



**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 (39)

3901. Les traitements immunosuppresseurs ont des effets secondaires importants et n'inhibent que partiellement le rejet chronique en transplantation. Il est donc important de développer de nouvelles thérapies pouvant améliorer l'immunosuppression et induire la tolérance immunitaire. Des premiers essais ont montré que l'utilisation d'anticorps spécifique à action ciblée dans l'organisme pourrait constituer un réactif capable d'induire la survie à long terme de greffons ou encore contrer les mécanismes immunitaires délétères observés lors des maladies autoimmunes telles que le psoriasis, la sclérose en plaques, le lupus systémique érythémateux ou encore l'hémophilie A acquise.

Dans cette optique et pour assurer une sécurité suffisante autour de l'usage d'une nouvelle molécule chez l'Homme, des tests *in vivo* chez l'animal doivent être obligatoirement menés. Ces derniers sont en effet, à l'heure actuelle, indispensables pour compléter les données obtenues *in vitro*. Dans ce projet, l'utilisation du modèle primate est privilégiée. Elle se justifie par la spécificité des molécules à étudier. En effet, il existe une grande proximité phylogénétique entre le primate non humain (PNH) et l'Homme. Il est donc légitime de penser que les résultats observés chez ces animaux seront très utiles pour prédire les mêmes phénomènes physiologiques chez l'Homme.

Les objectifs de ce projet seront donc 1) de vacciner les animaux (n=6) par le BCG et de vérifier leur état d'immunisation contre la tuberculose en réaction à des tests d'Intra Dermo Réaction (IDR) comme réalisé en routine chez l'enfant. 2) de tester une nouvelle molécule thérapeutique et d'en vérifier son efficacité immunosuppressive en contrôlant que les animaux (n=4-6) ne répondent plus au test IDR post-administration de la molécule test. Des prélèvements sanguins de faible volume et peu fréquents, une observation des sites d'administration ainsi que des biopsies permettront de mesurer la réaction immunitaire et de suivre son évolution chez le PNH.

Durant la période couverte par ce projet, il est prévu d'utiliser 20 macaques cynomolgus par an, soit un total de 100 animaux pour 5 ans. Ces animaux seront tous issus d'un élevage agréé. Pour chaque procédure réalisée, il sera veillé à utiliser un nombre minimal et suffisant d'animaux pour que les résultats soient interprétables et transposables à l'Homme.

Les animaux seront suivis individuellement et bi-quotidiennement tout au long de l'étude afin de détecter tout signe clinique de douleur ou de détresse. Des périodes de récupération suffisantes seront accordées aux animaux entre les prélèvements et administrations. Des mesures préventives et correctives de diminution de la douleur et du stress seront déterminées au préalable de la réalisation de chaque procédure. Ceci sur la base des données préliminaires recueillies sur la molécule et ses effets. Dans le cas où les animaux feront l'objet d'une réutilisation (réduction), un avis vétérinaire sera obligatoire pour justifier du bon état de santé des animaux. Une attention particulière sera accordée à l'enrichissement du milieu de vie des animaux. De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations.

3902. L'acide hyaluronique se trouve dans de nombreuses parties de l'organisme et notamment dans le liquide synovial des articulations. Du fait de son poids moléculaire élevé, l'acide hyaluronique garantit l'élasto-viscosité du liquide synovial, permettant à l'articulation de résister au poids, d'absorber les chocs et de faciliter le mouvement.

Son fort pouvoir d'absorption de molécules d'eau confère à l'acide hyaluronique une fonction de régulation dans les échanges et le transport des nutriments nécessaires à la vie du cartilage. L'acide hyaluronique joue ainsi un rôle anti-inflammatoire au niveau de l'articulation, régule la destruction et la réparation du cartilage, prévient l'apparition de la douleur articulaire en protégeant les récepteurs de l'articulation.

La bonne fonction de l'articulation dépend ainsi d'au moins 2 éléments : une concentration et un poids moléculaire d'acide hyaluronique optimaux.

L'arthrose correspond à la perte d'élasticité du liquide synovial, et vient principalement de la perte d'acide hyaluronique. D'où l'idée de réaliser une injection d'acide hyaluronique exogène dans l'articulation pour traiter cette maladie. C'est ce que l'on appelle la viscosupplémentation.

