 12-13 semaines. L'ensemble des tests comportementaux n'entraîne pas de stress ou souffrance sévère pour l'animal et les animaux feront l'objet d'un suivi permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur santé. Les animaux présentant des signes de douleur seront euthanasiés car inaptes à une étude comportementale. Un test de susceptibilité à l'épilepsie sera effectué par injection d'une faible dose de l'agent pro-convulsivant pentylènetétrazole (PTZ) à la fin des tests comportementaux. Les animaux seront euthanasiés directement à la fin de ce protocole. Ces expériences nécessiteront 120 souris au maximum, entre 10 et 15 individus par génotype (3 génotypes cités plus les contrôles) et par sexe (mâles et femelles) étant requis pour obtenir une puissance statistique suffisante (ANOVA avec test de Tukey en post-hoc).

3372. L'étude des interactions entre les microbes et l'hôte, ainsi que l'impact du microbiote (ensemble des micro-organismes (bactéries, levures, champignons, virus) vivant dans un environnement spécifique, comme par exemple le microbiote intestinal) sur la santé et les maladies nécessitent l'utilisation de modèles animaux spécifiques dits axéniques. Ces animaux, et en particulier les souris pour ce qui concerne ce projet, sont des souris de laboratoire nées dans des conditions stériles et dépourvues de tous microbes de l'environnement. A ce jour, il n'existe pas de modèles alternatifs *in vitro* à l'étude des interactions entre les microbes et l'hôte, la production de colonies de souris axéniques est donc indispensable.

L'obtention d'une nouvelle colonie de souris axéniques à partir de femelles gestantes conventionnelles est réalisée soit par hystérectomie aseptique (césarienne) et adoption des souriceaux ainsi mis au monde, par des femelles axéniques d'une colonie préexistante, soit par transfert d'embryons de femelles conventionnelles à des femelles axéniques d'une colonie préexistante. La nouvelle colonie de souris axéniques peut ensuite être amplifiée par accouplement classique.

Ce projet consiste à mettre en place dans notre structure, une procédure d'hystérectomie aseptique nous permettant de générer des colonies des souris axéniques pour les besoins de projets scientifiques relatifs aux interactions entre les microbes et l'hôte.

Un total maximum de 60 souris sur 5 ans est prévu pour réaliser 60 hystérectomies aseptiques (12 hystérectomies aseptiques en moyenne par an). Afin de réduire au mieux ce nombre, nous prévoyons de réaliser les axénisations exclusivement pour les besoins de projets scientifiques et si les souris axéniques ne sont pas déjà disponibles chez un fournisseur agréé.

La procédure expérimentale n'engendrant pas de souffrance ou de stress, aucun point limite n'est associé, mais les souris seront suivies individuellement pendant toute la durée du projet.

3373. Les perturbateurs endocriniens (PE) sont « des substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle étrangères à l'organisme qui peuvent interférer avec le fonctionnement du système endocrinien et induire ainsi des effets délétères sur cet organisme ou sur ses descendants » (OMS 2002). L'exposition aux PE et en particulier pendant les premiers stades de la vie est de plus en plus impliquée dans des pathologies et devient d'une importance majeure en santé publique. Il est important d'augmenter l'état des connaissances sur les effets des PE par des données expérimentales mettant à profit les méthodes les plus sensibles.

Certains PE peuvent diminuer la captation d'iode par les cellules en interférant au niveau de la protéine responsable de son transport: le symporteur sodium iode (NIS). Cette protéine est localisée principalement au niveau de la thyroïde, mais également dans d'autres organes du corps humain comme l'estomac, les glandes salivaires, les glandes mammaires chez la femme allaitante et le placenta. Dans les cas du placenta et des glandes mammaires le but serait d'assurer l'apport d'iode nécessaire pour que le fœtus et le nouveau-né synthétisent leurs propres hormones thyroïdiennes (HT). La conséquence de l'exposition aux PE serait alors une diminution de l'apport en iode pour le fœtus et le nouveau-né et donc une hypothyroïdie néonatale pouvant conduire au retard mental.

Le nitrate, le perchlorate et le thiocyanate sont les principaux PE qui diminuent cette captation d'iode. Le nitrate et le perchlorate sont des polluants contaminants certaines eaux de boisson. Le thiocyanate est un métabolite du cyanure, présent dans la fumée de cigarette. La réglementation concernant leur teneur maximale dans l'environnement est basée sur les mécanismes d'inhibition sus-cités. Or de récentes recherches ont permis de démontrer l'effet délétère de l'exposition chronique à de faibles doses de ces PE, doses en deçà des réglementations en vigueur. Ces effets néfastes, pourraient être dus à leur accumulation dans les cellules.

L'objectif de notre projet est de préciser les conséquences chez la souris d'une exposition chronique aux 3 PE choisis, sur le transfert d'iode de la mère vers le nourrisson ou le fœtus. Pour cela nous analyserons deux organes cibles : la glande mammaire (à partir de souris allaitantes) et le placenta (souris gestantes). Nous étudierons les mécanismes de toxicité cellulaire directe d'une exposition chronique à des doses réglementaires admises pour ces PE.

L'effet des PE sur la capacité d'accumulation d'iode par le NIS dans les différents organes de l'animal vivant sera étudié par une technique d'imagerie appelée tomographie par émission monophotonique ou SPECT. Elle est utilisée chez l'homme notamment pour l'étude des pathologies thyroïdiennes (hyperthyroïdies, cancers de la thyroïde). Elle utilise pour cela une molécule ayant un comportement proche de l'iode : le ^{99m}Tc pertechnetate, ou directement l'iode radioactive. Les effets délétères des PE au niveau des tissus seront étudiés directement sur des prélèvements issus de souris sacrifiées au moyen de techniques d'analyse microscopique.

Afin d'étudier l'effet protecteur d'un apport en iode suffisant, nous étudierons plusieurs populations de souris dont l'apport alimentaire en iode sera volontairement différent. Trois groupes de souris seront constitués. Les premières auront un apport en iode normal tandis que celles des deux autres groupes recevront un régime appauvri ou enrichi en iode.

La compréhension de ces mécanismes permettrait d'ajuster la réglementation en vigueur concernant la présence de ces PE dans notre environnement et notamment les concentrations maximales autorisées dans l'eau de boisson. De même nous pourrions envisager, en cas d'effet bénéfique d'un apport iodé suffisant par l'alimentation, des campagnes de prévention dans les populations les plus exposées.

Pour cette étude, nous planifions d'utiliser 718 souris pour des expériences pour les différentes mesures utiles. Pour l'analyse en imagerie SPECT, nous constituerons des séries de 8 animaux avec 32 conditions et donc 256 animaux. Les animaux seront exposés ou non (contrôles), étudiés par des techniques d'imagerie in vivo puis sacrifiés. L'utilisation de la technique non invasive SPECT permet d'effectuer plusieurs enregistrements répétés sur un même animal et de limiter le nombre d'animaux. Durant les expériences de SPECT les animaux sont anesthésiés dans un environnement contrôlé. Pour l'étude en protéomique, nous établirons des séries de 6 animaux avec 33 conditions et donc 198 animaux. Enfin pour l'étude en métabolomique, nous établirons des séries de 8 animaux avec 33 conditions et donc 264 animaux. Le remplacement de ces expériences par des mesures in vitro n'est pas possible à cause de la complexité des systèmes biologiques étudiés. Pour les approches omique, les animaux seront exposés ou non puis sacrifiés.

Nous utiliserons au total 718 souris gestantes dont 296 seront sacrifiées en gestation et 422 seront sacrifiées qu'après mise bas. Nous estimons à 1932 le nombre d'embryons associés et à 2755 le nombre de souriceaux.

3374. Les infections invasives pulmonaires à champignons sont responsables d'une mortalité pouvant aller jusqu'à 80% chez les patients immunodéprimés malgré les traitements antifongiques (ATF) disponibles actuellement. Les mucormycoses font partie de ces infections et sont causées par des moisissures appelées Mucorales. La porte d'entrée de ces champignons est le plus souvent pulmonaire. Les traitements ATF donnés par voie intraveineuse sont pourvoyeurs de toxicité et de nombreuses interactions avec les autres traitements que reçoivent les patients, notamment immunosuppresseurs et

chimiothérapies anti-cancéreuses. Aussi, une administration des traitements ATF ciblant directement l'organe atteint permettrait d'améliorer à la fois la tolérance des ATF mais aussi le pronostic des patients. Les aérosols sont une voie d'administration qui permet d'atteindre le champignon au site de l'invasion en limitant au maximum la toxicité. Les doses pour la nébulisation nécessaires pour obtenir une efficacité ne sont pas connues chez l'homme et les infections invasives à champignon ont un pronostic trop sévère pour que l'on puisse tester directement chez l'homme l'efficacité des aérosols d'ATF. Or, le modèle d'infection à champignon chez la souris est celui qui se rapproche le plus de l'infection humaine.

Dans ce projet, notre objectif est d'utiliser un modèle de mucormycose pulmonaire que nous avons précédemment développé chez la souris pour tester l'efficacité des aérosols d'ATF en comparant à la voie classique d'administration (ici intrapéritonéale) sur l'un des champignons responsable de mucormycose pulmonaire, appelé *Lichtheimia corymbifera*. Dans la première partie du projet, il convient de calibrer la chambre d'inhalation "nose-only" qui permettra des nébulisations aux souris. Cette calibration se fera sur souris non infectées en comparaison avec l'administration directe du produit en intratrachéal. La chambre d'inhalation permet des nébulisations répétées sans risque pour l'animal. La deuxième partie consistera à comparer les différents paramètres propres aux médicaments (temps d'absorption, élimination, concentration au niveau du plasma et des poumons) en fonction de la voie d'administration (intrapéritonéale ou nébulisation) sur souris infectées. Il sera nécessaire d'immunodéprimer les souris par les corticoïdes, médicaments couramment utilisés chez l'homme, puis de les infecter par voie intratrachéale afin d'obtenir une infection pulmonaire. Les souris seront ensuite traitées en dose unique par voie intrapéritonéale ou par nébulisation via la chambre d'inhalation "nose-only". Dans la dernière partie du projet, les ATF vont être administrés par nébulisation plusieurs jours de suite pour traiter les souris et juger de l'efficacité de cette voie en comparaison à la voie intrapéritonéale.