Ce projet a donc pour objectif d'étudier le comportement *in situ* de produits à base d'acide hyaluronique.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable le comportement de produits injectés dans un

organisme entier vivant. Ce comportement dépend de très nombreux facteurs tels que la zone d'injection, les tissus environnants, l'activité de l'animal... Les produits seront donc injectés en intra-articulaire chez le rat ou le cobaye.

Ces deux espèces ont été choisies comme modèle en raison de leur gabarit : il est suffisamment petit pour entrer dans tous les imageurs, et suffisamment grand pour permettre d'injecter des volumes de produit assez élevés pour pouvoir les suivre au cours du temps. De plus, l'anatomie de ces espèces est assez bien connue et leur utilisation en est facilitée (maîtrise de l'anesthésie, de l'accès aux articulations ...). Enfin, une souche sans poils (Hairless) existe pour ces deux espèces, permettant d'obtenir des résultats plus fiables en imagerie optique du fait de l'absence de poils.

Lors de ce projet, l'imagerie médicale sera utilisée afin de suivre l'évolution des produits injectés au cours du temps. Cette technique présente l'avantage d'être non invasive (requiert seulement une anesthésie) et ne nécessite pas de mise à mort d'animaux au cours de l'étude (suivi des mêmes animaux au cours du temps). Elle permet ainsi de diminuer le nombre d'animaux nécessaires.

Le stress des animaux sera pris en charge : en respectant une période d'acclimatation de 7 jours après réception ; en hébergeant les animaux en groupe et en conservant autant que possible les groupes formés afin de maintenir la stabilité hiérarchique établie; et en leur mettant à disposition un enrichissement matériel spécifique à l'espèce utilisée.

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites et - dans la mesure du possible - de les traiter seront mises en place. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires le plus rapidement possible. Toute anomalie clinique sera rapportée au responsable sanitaire de l'établissement. Des mesures thérapeutiques seront prises pour essayer de traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés (injection de fluides / analgésiques, isolement, réchauffement, etc).

Le nombre d'animaux (maximum 50 par étude) sera variable en fonction du nombre de produits à tester et/ou du nombre d'injections par animal, pour un total de 250 rats et de 250 cobayes au maximum sur l'ensemble du projet. Dans tous les cas, un nombre minimal de 6 injections par produit sera nécessaire afin de pouvoir réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus.

3903. La thérapie photodynamique est un traitement alternatif à la chirurgie des petites tumeurs accessibles à la lumière. Ce traitement requiert un agent actif en présence de lumière appelé photosensibilisateur. Pendant l'irradiation lumineuse, la présence d'oxygène est indispensable pour que le photosensibilisateur soit efficace car ce sont les espèces réactives de l'oxygène très toxiques produites par l'activation du PS qui conduisent à l'éradication de la tumeur. La concentration en oxygène dans la plupart des tumeurs cancéreuses étant diminuée (tumeurs hypoxiques), la thérapie photodynamique compense le manque d'oxygène par des doses de photosensibilisateur importantes qui peuvent provoquer chez le patient des effets secondaires indésirables tels que la photosensibilisation cutanée pouvant entraîner des brûlures au niveau de la peau lors de l'exposition à la lumière. La diminution de la dose de photosensibilisateur est donc un enjeu important pour l'application clinique. Après thérapie photodynamique, les expressions de protéines favorisant la recroissance tumorale après traitement sont augmentées. Par conséquent, limiter l'expression de ces protéines pourrait contribuer à améliorer l'efficacité de la thérapie photodynamique. Récemment, il a été montré qu'une molécule polyanionique, connue pour faciliter la libération de l'oxygène des globules rouges vers les tissus hypoxiques, pouvait augmenter la concentration en oxygène d'une tumeur très rapidement après injection chez la souris et la maintenir pendant 6 jours. Une diminution dans la tumeur des protéines pro-cancéreuses désignées précédemment, a été démontrée dès la deuxième injection hebdomadaire de la molécule. L'injection de la molécule polyanionique pendant 3 semaines permet de maintenir les effets.

-- Le but de ce travail est d'optimiser la thérapie photodynamique grâce à l'injection de la molécule polyanionique avant et après thérapie photodynamique. Avant la thérapie photodynamique, l'apport d'oxygène devrait permettre de diminuer les doses de photosensibilisateur pour un effet antitumoral au moins équivalent. Après thérapie photodynamique, l'injection hebdomadaire de la molécule polyanionique pendant trois semaines devrait augmenter l'effet de la thérapie photodynamique en limitant la recroissance tumorale

-- Avantages: La thérapie photodynamique est un traitement non invasif et peu morbide. Les animaux recevront des doses de photosensibilisateur diminuées ce qui réduira le risque d'effets secondaires. La molécule et le photosensibilisateur seront injectés en même temps avant la thérapie photodynamique. Une seule concentration de molécule polyanionique connue pour être non toxique chez l'animal sera expérimentée. La mesure de la croissance tumorale pour évaluer l'efficacité du traitement est une procédure simple, indolore, provoquant peu de stress chez l'animal.

-- Inconvénients: Les gestes invasifs consistent en l'injection de cellules cancéreuses en sous-cutanée, en l'injection intraveineuse du PS et/ou de la molécule polyanionique, cette dernière pouvant être répétée de façon hebdomadaire pendant 3 semaines, et au positionnement de la sonde en intratumoral qui permettra de mesurer la pression partielle d'oxygène (pO₂) dans la tumeur. La thérapie photodynamique peut produire localement une nécrose cutanée et donc une douleur modérée.

-- Espèce animale: souris immunodéprimées permettant l'implantation d'une tumeur d'origine humaine.

-- Nombre d'animaux: Il est prévu 4 animaux par groupe auxquels on ajoutera, si nécessaire, 1 à 4 animaux pour obtenir une différence statistiquement significative (approche statistique séquentielle). Au maximum cela représente 128 souris.

-- Conformément aux exigences de remplacement, des tests in vitro et sur cellules en culture seront réalisés pour estimer la compatibilité du photosensibilisateur avec la molécule polyanionique.

-- Conformément aux exigences de réduction, l'approche statistique séquentielle permet d'utiliser le nombre d'animaux strictement nécessaire.

-- Conformément aux exigences de raffinement, toutes les expérimentations seront réalisées sous anesthésie. Les souris sont placées à l'obscurité après injection du photosensibilisateur pour éviter toute photosensibilité cutanée. Immédiatement et jusqu'à 3 jours après la thérapie photodynamique, un traitement antalgique est systématiquement appliqué pendant 3 jours.

3904. Les arthroses, rhumatismes dégénératifs, et les arthrites rhumatismales, de nature inflammatoire, arrivent au tout premier rang des maladies articulaires. Ces maladies à la fois chroniques et évolutives, dont la prévalence peut dépasser les 90% chez les plus de 65 ans, altèrent la qualité de vie et sont une des principales causes de consultation médicale, de consommation médicamenteuse et d'invalidité. Malgré les avancées récentes, notamment dans le domaine de l'inflammation, la recherche de nouvelles voies thérapeutiques reste d'actualité en physiopathologie articulaire.

Des études ont montré que lors de la survenue de l'arthrose, certains mécanismes de régulation cellulaire étaient anormalement activés conduisant à la perte des caractéristiques normales des chondrocytes (cellules du cartilage). Dans ce cadre, le Dabrafenib et le TAK-632, déjà utilisés anti-tumoraux, pourraient être intéressants. Dans certains cancers comme le mélanome la voie de signalisation Braf/ERK1/2 est activée de manière aberrante conduisant à une prolifération cellulaire. Au cours de l'arthrose, les phases précoces de cette pathologie sont caractérisées par une perte du phénotype chondrocytaire qui serait initié par une activation de la voie ERK1/2 probablement sous l'effet des Wnt. Nous avons montré que l'activation de ERK1/2 dans les chondrocytes par Wnt passe par l'activation de Braf. Dans le cadre de notre étude l'inhibition de Braf a pour objectif d'inhiber la voie ERK1/2 et par conséquent de prévenir la perte du phénotype chondrocytaire (effet observé in vitro sur les chondrocytes en culture) et ainsi le développement de l'arthrose. Ainsi, nous souhaiterions tester le potentiel anti-arthrosique de ces 2 molécules dans un modèle d'arthrose expérimentale par section du ligament croisé antérieur chez le rat. Pour cela, 48 rats Wistar Han, séparés en 6 groupes de 8 animaux, seront utilisés dans cette étude:

- Groupe 1 : Sur le genou droit, nous procéderons juste à une arthrotomie (ouverture chirurgicale de l'articulation) et à une section du ligament croisé antérieur (LCA).