725 souris vont être utilisées pour ce projet. La règle des 3R a été prise en compte dans l'élaboration de ce protocole. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum en dupliquant seulement l'étude d'efficacité et en appliquant des méthodes statistiques propres aux petits effectifs qui permettent d'obtenir des différences significatives avec 5 souris/groupe. Le remplacement des animaux est impossible car aucun modèle alternatif d'infection n'existe in vitro permettant d'évaluer l'efficacité de thérapeutiques. Pendant l'expérimentation, le raffinement est pris en compte. En effet, l'inoculation des champignons et l'administration en intratrachéal des ATF sont réalisées chez des souris anesthésiées. De plus, entre l'infection et l'administration des ATF, les animaux vigiles sont placés dans un environnement thermostaté, avec libre accès à la nourriture et à l'eau. L'équivalent des tubes de contention qui serviront pour les nébulisations sont placés dans les cages pour que les animaux s'habituent à ce dispositif dès leur arrivée à l'animalerie.

3375. Ce projet a comme but principal de mettre en évidence les mécanismes neurobiologiques responsables des effets positifs de l'exposition à un environnement stimulant sur l'addiction et plus particulièrement les risques persistant de rechute. Notre hypothèse de travail est que les drogues altèrent de façon durable le fonctionnement du cerveau et par conséquent, le comportement. Ainsi une exposition à un environnement stimulant contrecarrerait ces altérations et normaliserait le comportement addictif. Nous allons utiliser des modèles animaux d'addiction et nous allons les combiner avec des mesures neurobiologiques de changements cérébraux induits par la drogue et notamment des mesures d'imagerie cérébrale et d'électrophysiologie.

En résumé, toutes les expériences auront 3 phases communes et une 4ème phase spécifique qui changera en fonction de la mesure réalisée.

La phase 1 correspond à la chirurgie pour l'implantation d'un cathéter chronique dans la veine jugulaire des rats.

La phase 2 correspond à l'auto-administration (grâce à ce cathéter) d'une drogue.

La phase 3 correspond à une période d'abstinence pendant laquelle les rats sont hébergés dans un environnement enrichi ou dans un environnement standard dans une pièce d'hébergement de l'animalerie et ils n'ont pas accès à la drogue.

La 4ème phase consiste à étudier le fonctionnement cérébral en utilisant des techniques d'électrophysiologie in vivo pour étudier l'activité des circuits neuronaux du cerveau.

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

Nous avons calculé que pour cette étude 420 rats seront nécessaires pour obtenir des données qui soient analysables statistiquement.

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

3376. La dyskinésie ciliaire primitive (DCP) est une maladie génétique caractérisée par des infections respiratoires ORL et bronchiques débutant dès la naissance. Malgré les traitements conventionnels, cette maladie aboutit à la destruction progressive des poumons et à l'insuffisance respiratoire. La DCP est l'affection congénitale des voies respiratoires la plus fréquente après la mucoviscidose.

Le travail de recherche consiste à évaluer la tolérance et l'efficacité d'une thérapie génique sur un modèle de souris déficiente. En effet, il existe une souris qui est porteuse d'une mutation spontanée dans un gène de la DCP. Cette souris est susceptible de faire des infections respiratoires récidivantes qui sont essentiellement localisées au niveau des sinus. Elle a relativement par

rapport aux humains peu d'infections bronchiques. Les cils des cellules épithéliales respiratoires de ces souris sont immobiles. Il est donc possible d'observer l'effet d'une thérapie génique sur la motricité des cils et sur les infections.

Les souris recevront un traitement sous anesthésie générale, seront observées selon le groupe entre 48h et 2 semaines, avant les prélèvements finaux pour visualiser les effets de ce traitement.

La recherche de douleur et/ou de difficulté respiratoire liée à la maladie sera faite et traitée au besoin.

2) Retombées attendues dans le domaine de la Dyskinésie Ciliaire : cette étude est un essai thérapeutique sur un modèle de souris qui nous permettra d'évaluer la tolérance du traitement et son efficacité à corriger cette maladie ce qui ouvrirait des espoirs de traiter efficacement les malades. La durée attendue de cette étude est de 2 ans.

3) Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

Il existe des souris mutantes ainsi qu'un modèle de chien qui sont atteints de la même maladie que l'homme. Nous avons choisi le modèle de souris qui présente le moins de signes de cette maladie génétique (en particulier, ce modèle ne souffre pas de gonflement de la tête ou hydrocéphalie).

Le nombre de souris a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats.

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

Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettent une classification de gravité des procédures expérimentales en classe de gravité modérée.

Nous avons démontré précédemment que cette méthode de thérapie génique est efficace in vitro sur culture cellulaire. Nous devons maintenant démontrer que ce traitement est efficace et tolérable sur un organisme entier.

4) Nombre total de souris inclus dans le projet est 150.

Il ne s'agit pas d'une étude rétrospective.

3377. Les infections intra-abdominales sont une des urgences digestives les plus fréquentes. Ce risque infectieux constitue un problème majeur et il est important d'optimiser le choix et la posologie des antibiotiques, afin de prévenir les échecs thérapeutiques et limiter l'apparition de bactéries résistantes. Les éléments concernant les traitements anti-infectieux dans le domaine des infections intra-abdominales ne reposent que sur un nombre faible de travaux. De même, la posologie des anti-infectieux et les analyses pharmacocinétiques dans ces sites infectieux n'ont fait l'objet que de quelques publications.

Les études pharmacocinétiques portant sur les antibiotiques reposent le plus souvent sur la détermination des concentrations totales plasmatiques. Or la plupart des infections se produisent dans le fluide extracellulaire des tissus. Par conséquent les concentrations libres en antibiotique dans le liquide interstitiel au niveau du site d'infection sont plus utiles pour prédire l'activité antimicrobienne au cours du temps et donc pour adapter la posologie. La microdialyse est une technique fiable et de plus en plus utilisée pour étudier la distribution de nombreuses molécules dans différents tissus comme le muscle, les poumons, le cerveau et la peau, à la fois chez l'homme et chez l'animal. Elle permet donc de doser en continu les concentrations des médicaments au niveau du liquide extracellulaire des tissus dans des conditions physiologiques.

Une nouvelle association prometteuse combinant un monobactame et un inhibiteur de bêta-lactamases, a été développée et est en cours d'évaluation pour le traitement d'infections sévères, dont les péritonites, causées par des bactéries multirésistantes.

Ainsi, le but de cette étude est d'évaluer la distribution de cette nouvelle association médicamenteuse dans le liquide intra-péritonéal et dans le muscle (utilisé comme tissu contrôle) de rats sains et de rats présentant une péritonite. L'impact de l'infection sur la distribution de l'association sera évalué en mesurant pour chacun des groupes les concentrations au niveau sanguin, péritonéal et musculaire par microdialyse, à différents temps post-administration. 30 rats seront utilisés pour cette étude et la règle des 3R a été prise en compte dans l'élaboration de ce protocole. L'utilisation de la microdialyse va réduire le nombre d'animaux utilisés par rapport à une étude pharmacocinétique traditionnelle, en permettant des recueils continus au niveau sanguin et du liquide extracellulaire de différents tissus chez un même animal. De plus, la microdialyse au niveau sanguin évite de réaliser des prélèvements et n'engendre aucune déperdition de volume chez l'animal. Le remplacement des animaux est impossible car aucun modèle alternatif n'existe pour mimer les concentrations plasmatiques et tissulaires à la suite d'une administration de substance médicamenteuse. Toutefois, le raffinement est pris en compte pendant l'expérimentation, à savoir que la pose des sondes de microdialyse se fera sous anesthésie générale et qu'un traitement antalgique sera administré. L'administration du traitement par voie intraveineuse ainsi que les recueils de dialysat sont réalisés chez des rats anesthésiés. Enfin, entre l'induction de la péritonite et l'administration, les animaux vigiles sont placés dans un environnement thermostaté, avec libre accès à l'eau et la nourriture.

3378. La douleur aiguë est un processus physiologique nécessaire à la survie. Lorsqu'elle devient chronique ou persistante, à la suite d'une inflammation (douleur inflammatoire) ou d'une lésion nerveuse (douleur neuropathique), la douleur n'offre plus aucun avantage mais provoque au contraire détresse et souffrance. Les traitements disponibles ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Il faut donc découvrir de nouveaux médicaments, et pour ce faire, étudier les mécanismes responsables d'une douleur chronique.

Au cours des dernières années, notre connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires de la douleur s'est considérablement accrue. Pourtant, aucune avancée thérapeutique majeure n'est intervenue. Une des raisons de cet échec est qu'il n'y a pas une mais des douleurs. En effet, qu'elles soient inflammatoires ou neuropathiques, les douleurs chroniques se manifestent par plusieurs symptômes : douleurs spontanées, continues ou paroxystiques, et douleurs provoquées par des stimulations normalement non douloureuses (allodynie) ou normalement déjà douloureuses (exagération de la douleur ou hyperalgésie). Chacun de ces symptômes dépend de mécanismes distincts. Aussi, un médicament efficace sur les douleurs spontanées ne le sera pas nécessairement, par exemple, sur l'allodynie et inversement. D'où la nécessité de traitements spécifiques pour chacun de ces symptômes.

L'allodynie mécanique est le symptôme le plus fréquemment rencontré chez les patients douloureux chroniques : chez 20-50% des patients neuropathiques et 60-80% des migraineux chroniques. De plus l'apparition d'une allodynie est un facteur de risque de chronicisation de la migraine. D'où l'intérêt de la question: Comment le toucher devient-t-il douleur? Il est maintenant clairement établi que l'apparition d'une allodynie mécanique est liée à l'activation, dans la corne dorsale de la moelle épinière ou le sous-noyau caudal du trijumeau (Sp5C), d'un circuit neuronal où des interneurons particuliers exprimant l'isoforme γ de la protéine kinase C (PKC γ) jouent un rôle clé. En effet, l'inactivation, génétique ou pharmacologique, de la PKC γ prévient l'apparition d'une allodynie mécanique alors que son activation, au contraire, la provoque. L'activation de la PKC γ est donc nécessaire à l'apparition d'une allodynie mécanique. Mais, l'est-elle aussi à son maintien?

La question spécifique ici est: la PKC γ reste-t-elle active une fois l'allodynie mécanique établie ? Pour être active, la PKC γ doit être phosphorylée et se fixer sur un récepteur membranaire spécifique. Nous évaluerons la fixation de la PKC γ phosphorylée sur des membranes de Sp5C dans un modèle de douleur inflammatoire persistante de la face chez le rat (injection intradermique d'adjuvant complet de Freund) à deux délais : à l'apparition de l'allodynie mécanique et 3 jours après. Nous évaluerons également l'effet d'un inhibiteur PKC γ , KIG31-1, sur cette fixation.

En vue de l'application de la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés pour ce projet a été réduit au maximum. Ce nombre tient compte des animaux qui ne répondraient pas aux tests mais reste suffisant pour discriminer un effet statistiquement significatif entre les traitements (analyse de variance et tests post hoc paramétriques ou non paramétrique). Au total 120 rats seront utilisés dans ce projet. Ils seront mis à mort après la fin des procédures par overdose anesthésique.

3379. L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) constitue un problème majeur de santé publique. Cette infection peut aboutir au développement de cirrhose et aller jusqu'à induire un cancer du foie. Le traitement standard ne permet que 50 à 80% de guérison; son coût élevé ainsi que les effets secondaires associés soulignent la nécessité de développer d'autres stratégies pour lutter contre le VHC.

L'objectif de ce projet est de vacciner contre le VHC en utilisant des adénovirus (Ad) recombinants. Des vecteurs Ad5 ont déjà été utilisés dans de nombreuses approches vaccinales. Néanmoins, leur efficacité est limitée par la présence chez l'homme d'anticorps anti-Ad5 capables d'inhiber le transfert de gènes. Afin de s'affranchir de cette étape, nous avons choisi d'utiliser une approche de vaccination basée sur l'insertion de fragments de protéines (épitope) dans les protéine de surface (capside) de l'Ad.

Différents Ad portant des fragments de protéines du VHC à leur surface ont été produits. Les fragments protéiques introduits ont été choisis car ils sont la cibles des réponses immunitaires humorales ou cellulaires contre le VHC lors d'un processus naturel d'infection. Nous avons confirmé la présence des fragments protéiques au sein de la capsid virale. De plus, nous avons montré que les fragments protéiques insérés dans la capsid virale sont capables de stimuler les lymphocytes T in vitro. Ces expériences préliminaires in vitro nous ont permis d'identifier les vecteurs les plus aptes à stimuler les réponses immunitaires in vivo. Pour analyser la capacité des vecteurs Ad à induire des réponses immunitaires anti-VHC, l'utilisation de modèles animaux et, plus particulièrement de modèles murins, est indispensable. En effet, à ce jour, il reste impossible de reproduire in vitro les interactions des différentes cellules nécessaires à l'établissement et à la maturation des réponses immunitaires.

Les vecteurs seront injectés selon différentes voies d'administration à des souris de différentes souches. Puis les réponses humorales (anticorps) et cellulaires (lymphocytes) seront analysées à différents temps. Enfin, nous mesurerons si les souris vaccinées sont protégées contre le VHC en testant leur capacité à rejeter des tumeurs.

Dans toutes les expériences, pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous immuniserons un groupe d'animaux par vecteur donné en nous basant sur les résultats précédents de notre équipe qui ont permis d'optimiser la quantité de vecteur à utiliser et le choix des temps d'analyse. Le nombre d'animaux par groupe expérimental sera de 6 compte-tenu de la variabilité des réponses immunitaires entre individus et de la variabilité de croissance des tumeurs. Ce nombre d'animaux nous permettra d'évaluer la significativité des résultats obtenus (test ANOVA suivi d'un Tukey's post-Hoc). Afin de raffiner les expériences, les souris recevront une anesthésie gazeuse (isoflurane) lors des prélèvements de sang. En respectant la règle des 3R, nous estimons que le nombre d'animaux requis pour conduire nos recherches dans les prochaines années et produire des résultats fiables sera, compte-tenu des différents vecteurs, des voies d'administration et des lignées de souris utilisées, de 976 souris.

Dans son ensemble ce projet devrait participer à la mise au point de vaccins anti-VHC qui bénéficient des propriétés stimulantes des Ad et présentent des effets secondaires réduits.

3380. Le cancer du pancréas est la 4ème cause de décès par cancer dans le monde. Seul 15% des patients sont opérables et ceux-ci ont une chance de survie de 20% à 5 ans.

Pour les autres tumeurs (e.g. localement avancées ou métastatiques), la chimiothérapie systémique a une efficacité médiocre en raison d'un haut degré de chimiorésistance.

Considérée comme l'évènement génétique initiateur du cancer du pancréas, la mutation K-ras est présente dans plus de 90% des adénocarcinomes pancréatiques. Il a été observé au niveau de tumeurs humaines pancréatiques et dans un modèle animal, que certaines mutations induisent un mécanisme de détoxification des formes réactives de l'oxygène via un facteur de transcription appelé Nrf2 et que cette activation de Nrf2 favorise la croissance tumorale.

Le rôle de Nrf2 dans l'oncogenèse a été en partie étudié in vitro dans le cancer du pancréas. Mais aucune étude animale n'a précisé l'implication de la voie Nrf2 sur le microenvironnement tumoral, notamment la réaction immune tumorale, qui joue pourtant un rôle clé dans le développement, la migration tumorale et la chimiorésistance.

Ce travail a pour but d'étudier l'implication de la voie Nrf2 dans l'oncogenèse pancréatique : sur la croissance tumorale, au niveau du microenvironnement tumoral et sur les mécanismes de chimiorésistance dans 3 modèles murins différents : un modèle de tumeur implantées en sous-cutanée, un modèle de tumeur solide implantée dans le pancréas et un modèle de souris transgénique appelé KPC.

Des expériences préliminaires seront réalisées in vitro sur les cellules tumorales issues de tumeurs KPC et de lignées cellulaires de tumeurs pancréatiques, afin de définir et d'optimiser les paramètres d'injection et de réduire le nombre d'animaux. Des activateurs et inhibiteurs de Nrf2 seront préalablement testés in vitro, afin de sélectionner les molécules ayant le plus d'intérêt et de minimiser le nombre de souris utilisées par la suite. Cette étude conduira à optimiser les modalités thérapeutiques, prédire les effets d'une association médicamenteuse avec une chimiothérapie conventionnelle (Gemcitabine) sur la croissance tumorale, in vivo.

Le modèle de tumeur sous-cutanée nécessitera 144 souris, pour l'implantation dans le pancréas. 132 souris seront utilisées et pour les souris transgénique KPC 48 souris seront nécessaires, soit 144 animaux et 10 souris supplémentaires seront nécessaires pour des études de faisabilité (334 souris au total). Un suivi quotidien des souris permettra d'évaluer l'évolution du cancer et de maintenir leur bien-être en respectant les points limites de taille de tumeur et d'état générale des animaux.

3381. Les lymphomes T périphériques (PTCL) sont des néoplasies hétérogènes qui représentent environ 12% de l'ensemble des lymphomes chez l'Homme. Ces pathologies sont souvent considérées comme des « maladies orphelines », reflétant ainsi les difficultés rencontrées pour leur classification, diagnostic et traitement. Récemment, il a été montré une augmentation du risque de développer un PTCL chez les femmes ayant des implants mammaires, suggérant un lien entre PTCL et implants mammaires. De plus plusieurs études suggèrent un rôle inflammatoire de l'enveloppe des implants mammaires et/ou de la silicone présente dans les implants mammaires, qui pourraient entraîner des stimulations antigéniques chroniques des lymphocytes T présents au niveau de la capsule autour de l'implant.

Nous avons récemment mis au point un nouveau modèle murin de PTCL dans lequel la stimulation antigénique chronique semble être essentiel à la transformation des lymphocytes T.

Nous souhaitons donc mesurer l'impact de ces implants sur la cinétique et le spectre des lymphomes T obtenus dans notre modèle murin.

Les PTCL sont des pathologies pour lesquels nous n'avons pour le moment pas de traitement efficace. Il nous faut donc développer des outils afin de comprendre les mécanismes à l'origine de ces pathologies pour pouvoir mieux les traiter. Nous ne disposons malheureusement pas ou trop peu de lignées cellulaires permettant ces études, il nous faut donc développer de nouveaux modèles animaux.

Pour cela la souris est très utile car nous disposons de modèles génétiquement modifiés tels que les souris p53 KO permettant le développement plus rapide et une pénétrance plus importante de ces pathologies. Des points limites ont été définis et décrits ci-après. Toute atteinte de ces points limites entraînera la mise à mort immédiate de l'animal. Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats.

Au total, nous aurons besoin de 400 souris pour cette étude.

3382. L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe notamment des composés thérapeutiques dans le domaine des troubles alimentaires compulsifs. Le principal objectif de l'étude est d'évaluer les effets d'un composé en développement (nommé X, la dénomination des composés est sujette à confidentialité) sur le comportement alimentaire compulsif chez un modèle rat de boulimie. Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de détailler l'efficacité et les mécanismes d'action de leur composé anti-obésité.

Dans ce contexte, un traitement chronique de 21 jours sera pratiqué chez le rat (composé X testé à deux doses et un composé de référence, la sibutramine à la dose de 5 mg/kg), suite à une semaine d'induction d'un comportement alimentaire compulsif (dit Binge eating). Ce dernier est induit en autorisant un accès à de la nourriture enrichie en graisse et en carbohydrates (dite HPF pour High Palatable Food ou Nourriture hautement appétante) pendant 2h selon un planning d'accès intermittent chez des animaux nourris par ailleurs à l'aide d'une nourriture standard. Après une phase d'induction d'une semaine, les animaux présentent alors un comportement fortement hyperphagique au cours des 2h d'accès à la nourriture HPF. Malgré ce comportement comparable à des crises de boulimie, les animaux conservent la capacité de réguler de leur consommation calorique quotidienne, cette dernière n'étant pas différente de celle observée chez des animaux n'ayant aucun accès à de la nourriture HPF. Pendant la semaine d'induction du phénotype et au cours des 3 semaines de traitement, la prise alimentaire journalière et le poids corporel seront mesurés de façon bihebdomadaire et la prise alimentaire au cours des 2h d'accès à la nourriture HPF sera mesurée à chaque accès. Au cours de la troisième semaine de traitement, un prélèvement sanguin sera

pratiqué au niveau de la veine de la queue. Enfin, à l'issue du traitement, des prélèvements terminaux de sang et d'organes (tissu adipeux, tissu musculaire) seront pratiqués.