- Groupe 2 : Sur le genou droit, nous procéderons à une arthrotomie et à une section du LCA. Une injection intra-articulaire de l'excipient sera ensuite réalisée dans le genou droit à 1, 2 et 3 semaines après la chirurgie.

Les groupes 1 et 2 serviront à réaliser la faisabilité de l'excipient (DMSO 40%). En cas de toxicité, l'excipient alternatif proposé sera polyéthylène glycol(PEG)400/éthanol/eau (v/v/v).

- Groupe 3 : Sur le genou droit, nous procéderons à une arthrotomie et à une section du LCA. Une injection intra-articulaire de Dabrafenib (2,5 mg/kg) sera réalisée dans le genou droit à 1, 2 et 3 semaines après la chirurgie.

- Groupe 4 : Sur le genou droit, nous procéderons à une arthrotomie et à une section du LCA. Une injection intra-articulaire de Dabrafenib (0,8 mg/kg) sera réalisée dans le genou droit à 1, 2 et 3 semaines après la chirurgie.

- Groupe 5 : Sur le genou droit, nous procéderons à une arthrotomie et à une section du LCA. Une injection intra-articulaire de TAK-632 (3,9 mg/kg) sera réalisée dans le genou droit à 1, 2 et 3 semaines après la chirurgie.

- Groupe 6 : Sur le genou droit, nous procéderons à une arthrotomie et à une section du LCA. Une injection intra-articulaire de TAK-632 (1,3 mg/kg) sera réalisée dans le genou droit à 1, 2 et 3 semaines après la chirurgie.

Deux procédures seront ainsi réalisées: 1) la section du ligament croisé sous anesthésie générale et antalgie, 2) une injection intra-articulaire sous anesthésie générale gazeuse.

L'arthrose est une maladie invalidante mais elle ne peut pas conduire à la mort de l'animal. Dans notre pratique, les rats ne boîtent plus dès le lendemain de l'intervention, ce qui justifie une antalgie péroopératoire et pendant les 48 heures suivantes. Cependant nous surveillerons quotidiennement les animaux et ceux qui présenteront des anomalies du comportement (vocalise, piloérection, cachexie) et/ou une perte de poids supérieure à 20% (sur une semaine sans reprise de poids) seront mis à mort en conformité avec les recommandations éthiques. L'apparition d'une infection articulaire (tuméfaction de l'articulation et boiterie) consécutive à l'intervention (en pratique quasi nulle) nous obligera aussi à mettre à mort l'animal.

Même si des expériences peuvent être menées sur des modèles cellulaires, le modèle animal est indispensable pour connaître les effets de ces molécules dans la réparation du cartilage (Remplacement). Enfin, dans un souci d'éthique, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum et est nécessaire et suffisant pour les études statistiques (Réduction). De plus, seul le coté droit sera opéré de façon à conserver le genou gauche comme témoin. Ce modèle de section du ligament croisé antérieur chez le rat Wistar Han est un modèle connu et maîtrisé d'arthrose (Raffinement). A la fin de l'étude, soit 28 jours après opération, tous les animaux seront mis à mort selon la méthode règlementaire. Les genoux seront prélevés de façon à effectuer les études histologiques et immunohistologiques pour évaluer la gravité des lésions en fonction des traitements.

3905. Les addictions comportementales sont un véritable problème de santé publique, décrites par le DSM 5. L'étude des causes et des traitements de ce phénomène est balbutiante, entres autres en raison de l'absence de modèle animal. L'une des addictions comportementales les plus fréquentes est le jeu pathologique, et en particulier les jeux d'argent. Notre équipe envisage la mise au point d'un modèle animal de la pratique de jeux d'argent pouvant conduire à une addiction comportementale. Une première étape va consister à mettre au point, chez la souris, un protocole amenant l'animal à utiliser des jetons pour obtenir de la nourriture.