Les résultats obtenus chez les animaux traités seront comparés à ceux obtenus chez des animaux n'ayant pas eu d'accès à la nourriture HPF (contrôle négatif binge eating) et à des animaux ayant eu l'accès à l'HPF mais traités uniquement à l'aide du véhicule (Contrôle positif binge eating).

Le paradigme expérimental nécessitera ainsi 5 groupes de 15 animaux, soit un total de 75 rats. Compte tenu du fait que ce paradigme est basé sur des procédures expérimentales très peu invasives, le niveau de souffrance qui pourrait en résulter est par conséquent léger.

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

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

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience du laboratoire sur le modèle. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un traitement sur des troubles aussi complexes et intégrés que les troubles alimentaires compulsifs.

3383. L'aliment des volailles pondeuses est conçu pour apporter les nutriments nécessaires aux besoins d'entretien et de production. Il se définit par un mélange de matières premières, additifs et minéraux. L'objectif de ce projet est d'évaluer les différents constituants des aliments d'une part, et d'autre part d'identifier les besoins des volailles pondeuses en fonction de leur stade de développement. Au total pour ce projet, 8640 animaux répartis sur 4 bandes (2160 animaux par bande) sont élevés en cages afin de pouvoir étudier les différentes parties d'un cycle de ponte à savoir : fin d'élevage, début de ponte, pic de ponte et fin de ponte. Les animaux sont logés dans des cages aux normes d'élevages, jusqu'à 20 par cage. Ce logement assure ainsi un résultat au plus près des besoins des animaux en condition d'élevage. Afin d'évaluer l'impact de la nutrition, les performances de ponte (taux de ponte, poids des œufs) et la consommation d'aliment sont relevés chaque semaine. Le poids des poules est également un facteur important évalué régulièrement en fonction de la thématique. D'autres critères sont mesurés : paramètres sanguins (120 animaux par bande) et composition corporelle (120 autres animaux par bande), les animaux étant gardés en vie, ou encore composition de certains tissus post mortem (120 animaux par bande). Le nombre de prises de sang est limité à 24 par animal jusqu'à 100 semaines d'âge. Par essai, 6 aliments sont comparés. Ce dispositif permet d'observer des différences statistiques entre les aliments testés avec un minimum d'animaux (360 animaux par aliment testé). Les volailles pondeuses sont conduites avec une alimentation à volonté ou sub-limitante. Les cages sont équipées d'un nid, de perchoir, d'une litière permettant le picotage et le grattage et d'un dispositif de raccourcissement des griffes, dispositif conforme aux normes d'élevage. 8121 animaux (94%) resteront dans la filière de consommation.

3384. La radiothérapie (RT) est un traitement locorégional des cancers, consistant à utiliser des rayonnements ionisants (dit aussi "rayons" ou "radiations") pour détruire les cellules cancéreuses. Actuellement, plus de 50% des patients atteints d'un cancer sont traités par radiothérapie à une étape de leur parcours de soin. Dans certains cas, la RT peut diminuer la croissance tumorale en dehors de la zone d'irradiation. En oncologie, ce phénomène est désigné par « effet abscopal ». Les mécanismes régissant l'effet abscopal n'ont pas été entièrement élucidés, mais impliqueraient une modulation positive (activation) du système immunitaire, qui en réponse, détruirait les cellules cancéreuses.

Les nanoparticules (NPs) sont des objets de diamètre compris entre 1 et 100 nm. Dans ce projet, les nanoparticules d'oxyde d'Hafnium testées sont inertes et conçues pour augmenter la dose de radiothérapie à l'intérieur de la tumeur, sans augmenter les dommages aux tissus sains. En effet, les propriétés physiques de ces nanoparticules leur permettent de générer de très importantes quantités d'électrons lors de leur exposition aux radiations ionisantes, amplifiant ainsi la dose d'énergie létale déposée dans la tumeur. L'efficacité de la radiothérapie est donc démultipliée sans changer la dose de rayons-X.

L'objectif de ce projet est d'évaluer, sur des souris immunocompétentes et porteuses sur chaque flanc d'une tumeur sous cutanée (désignées par tumeur 1 et tumeur 2), la réduction du volume tumoral sur la tumeur 2, induit suite au traitement de la tumeur 1 (nanoparticules injectées par voie intra-tumorale (IT) dans la tumeur 1 puis activées par RT, ou bien RT seule).

Pour cette étude, il est indispensable d'utiliser des modèles *in vivo* immunocompétents, seuls capables de reproduire la complexité du développement tumoral et permettant de démontrer l'activité antitumorale et l'effet abscopal induits par les nanoparticules activées par la radiothérapie. Les modèles de cancer chez les souris immunocompétentes (BalB/C et C57BL) ont donc été choisis avec soin en se basant sur la bibliographie existante et sont largement utilisés pour l'étude de traitements anti-cancéreux à travers toute la recherche en oncologie et en immunothérapie. Les lignées cellulaires cancéreuses d'origine murine de cancer du sein, de cancer du côlon, de cancer du sein, métastatique, de mélanome et d'hépatome seront testées dans l'un ou l'autre de ces modèles. Au total, un maximum de 860 souris pour les 5 modèles cellulaires (calculs basés sur une prise de greffe théorique de 50%) pourront être nécessaires afin de répondre aux objectifs précédemment cités. Les groupes testés et le nombre d'animaux utilisés pour ces études ont été choisis avec soin et limités au strict minimum afin de réduire autant que possible la quantité d'animaux utilisés tout en garantissant la robustesse des études. L'inconfort, la douleur ou

l'anxiété des animaux potentiellement liés à la toxicité du composé (bien qu'aucune toxicité ne soit attendue) seront traités par des médicaments adaptés de type morphiniques.

3385. Les accidents survenant au niveau d'une centrale nucléaire ont pour conséquence principale le rejet dans l'environnement de fortes quantités de radioactivité sous forme de particules et gaz radioactifs pouvant contaminer les populations exposées. Parmi les isotopes présents dans les rejets, figurent notamment l'iode 131 et d'autres isotopes à vie courte de l'iode. L'exposition des populations aux iodures radioactifs est notamment associée à une augmentation de cancers de la thyroïde. Les conséquences sanitaires liées à l'exposition aux iodures radioactifs peuvent néanmoins être limitées par l'ingestion de comprimés d'iode stable. Idéalement, cette administration doit intervenir deux heures avant l'exposition au panache radioactif. Cette mesure préventive est efficace en cas d'exposition ponctuelle comme lors du passage d'un nuage radioactif.

Toutefois, lors de la récente catastrophe de Fukushima Dai-ichi, les autorités sanitaires ont été confrontées à un relargage répété d'iode radioactif et, dans le cas d'une exposition répétée, une prise d'iode stable unique en prophylaxie n'est pas appropriée. En raison du déficit de connaissances quant aux modalités d'administrations répétées d'iode stable pour assurer une protection efficace, les autorités sont en fait démunies face à des situations de rejets chroniques d'iodures radioactifs. Les effets secondaires engendrés par ces administrations répétées sont mal connus mais une surcharge continue en iode est certainement à éviter. Nous avons initié un projet de recherche qui consiste à déterminer les modalités d'administrations répétées d'iode stable en situation de rejets radioactifs chroniques et à faire évoluer l'actuelle autorisation de mise sur le marché des comprimés d'iodure de potassium (KI). Ce projet a reçu un soutien pour une durée de 5 ans dans le cadre des projets d'investissement d'avenir RSNR (Recherche dans le domaine de la Sécurité Nucléaire et de la Radioprotection). Ce travail est réalisé en collaboration avec plusieurs laboratoires français et la Pharmacie centrale des Armées (producteur des pastilles de KI pour la France). Les travaux de notre équipe dans ce projet collaboratif sont essentiellement réalisés sur des souris mais aussi quelques rats et ont déjà fait l'objet d'une demande CIEPAL validée. Nos collègues d'un autre laboratoire réalisent des études en parallèle sur des rats. Ils ont notamment obtenu des résultats intéressants avec des mesures de la concentration d'iode stable circulant en condition d'administration répétée de KI. Il ne leur est toutefois pas possible d'analyser l'effet protecteur par rapport à une exposition à de l'iode radioactif. Pour cela, nous envisageons de réaliser des expériences chez les rats pour obtenir ces informations et les croiser avec leurs résultats. Ces expériences sont essentielles pour modéliser les effets et pour optimiser la dose et la fréquence de KI.

Pour cette étude, nous planifions d'utiliser 84 rats pour des expériences qui consisteront à faire des séries de 6 animaux dans 7 conditions et avec 2 radiotraceurs. Les animaux seront étudiés par des techniques d'imagerie *in vivo* puis sacrifiés.

Le remplacement de ces expériences par des mesures *in vitro* n'est pas possible à cause de la complexité des systèmes biologiques étudiés. L'utilisation de la technique non invasive SPECT permet d'effectuer plusieurs enregistrements répétés sur un même animal et de limiter le nombre d'animaux. Durant les expériences de SPECT les animaux sont anesthésiés dans un environnement contrôlé. La seule souffrance potentielle sera liée à l'anesthésie.

3386. Notre laboratoire étudie une protéine membranaire impliquée dans le transport de monocarboxylates au niveau des reins et du colon. Cette protéine est aussi exprimée par les cellules de la thyroïde et les neurones mais son rôle dans ces tissus reste spéculatif. Chez l'homme, il a été observé que le gène codant cette protéine est la cible privilégiée de mécanismes épigénétiques de méthylation entraînant une perte « fréquente » de son expression avec l'âge. Sur la base de résultats expérimentaux essentiellement obtenus *in vitro* et publiés à ce jour, cette perte d'expression est postulée induire des cancers et favoriser le développement de maladies neurodégénératives. Afin d'étudier sa fonction physiologique de cette protéine et son rôle dans des pathologies, un modèle d'étude de souris transgénique invalidée pour son gène a été élaboré au laboratoire. Les animaux invalidés sont parfaitement viables, se reproduisent et possèdent une durée de vie non altérée par rapport aux animaux sauvages. Seuls des dysfonctionnements rénaux ont été identifiés à ce jour avec une légère élévation urinaire de monocarboxylates liée à un défaut de réabsorption des substrats du transporteur exprimé au niveau rénal. Cette légère augmentation des monocarboxylates urinaires a déjà été constatée par une équipe concurrente qui a aussi conclu à l'absence de phénotype dommageable y compris au niveau de la thyroïde et du cerveau. De nombreux animaux invalidés ont été maintenus jusqu'à un âge de 2 ans, aucun signe de souffrance, trouble apparent de comportement ou de maladie spécifique (tumeur ou autre) n'a été observé. L'étude de ces animaux notamment âgés est essentielle pour comprendre les effets de la perte spontanée d'expression observée chez l'homme. Dans l'étude proposée sur les souris, nous étudierons des effets précoces non encore dommageables mais révélateur d'un effet à plus long terme sur plusieurs années qui pourrait se retrouver chez l'homme.

Des études *in vitro* non publiées sur la protéine suggèrent son rôle clef dans une régulation de la fonction thyroïdienne qui permet une adaptation rapide à un régime variable en iode. La perte de cette régulation ne devrait avoir aucun effet dommageable pour les animaux en captivité soumis à un apport constant en iode. Un effet avec l'âge sur la capacité de régulation de la thyroïde n'est toutefois pas exclu. Nous proposons de réaliser deux séries (1 et 2) d'analyses en imagerie SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) afin d'établir le rôle de la protéine dans la régulation thyroïdienne. Nous disposons d'un équipement d'imagerie équivalent à une caméra SPECT utilisée en médecine nucléaire humaine mais dédiée aux rongeurs qui nous permet de suivre des radiotraceurs chez l'animal vivant anesthésié. Le radiotraceur (iode 123) est utilisé en routine chez l'homme. La technique est utilisée en routine au laboratoire et a fait l'objet de plusieurs demandes d'expérimentation animale. Aucune souffrance n'est associée à cette technique. Cette partie du projet est soutenue par un financement dans le cadre des projets d'investissement d'avenir.

3387. Nos études non publiées sur le cerveau ont révélé des signes histologiques de vieillissement accéléré chez les souris invalidées sans effet dommageable visible sur l'animal vivant. Nous réaliserons deux autres séries (3 et 4) d'expériences d'imagerie SPECT afin de détecter des effets potentiels de l'invalidation sur le cerveau en fonction de l'âge. Pour la série 3 d'imagerie SPECT, le radiotracer prévu (HMPAO) est analogue à une molécule utilisée en routine chez l'homme et il a été employé chez les rongeurs. Le radiotracer de la série (CLINDE) déjà été employé chez des rongeurs. Préalablement à trois des quatre séries SPECT, nous mènerons des études comportementales qui permettront de détecter d'éventuels désordres cognitifs et comportementaux. Par lot d'animaux, deux tests simples sont envisagés. Le stress potentiellement généré sera donc très faible. Ces tests sont classiques en comportement et n'engendrent aucune souffrance connue chez l'animal. Notre espace d'expérimentation y sera dédié durant ces expériences afin qu'elles se fassent dans les meilleures conditions d'environnement (bruit, odeurs...).

A la fin des expériences d'imagerie SPECT les animaux seront sacrifiés. Les fluides biologiques (sang et urine) seront collectés pour des dosages. Des organes seront prélevés et utilisés pour d'autres analyses.

Nous utiliserons, pour chaque série d'imagerie SPECT, 8 animaux invalidés et 8 animaux contrôles âgés de 3, 9 et 21 mois (8x3 = 24 animaux invalidés et 24 animaux contrôles). Nous réaliserons quatre séries d'imagerie SPECT soit un total de $24 \times 4 = 96$ animaux invalidés et 96 animaux contrôles. Les animaux des séries d'imagerie SPECT 1 à 3 (soit 144 souris) seront préalablement utilisés pour des tests de comportement. Une collecte d'urine sera effectuée sur les animaux de la série d'imagerie SPECT 4. Le nombre total d'animaux provenant de notre élevage sera donc de 192. Enfin, pour la mise au point des expériences, 60 souris d'un élevage commercial seront également requises. Le nombre total d'animaux utilisé sera donc de $192+60=252$. Le remplacement de ces expériences par des mesures in vitro n'est pas possible à cause de la complexité des systèmes biologiques étudiés. L'utilisation de la technique non invasive SPECT permettra un suivi longitudinal du même animal (raffinement) et de limiter considérablement le nombre d'animaux (réduction). Une réduction importante du nombre d'animaux est aussi réalisée par le couplage des expériences sans occasionner de souffrance supplémentaire identifiable sur les animaux. La mise en évidence du rôle de ce transporteur dans des maladies thyroïdiennes et neurodégénératives sera importante pour ces pathologies majeures en santé publique

3388. Chaque année en France, 60 000 bébés viennent au monde prématurément, soit environ 7% des naissances. Et ce nombre est en perpétuelle augmentation, ce qui place notre pays au dixième rang en Europe. Une part importante de ces enfants est atteinte d'encéphalopathies périnatales touchant le développement de leur cerveau dont les signes cliniques peuvent apparaître tardivement. Ces encéphalopathies se manifestent en effet par l'apparition ultérieure de déficits cognitifs, comportementaux ou de déficits de socialisation qui à long terme peuvent conduire à la schizophrénie ou l'autisme.

Le but de cette étude préclinique translationnelle est de tester l'efficacité thérapeutique (par examen non invasif en IRM et observation comportementale) de deux molécules candidates sur un modèle validé d'encéphalopathie périnatale chez le primate non humain (PNH). Des tests sur des cellules humaines ont montré que ces deux molécules ciblent le type cellulaire impliqué dans l'encéphalopathie chez les enfants. Ces molécules ont été sélectionnées parmi un panel de molécules pour leur efficacité sur des rongeurs atteints d'une forme simplifiée d'encéphalopathies périnatales. Cette étude préclinique avec des molécules déjà utilisées comme médicaments dans d'autres pathologies humaines rend possible, la translation rapide voire directe vers l'homme, d'une thérapie à visée protectrice ou réparatrice de certaines lésions des encéphalopathies périnatales.

Aujourd'hui aucun dispositif in vitro ou numérique ne peut modéliser la complexité du cerveau humain en développement. Le recours aux animaux est donc indispensable. De plus, l'utilisation de PNH se justifie par la proximité des caractéristiques anatomiques, physiologiques et surtout ici de développement de leur cerveau avec celui de l'enfant nouveau-né, ce qui n'est pas le cas avec les rongeurs ou d'autres mammifères dont la durée de gestation et/ou le stade de maturité du cerveau à la naissance sont très différents. Il est intéressant de noter que l'âge foetal (environ 125 jours de gestation) auquel le PNH est sensible aux agressions inflammatoires correspond précisément à l'âge équivalent auquel l'exposition in utero du fœtus humain soumis aux mêmes agressions, induit des lésions cérébrales du type encéphalopathies néonatales.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés dans un élevage agréé. Leur nombre (76 comprenant les mères et leurs nouveau-nés) a été réduit au minimum nécessaire afin d'obtenir des données suffisantes pour caractériser les lésions induites, déterminer des biomarqueurs précoces de la maladie et tester l'efficacité thérapeutique des deux molécules. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales mis en œuvre tout au long du projet, ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Une attention particulière est apportée au bien-être des animaux par la mise en place d'enrichissements dans leur milieu en accord avec la structure de bien-être animal de nos installations et à ne séparer les nouveau-nés de leur mère que très brièvement et le minimum de fois nécessaire. Des échelles cliniques journalières et l'application de critères d'arrêts définis dans le projet permettent de veiller aux bonnes conditions de vie des animaux.

3389. Ce projet de recherche translationnelle a pour objectif d'obtenir les données de biosécurité d'un vecteur lentiviral chez la souris qui seront nécessaires pour obtenir les autorisations d'essai clinique de phase I/II de thérapie génique lentivirale du X-SCID auprès des autorités réglementaires.

Le déficit immunitaire combiné sévère de transmission liée au chromosome X (DICS-X1) est un déficit immunitaire héréditaire récessif qui représente 50% des DICS observés chez l'enfant. L'incidence de cette pathologie est environ 1/120 000 naissances. Cette maladie, létale pendant la première année de vie chez le garçon en absence de greffe de moelle osseuse allogénique, se caractérise par des infections sévères et récurrentes, associées à une diarrhée et un retard staturo-pondéral. Ce déficit est décrit comme un arrêt de maturation des cellules T et NK et est la conséquence de mutations d'un gène sur le bras long du chromosome X qui code pour la protéine Gamma C (γ C). Cette protéine est une sous-unité commune aux

récepteurs des cytokines interleukines 2, 4, 7, 9 et 15. En effet, l'expression de la protéine Gamma C permet l'induction de signaux de survie et de prolifération cellulaire des précurseurs lymphoïdes susceptibles de conférer un avantage sélectif extrêmement puissant aux cellules transduites, même si celles-ci sont peu nombreuses. Cette notion, associée à la durée de vie extrêmement longue des lymphocytes T, a laissé supposer que le transfert du gène Gamma C ex vivo dans les précurseurs hématopoïétiques serait une alternative à la greffe de moelle.

Un premier essai clinique réalisé dans les années 2000 a pu montrer le bénéfice de ce traitement par rapport à la greffe de moelle osseuse traditionnelle. Malheureusement, certains des enfants traités ont développé une prolifération clonale de lymphocytes T différenciés liée au choix du vecteur rétroviral qui comprend des séquences régulatrices pouvant activer les gènes adjacents (proto-oncogène). Aussi, pour éviter la survenue de complications, des modifications des vecteurs utilisés, l'ajustement du nombre de cellules à transduire et la sélection des patients selon l'âge ont dû être réalisés pour permettre le développement de nouveaux essais cliniques. Un vecteur lentiviral (HIV) sécurisé et de grade clinique a été développé pour réaliser une approche de thérapie génique hématopoïétique ex vivo du DCIS-X.

Le projet consiste à valider l'efficacité et l'absence de toxicité d'une production de grade "pré-clinique" de ce vecteur dans des souris déficientes en protéine Gamma C-/- dans un protocole de greffes de moelle primaires et secondaires chez des souris RAG-/-Gamma C-/. Ces souris immuno-déficientes ont une absence de lymphocytes T et NK, et sont donc élevées dans des isolateurs (Raffinement). La biosécurité du vecteur, la restauration immunitaire des animaux greffés et l'apparition éventuelle de signes pathologiques seront évaluées.

Bien que des études in vitro seront réalisées sur cellules murines et humaines pour analyser les sites potentiels d'insertion du vecteur, il est nécessaire de réaliser une étude in vivo afin de corréler l'efficacité fonctionnelle et l'absence de toxicité (Remplacement).

Afin de mettre en place ce protocole, des études préliminaires sont nécessaires afin de standardiser les actes réalisés sur les souris en réduisant ainsi le nombre de souris utilisées.

Dans ce projet, 344 animaux seront nécessaires.

3390. Les cancers de l'ovaire épithéliaux demeurent encore aujourd'hui parmi les plus agressifs, faisant d'eux la cinquième cause de mort par cancer chez les femmes. Dans le but de pouvoir mieux prendre en charge les patientes et déchiffrer les mécanismes qui gouvernent la progression tumorale et l'échec des traitements, une équipe partenaire du projet cherche à relier l'élasticité de ces tumeurs aux voies de signalisation identifiées par ailleurs.

L'élastographie permet de mesurer la rigidité des tissus. Ce paramètre est déjà utilisé en routine clinique pour détecter et caractériser l'agressivité des tumeurs du sein. Ce projet étudie l'évolution et l'impact de la rigidité de tumeurs ovariennes humaines, en se basant sur des modèles murins pertinents, obtenus par greffes dans des tumeurs dérivées de patientes chez la souris (Patient-derived xenograft, PDX).

Les tumeurs greffées présentent soit une signature de Stress oxydant soit une signature Fibrose, similaire aux signatures moléculaires établies par l'équipe partenaire du projet. Cette équipe partenaire du projet cherche à comprendre le lien entre les propriétés mécaniques de ces tumeurs et l'activation de certaines voies de signalisation. Le suivi par élastographie in vivo permet un suivi non invasif de la rigidité tumorale. Cette méthode d'examen est pratiquée sous anesthésie gazeuse et est donc sans souffrance ni stress pour l'animal.

Pour les deux sous-types tumoraux, 25 souris xénogreffées seront suivies par élastographie. Au total 50 souris seront utilisées pour ce projet.

3391. Les maladies ischémiques (infarctus du myocarde, artériopathie oblitérante du membre inférieur (AOMI) et accident vasculaire cérébral) sont caractérisées par une diminution de la perfusion du sang dans les tissus suite à l'obstruction d'une artère. Ces tissus sont dit "en ischémie", ils manquent d'oxygène et de nutriments pour fonctionner normalement ou même survivre. Ces maladies sont responsables de plus de la moitié des décès en Europe et leur fréquence augmente constamment en raison du vieillissement de la population et de l'épidémie de diabète.

L'idée de favoriser la formation et la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins dans les tissus en ischémie pour augmenter la perfusion de sang est apparue il y a 20 ans. Cependant, malgré l'identification de molécules potentiellement actives, les essais cliniques à grande échelle menés chez l'homme ont été décevants démontrant que l'on ne comprend pas encore aujourd'hui les mécanismes qui contrôlent la formation des nouveaux vaisseaux dans le muscle en ischémie.

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de la formation de nouveaux vaisseaux dans le muscle squelettique. Les travaux récents du laboratoire ont permis d'identifier de nouveaux acteurs potentiellement impliqués dans ces processus. Nous nous proposons de caractériser leur fonction et leur potentiel thérapeutique dans un modèle expérimental chez la souris dans lequel on reproduit la maladie ischémique dans le muscle squelettique de la patte (muscle tibial).

Ce programme de recherche sur 5 ans impliquera 1224 souris dont la majeure partie sont des souris transgéniques. Pour réduire le nombre d'animaux, aucune expérience déjà publiée n'est reproduite et lorsque cela est possible, les études conceptuelles sont réalisées in vitro sur des cellules en culture avant d'être testées in vivo. Cependant la réponse du muscle en ischémie est complexe mettant en jeu des interactions entre de nombreux types cellulaires locaux et circulants qui ne peuvent pas être reproduites in vitro. Suite à notre expérience concernant ce modèle (15 ans, cette saisine fait suite à une saisine précédemment acceptée par le CEEA50), 10 animaux par groupe sont nécessaires pour obtenir des résultats exploitables statistiquement. La souffrance des animaux est réduite par l'usage d'anesthésiques et d'antalgiques adaptés pour la

réalisation des gestes douloureux et en post opératoire. Au cours de la ligature chirurgicale de l'artère, une attention particulière est prise en particulier pour limiter la lésion des nerfs.

3392. Cette étude consiste à évaluer in vivo la taille et la forme des ablations par micro-ondes sur des reins de porcs. L'idée principale est d'identifier les réglages optimaux pour ces ablations par micro-ondes pour améliorer la sécurité et l'efficacité des procédures percutanées chez l'homme.

Sous anesthésie générale, des aiguilles de micro-ondes seront implantées au niveau des 2 reins de 3 porcelets sous échographie et par voie percutanée. Différents protocoles de chauffage seront réalisés (variation de puissance et de temps de chauffage) à l'aide de 1 ou 2 aiguilles. Au total 12 à 18 ablations seront réalisées pour l'ensemble des porcelets.

Les reins des porcelets seront prélevés sous coelochirurgie gazeuse pour être analysés. Les prélèvements seront conditionnés par une plateforme d'histologie et analysés par des anatomopathologistes.

Pour ce projet nous pratiquerons sur des porcelets Landras de 3/4 mois (50 kg environ) 3 par séance soit un total sur 5 ans de 15 porcelets maximum.

Les porcelets proviennent d'un élevage et sont transportés dans des conditions confortables.

Le protocole de prémédication, d'anesthésie et d'analgésie est décidé lors de la préparation préliminaire de l'acte chirurgical. Les animaux seront prémédiqués (administration de calmants) dans le camion, dès leur arrivée, pour limiter le stress des manipulations. Cette opération s'effectuera dans le calme et avec douceur. Une fois que la prémédication aura fait son effet, les porcelets seront transférés jusqu'au bloc opératoire, sur un chariot de transport dédié recouvert d'une couverture.

Une fois installés, nous mettrons en place la voie veineuse (veine marginale de l'oreille) reliée à une poche de sérum physiologique, puis nous procéderons à l'induction de l'anesthésie et l'intubation. Les animaux seront mis sous respirateur pour leur confort respiratoire.

Nous relèverons le rythme cardiaque qui servira de référence pour le temps de l'acte chirurgical. Avant que la chirurgie ne débute, des antalgiques seront administrés. Les constantes et la profondeur de l'anesthésie seront surveillées durant toute la durée de l'anesthésie.

C'est une procédure sans réveil. Les animaux seront donc euthanasiés en fin d'intervention sous anesthésie générale par surdosage de pentobarbital sodique.

Nous n'avons pas les moyens, à ce jour, de remplacer la méthode in vivo par d'autres méthodes.

3393. La maladie de Hirschsprung est une maladie congénitale due à l'absence de neurones sur une partie de l'intestin. La maladie de Hirschsprung a une incidence annuelle de 1/5000 naissances. Elle se manifeste peu de temps après la naissance par des symptômes tels que l'impossibilité d'expulser les selles, des douleurs abdominales, une distension abdominale progressive, des vomissements, ... Plus rarement elle se manifeste plus tard dans l'enfance par des symptômes de constipation sévère et de retard de croissance. La prise en charge de ces enfants est avant tout une prise en charge chirurgicale en général à 1 ou 2 mois de vie. La chirurgie consiste à retirer le segment intestinal malade. Le pronostic vital de ces enfants est cependant grevé par la survenue possible d'une complication appelée entérocolite. L'entérocolite est une complication classique mais grave, potentiellement mortelle de la maladie de Hirschsprung. Il s'agit d'une infection digestive majeure par prolifération des bactéries dans le tube digestif qui peuvent dans un second temps passer dans le sang et entraîner une infection générale sévère voire la mort. L'entérocolite peut se déclencher aussi bien avant qu'après la chirurgie et se manifeste par une distension abdominale majeure, une diarrhée explosive, de la fièvre jusqu'au choc septique. Les facteurs influençant la survenue d'une entérocolite sont complexes et actuellement peu connus. Il est indispensable d'améliorer nos connaissances sur cette maladie grave pour pouvoir la prévenir ou tout au moins la traiter plus efficacement. Des modèles de Hirschsprung existent chez la souris et le rat mais le développement post-natal de l'intestin de ces animaux est très éloigné de celui de l'Homme, rendant difficile les extrapolations à l'Homme.

L'objectif de notre étude est de créer un modèle animal de la maladie de Hirschsprung plus proche de l'Homme pour ensuite étudier les différents facteurs impliqués dans la survenue d'entérocolite. Le Porc a été retenu car il s'agit de l'animal dont le système digestif est le plus proche du système digestif humain, en termes de fonctionnement et de développement post-natal. Pour créer ce modèle, nous détruirons les neurones entériques sur une partie du rectum des porcelets en appliquant du Benzalkonium chlorure (BAC) sur le rectum sous anesthésie générale. Ce protocole a déjà été décrit et validé chez la souris. La première expérience préliminaire, a pour objectif de déterminer les conditions précises de la création de ce modèle et plus particulièrement la concentration de BAC à utiliser (n= 6 à 12 porcelets). La deuxième expérience a pour objectif de comparer des porcelets traités par BAC (n = 16) à des porcelets non traités (n = 16). Les porcelets seront euthanasiés après 2 et 4 semaines pour étudier la barrière intestinale, le microbiote et l'immunité.

Le protocole a été élaboré dans le respect de la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) en réalisant le projet en 2 procédures permettant de mettre au point le modèle sur un nombre restreint d'animaux dans un premier temps puis d'analyser les conséquences de cette intervention sur le développement post-natal de l'intestin dans un deuxième temps. Dans les deux procédures, la douleur sera prise en charge par des méthodes appropriées d'analgésie péri-opératoire et le stress et l'angoisse minimisés en gardant le lien social entre animaux. Enfin, le projet s'intéressant des phénomènes physiologiques complexes et développementaux, le recours à un modèle animal est indispensable.

3394. Le virus Ebola provoque une maladie aiguë et grave, souvent mortelle. La maladie à virus Ebola est apparue pour la première fois en 1976, lors de deux flambées simultanées à Nzara (Soudan) et à Yambuku (République démocratique du Congo). Yambuku étant situé près de la rivière Ebola, celle-ci a donné son nom à la maladie.

Les flambées de fièvre hémorragique provoquées par le virus Ebola surviennent principalement en Afrique avec un taux de mortalité variant de 25% à 90% selon le type de virus et les conditions de prise en charge. La précocité et la qualité de cette prise en charge jouent un rôle important pour diminuer la mortalité associée à la maladie

La flambée qui sévit actuellement en Afrique de l'Ouest (dont les premiers cas ont été notifiés en mars 2014) est la plus importante et la plus complexe depuis la découverte du virus en 1976. Elle a produit plus de cas et de décès que toutes les précédentes flambées réunies. Cette flambée a également comme particularité de s'être propagée d'un pays à l'autre, partant de la Guinée pour toucher la Sierra Leone et le Libéria (en traversant les frontières terrestres), le Nigéria (par l'intermédiaire d'un seul voyageur aérien) et le Sénégal (par l'intermédiaire d'un voyageur arrivé par voie terrestre). D'après de récentes données, l'épidémie a provoqué plus de 28000 cas dont 11000 décès.

Les pays les plus touchés (la Guinée, la Sierra Leone et le Libéria) ont des systèmes de santé très fragiles. Le 8 août 2014, il a été déclaré que cette flambée constituait une urgence de santé publique de portée internationale.

Le virus Ebola appartient à la famille des Filovirus. Cinq souches ont été identifiées : Zaïre, Bundibugyo, Soudan, Reston et Côte d'Ivoire. Le virus à l'origine de la flambée 2014 en Afrique de l'Ouest appartient à la souche Zaïre (appelée également souche Gabon) et a été isolé sous le nom de Ebola Makona.

Le but de ce projet est d'étudier l'efficacité de candidat vaccin dans un contexte de challenge avec le virus Ebola Makona chez le macaque cynomolgus. Deux doses de virus seront testées.

La partie vaccination fait l'objet d'une demande d'autorisation séparée car effectuée dans une autre animalerie.

Ce projet nécessite l'utilisation de 24 macaques cynomolgus répartis en deux procédures.

Conformité avec les 3R :

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats interprétables.

Le macaque est le seul modèle animal sensible à l'infection par la souche sauvage du virus Ebola. Dans le cadre de ce projet, l'utilisation des macaques est indispensable à la bonne réalisation des procédures expérimentales.

Afin de raffiner l'expérimentation, une attention particulière sera portée sur l'enrichissement alimentaire, l'enrichissement de confort et sur l'enrichissement de stimulation. Le bien-être animal sera suivi à l'aide d'un scoring qui reprend les observations du comportement, de la prise alimentaire et hydrique, des symptômes hémorragiques. Les animaux seront visités quotidiennement et observés par un personnel avisé et qualifié. Le temps de travail en animalerie A4 étant règlementée, la vidéosurveillance permet également de revoir le comportement des animaux pendant les périodes où ils ne sont pas stimulés par la présence des techniciens.

3395. Ce projet s'inscrit dans un ensemble de travaux visant à comprendre le rôle de la chromatine dans l'établissement et le maintien des rythmes circadiens. Les horloges circadiennes sont des oscillateurs omniprésents permettant aux animaux d'adapter et de coordonner leur physiologie intrinsèque aux changements environnementaux. L'implication de dysfonctionnements de l'horloge circadienne dans certaines maladies ou syndromes comme les troubles du sommeil, la dépression, l'obésité ou la susceptibilité à certains cancers a également été démontrée. Dans la plupart des tissus mammifères, les horloges contrôlent de façon spatiotemporelle des événements transcriptionnels tout en préservant la plasticité du génome. En plus des facteurs de transcription de l'horloge, de nombreuses protéines de remodelage de la chromatine et des phénomènes épigénétiques ont récemment été impliqués dans l'expression rythmique des gènes et le fonctionnement de l'horloge. Dans des études préliminaires, il est montré que les facteurs épigénétiques essentiels, les variants d'histones H2AZ et H3.3, régulent l'horloge dans les tissus périphériques murins. L'objectif de cette demande est maintenant de caractériser le rôle des protéines H2AZ et H3.3 à la fois dans l'horloge centrale localisée dans le noyau suprachiasmatique et dans les horloges périphériques comme le foie, en combinant approches génétiques chez la souris, comportementales et analyses à grande échelle du génome.

Cette étude contribuera à progresser dans la compréhension du rôle exercé par les mécanismes épigénétiques dans le contrôle de l'horloge centrale et des horloges périphériques.

Elle repose sur l'analyse par imagerie de bioluminescence de lignées rapportrices des différents variants d'histones dans différents contextes : au cours du vieillissement, sous différents régimes alimentaires et différentes conditions de Jet-Lag.

Aucune souffrance animale n'est attendue lors de ces procédures.

Comme la complexité de l'environnement tissulaire et le réseau complexe des mécanismes impliqués ne peuvent pas être reproduits in vitro, cette étude nécessite la réalisation d'expériences dans un environnement intégral, à l'échelle de l'animal.

En parallèle, des études in vitro sont réalisées pour aborder les interactions et les voies de signalisation moléculaires impliquées. Pour les études in vivo, nous travaillons avec le modèle souris car actuellement c'est la seule espèce chez laquelle il existe des modèles de variants d'histones, lesquels sont identiques entre l'homme et la souris et des modèles rapporteurs du rythme circadien.

Conformément aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, les animaux seront produits à minima, sans compromettre les objectifs du projet et tout en permettant une exploitation statistique des résultats. Les conditions d'hébergement et de soins utilisées et des points limites adaptés associés à des procédures de surveillance des animaux seront appliquées dans le respect du bien-être animal, ceci afin de limiter au maximum la souffrance subie par l'animal.

Ce projet concernera au maximum 672 souris.

3396. Le cancer est un problème majeur de santé publique. La mort des patients est due à la généralisation du cancer, se traduisant par la formation de métastases. Nos défenses naturelles par l'intermédiaire de notre système immunitaire sont capables de détecter une cellule tumorale comme un signal de danger pour notre organisme et de l'éliminer. Cependant, ce

processus de surveillance ne permet pas toujours de bloquer le développement tumoral en raison de la mise en place par la tumeur de mécanismes pour échapper au contrôle de notre système immunitaire. Par ailleurs, des thérapies ciblant le système immunitaire se sont montrées très efficaces récemment dans le traitement de certains types de cancer mais seulement chez un faible nombre de patients. Ainsi, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques reste un enjeu majeur pour les patients en échec thérapeutique. Dans ce contexte, nous nous intéressons à un facteur soluble appelé interleukine (IL)-33 dans la défense immunitaire de notre organisme contre les tumeurs. Plus précisément, notre projet de recherche a pour objectif de démontrer le rôle de l'IL-33 dans l'activation des cellules naturelles tueuses (cellules NK) qui possèdent des propriétés anti-tumorales importantes, notamment au cours du processus de métastases. Pour cela, nous utiliserons un modèle de métastases pulmonaires dont la formation est limitée par les cellules NK. Le signal activant les cellules NK dans ce modèle est encore inconnu et nous émettons l'hypothèse qu'il pourrait s'agir de l'IL-33.

Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie.

La compréhension des mécanismes de reconnaissance et d'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire est un enjeu majeur aujourd'hui en cancérologie dans la perspective d'exploiter ce potentiel dans de nouvelles approches d'immunothérapie. Les cellules NK jouent un rôle majeur dans la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales grâce à leur sécrétion de molécules immunoactivatrices et leur capacité à lyser les cellules tumorales. Cependant, dans les tumeurs avancées les fonctions anti-tumorales des cellules NK sont fréquemment altérées. Ainsi, l'identification de molécules capables d'activer les fonctions anti-tumorales des cellules NK représente une piste thérapeutique intéressante. Nous pensons qu'étudier le rôle de l'IL-33 dans l'immunité anti-tumorale, notamment via l'activation des cellules NK, devrait déboucher sur l'identification d'un nouveau mécanisme de surveillance immunitaire et potentiellement d'une nouvelle cible thérapeutique permettant de moduler l'immunité dans le cancer du sein.

Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement et nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Seul un modèle in vivo chez l'animal peut permettre d'étudier les interactions complexes entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires présentes au sein du stroma, notamment dans le cadre de la formation de métastases qui est impossible à modéliser in vitro. Le nombre maximal de souris utilisées dans ce projet (n=100) a été réduit au minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et reproductibles. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par des personnels compétents permettra de limiter au maximum toute souffrance animale.

3397. Selon l'enquête épidémiologique française réalisée en 2012 par ObÉpi-Roche, près de 50 % des Français sont en surpoids ou obèses. L'obésité constitue l'une des premières causes d'hépatopathie (maladie du foie) en France et est reconnue comme un important problème de santé publique. Il n'existe pas de traitements pharmacologiques efficaces de ces maladies du foie.

Il est donc urgent de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ces atteintes hépatiques (inflammation, fibrose, mort cellulaire) et dans leur évolution vers des maladies graves du foie (cirrhose et cancer du foie) afin de proposer des cibles thérapeutiques adaptées.

Il a été montré que l'altération du dialogue entre le foie et le tissu adipeux est une des causes de l'apparition et de l'évolution de ces maladies hépatiques. L'inflammation au niveau de ces deux organes joue un rôle crucial.

Notre équipe de recherche s'intéresse à une protéine qui est exprimée dans les deux organes (foie, tissu adipeux) et dont des données de littérature montrent clairement le rôle dans la régulation des processus de l'inflammation, de mort cellulaire, et de la fibrose (dont le dernier stade est la cirrhose).

Des études chez des souris exprimant ou non la protéine d'intérêt et soumises à des régimes alimentaires spécifiques (riches en graisses) permettront de mieux comprendre son rôle dans les dysfonctionnements entre le tissu adipeux et le foie, l'apparition de l'inflammation connus pour favoriser le développement des maladies hépatiques.

Nous nous concentrerons sur les rôles de la protéine d'intérêt dans certains types cellulaires qui n'ont pas encore été étudiés dans ce contexte. Ces études proposées seront réalisées chez la souris car les approches sur cellules isolées ne permettent pas de mimer la physiopathologie de maladies retrouvées chez l'homme. Il est à noter que les souris déficientes pour la protéine d'intérêt ne présentent aucun phénotype dommageable. De plus, ces études seront réalisées dans le souci d'utiliser un nombre minimum d'animaux (1260 animaux pour toutes les procédures) et leur bien être sera scrupuleusement pris en compte dans toutes les procédures selon la règle des 3 "R".

Pour satisfaire au remplacement, nous avons réalisé des études in vitro sur des lignées d'hépatocytes et de macrophages indiquant le rôle important de notre protéine dans ces 2 types cellulaires. Cependant, pour comprendre l'implication de la protéine d'intérêt dans les complications hépatiques de l'obésité, il est nécessaire de l'étudier chez l'animal car il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de tenir compte de toute la complexité et de toutes les interactions existantes entre les différentes cellules et organes dans un organisme. Pour satisfaire à la réduction. Une gestion éthique de l'élevage nous permettra de ne pas générer d'animaux en excès. Pour satisfaire au raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés avec un enrichissement systématique et les personnes réalisant les différentes procédures respecteront les règles éthiques. La surveillance quotidienne des animaux par les animaliers et nos surveillances régulières nous permettront d'identifier les animaux souffrants et de prendre les mesures nécessaires.

Au cours des procédures décrites les animaux seront soumis : 1) à un régime gras, 2) à un régime déficient en choline et méthionine, 3) à un traitement avec un antibiotique (injection intra-péritoneale), 4) à un traitement avec un agent pro-inflammatoire (injection intra-péritoneale), 5) permettront d'isoler des hépatocytes pour réaliser des cultures primaires.

3398. La prévalence de l'allergie à l'œuf est de 1,5 % de la population générale. C'est une des 3 plus fréquentes allergies de l'enfant âgé de moins de 3 ans, avec le lait de vache et l'arachide et elle touche près de 9,4 % des enfants. Bien que les patients acquièrent une tolérance naturelle au cours du temps, l'allergie à l'œuf persiste de plus en plus tard et cette pathologie prédispose à d'autres maladies allergiques respiratoires notamment. Lors d'ingestion accidentelle de protéines d'œuf, les signes cutanés sont les plus fréquents (eczéma, urticaire) mais peuvent également être plus sévères avec un choc anaphylactique dans 4 à 5 % des cas. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif et le seul traitement repose sur l'éviction alimentaire qui reste très difficile à mettre en place au vue de l'utilisation massive de l'œuf dans l'industrie agro-alimentaire. C'est pourquoi l'allergie à l'œuf est aujourd'hui un problème majeur de santé publique.

Notre équipe a développé un dispositif épicutané unique qui permet l'administration via le système cutané de larges molécules, comme les protéines. La première allergie ciblée était l'allergie à l'arachide. Les études chez l'animal (souris, cobayes, lapins) ont permis de démontrer l'efficacité et l'innocuité du traitement ce qui a conduit à la réalisation d'études clinique de phase I puis II. L'objectif de ce projet est de mettre au point un dispositif épicutané contenant la bonne formulation et le bon dosage et le bon schéma thérapeutique pour désensibiliser aux protéines d'œufs ainsi que de rassembler tous les éléments nécessaires au dossier réglementaire pour réaliser une demande d'essai clinique chez l'homme (enfants, adolescents et adultes) (phase Ib/II).

Pour évaluer ce produit, un modèle murin de sensibilisation aux protéines d'œuf sera développé en tenant compte des modèles déjà décrits dans la littérature scientifique. Aucun test in vitro ne permet d'évaluer complètement la réaction allergique à un aéro-allergène. En effet, les mécanismes immunologiques impliqués dans les maladies allergiques sont très complexes, multi-organes et ne peuvent pas être entièrement reconstitués in vitro. Le recours à l'animal est indispensable à l'évaluation de l'efficacité des traitements. Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). En effet, nous projetons de réduire le nombre de souris utilisé tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, nous envisageons donc d'utiliser 250 souris femelles, âgées de 5 semaines et 36 cobayes de 350 grammes. Le protocole est planifié de telle sorte que toutes les analyses sont réalisées sur le même animal sans créer de souffrance ou de douleur supplémentaire (i.e. analyses de la réponse immunitaire et test de provocation par voie orale). Le bien-être des animaux (raffinement) est également planifié, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées permettant ainsi l'absence de signes de stress et avec un enrichissement du milieu d'hébergement. L'évaluation de l'efficacité du traitement par voie épicutanée ne peut être réalisée dans des modèles in vitro (remplacement) car il est impossible d'évaluer complètement la réaction allergique à un allergène au vue de la complexité des mécanismes immunologiques mis en jeu.

3399. Ce projet s'inscrit dans un ensemble de travaux visant à comprendre le rôle de la chromatine dans l'établissement et le maintien des rythmes circadiens. Les horloges circadiennes sont des oscillateurs omniprésents permettant aux animaux d'adapter et de coordonner leur physiologie intrinsèque aux changements environnementaux. L'implication de dysfonctionnements de l'horloge circadienne dans certaines maladies ou syndromes comme les troubles du sommeil, la dépression, l'obésité ou la susceptibilité à certains cancers a également été démontrée. Dans la plupart des tissus mammifères, les horloges contrôlent de façon spatiotemporelle des événements transcriptionnels tout en préservant la plasticité du génome. En plus des facteurs de transcription de l'horloge, de nombreuses protéines de remodelage de la chromatine et des phénomènes épigénétiques ont récemment été impliqués dans l'expression rythmique des gènes et le fonctionnement de l'horloge. Dans des études préliminaires, il est montré que les facteurs épigénétiques essentiels, les variants d'histones H2AZ et H3.3, régulent l'horloge dans les tissus périphériques murins. L'objectif de cette demande est maintenant de caractériser le rôle des protéines H2AZ et H3.3 à la fois dans l'horloge centrale localisée dans le noyau suprachiasmatique et dans les horloges périphériques comme le foie, en combinant approches génétiques chez la souris, comportementales et analyses à grande échelle du génome.

Cette étude contribuera à progresser dans la compréhension du rôle exercé par les mécanismes épigénétiques dans le contrôle de l'horloge centrale et des horloges périphériques. Elle repose sur l'établissement et l'élevage de lignées par croisement de lignées préexistantes sans phénotype dommageable. Nous n'attendons pas d'effet délétère sur les souris générées. Celles ci seront ensuite utilisées pour des suivis par bioluminescence non invasive in vivo sous différentes conditions environnementales ou des prélèvements de tissus pour des analyses moléculaires et biochimiques. Aucune souffrance animale n'est attendue lors de ces procédures.

Comme la complexité de l'environnement tissulaire et le réseau complexe des mécanismes impliqués ne peuvent pas être reproduits in vitro, cette étude nécessite la réalisation d'expériences dans un environnement intégral, à l'échelle de l'animal. En parallèle, des études in vitro sont réalisées pour aborder les interactions et les voies de signalisation moléculaires impliquées. Pour les études in vivo, nous travaillons avec le modèle souris car actuellement c'est la seule espèce chez laquelle il existe des modèles de variants d'histones, lesquels sont identiques entre l'homme et la souris et des modèles rapporteurs du rythme circadien.

Conformément aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, les animaux seront produits à minima, sans compromettre les objectifs du projet et tout en permettant une exploitation statistique des résultats. Les conditions d'hébergement et de soins utilisées seront appliquées dans le respect du bien-être animal, ceci afin de limiter au maximum la souffrance subie par l'animal. Les animaux et principalement les nouveaux nés issus des nouveaux croisements, seront suivis avec un soin particulier afin de repérer précocement un éventuel phénotype dommageable. Ce projet concernera au maximum 396 souris.

3400. Certains arénavirus sont capables d'infecter l'Homme et de provoquer des fièvres hémorragiques et ont pour réservoir des rongeurs. Le taux de mortalité est variable d'un virus à l'autre et oscille généralement entre 1 à 50% selon l'échantillon considéré. En raison du fort taux de mortalité et de l'absence de traitement spécifique, de nouvelles contre-mesures thérapeutiques sont en cours de développement. Afin de rationaliser notre approche vaccinale, nous cherchons à produire deux vaccins ciblant deux zones géographiques où co-circulent plusieurs virus hautement pathogènes : l'Afrique de l'Ouest avec les virus Lassa et Ebola, et l'Amérique du Sud avec les virus Machupo, Junín, Guanarito, Chapare et Sabiá.

La finalité du projet vise à avoir des candidats vaccins pour une utilisation chez l'Homme. Pour atteindre ce but, après des expériences sur des lignées cellulaires, nous souhaitons évaluer l'innocuité et l'efficacité protectrice des deux candidats vaccins sur modèles animaux. Le projet repose sur l'utilisation de 13 macaques cynomolgus et 47 cobayes Dunkin Hartley pour le candidat vaccin bivalent et celui tétravalent, respectivement. Le nombre d'animaux a été déterminé pour être le plus petit effectif significatif et respecter le principe de réduction. Le macaque est un modèle qui combine plusieurs avantages : disponible en France et très proche de l'Homme tant d'un point de vue immunologique que par la pathologie induite par le virus. L'innocuité du second candidat vaccin va être étudiée sur un modèle animal rongeur, disponible en France et représentatif de la pathologie hémorragique. Les animaux seront hébergés selon les standards en vigueur et sociabilisés sur la durée du projet. Les macaques et cobayes auront accès à un enrichissement alimentaire, de stimulation et de confort adapté spécifiquement à ces espèces. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'animaliers expérimentés. En cas de signes cliniques de l'infection et/ou de l'installation d'un état de prostration, des mesures appropriées seront prises pour limiter au maximum toute douleur, souffrance ou angoisse des animaux.