Le but de cette expérience est la mise au point d'un protocole de conditionnement instrumental amenant le rongeur à associer la manipulation d'un jeton avec l'obtention de nourriture.

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

Raffinement : le protocole utilisé est basé sur un conditionnement instrumental, c'est à dire sur le fait que l'animal doit effectuer une action pour atteindre un objectif : en cela, la situation est proche de ce qui se passe chez l'Homme. En outre, les animaux se trouvent en élevage enrichi, ce qui favorise leur bien-être (tubes, cabanes, igloo et smarthome®).

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée car il repose sur l'étude du comportement animal.

Réduction : les observations comportementales nécessitent un nombre suffisant d'animaux, au total 16 souris seront utilisées dans cette étude.

3906. Le projet consiste à explorer les conséquences d'un accident vasculaire cérébral sur l'agrégation pathologique des protéines (amyloïde, synucléine, etc) qui caractérise le développement des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, etc.). Ce lien entre pathologie vasculaire et dégénérative reste peu étudié chez l'animal : un nouveau paradigme expérimental est proposé chez le rongeur, basé sur l'injection intracérébrale d'agrégats fibrillaires de protéines, combiné à l'induction d'un accident vasculaire cérébral par occlusion artérielle.

Ce projet comprend à la fois la caractérisation in vivo de l'élimination des agrégats de protéines injectées par imagerie (imagerie par résonance magnétique et/ou tomographie par émission de positons), et l'analyse biochimique et neuropathologique de la fibrillogénèse endogène induite par cette injection. L'objectif est de disséquer le lien entre événements cérébro-vasculaires et démences, de proposer des biomarqueurs d'imagerie, et de tester de nouvelles thérapies.

L'expérimentation sera menée sur des rongeurs (rat et souris), pour lesquels plusieurs modèles d'occlusion artérielle sont disponibles et susceptibles de déclencher des cascades physiopathologiques distinctes (nécrose, apoptose, inflammation) influant différemment sur l'agrégation protéique. Sur l'ensemble de ce projet à caractère exploratoire (5 ans) est envisagée l'utilisation d'un maximum de 200 animaux (rats et souris confondus).

L'imagerie in vivo du petit animal occupe une place centrale dans ce projet en permettant un suivi longitudinal à long terme (plusieurs mois) des animaux, diminuant ainsi leur nombre (réduire). L'imagerie permet également de sélectionner les animaux correctement injectés et/ou ischémiés et donc d'éviter d'inclure des animaux qui ne donneront pas de résultats exploitables sur un protocole de long terme (raffiner). Enfin, nous espérons identifier des facteurs moléculaires et cellulaires clés pour l'interaction entre lésion vasculaire et agrégation protéique, ce qui pourrait ensuite ouvrir la voie à des études sur cultures cellulaires (remplacement).

3907. La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Elle se caractérise par une mort sélective des neurones moteurs situés dans le système nerveux central, par une atrophie musculaire et une paralysie progressive. Le décès des patients intervient trois à cinq ans après le diagnostic. L'axe principal de la pathologie correspond à l'axe moteur, et les principaux tissus impliqués dans la pathologie sont la moelle épinière, les nerfs moteurs et les muscles squelettiques. L'étude de l'interaction de ces 3 acteurs est la clé de la recherche sur cette pathologie. La SLA est une maladie multifactorielle dans laquelle le métabolisme des lipides influence la sévérité de la maladie chez les patients. La littérature montre que le métabolisme de sphingolipides, une classe de lipides complexes, est fortement perturbé chez les patients SLA ainsi que dans des modèles murins de dénervation musculaire. Notre hypothèse de travail actuelle est que la synthèse de sphingolipides est requise pour la maintenance et surtout la régénérescence des unités motrices. Nous proposons ici de moduler ces lipides par une approche pharmacologique dans un modèle murin de la sclérose latérale amyotrophique, les souris SOD1.

Notre projet est composé de deux protocoles expérimentaux, correspondant à l'utilisation de deux agents pharmacologiques. Le traitement débutera à un âge présymptomatique et durera 20 jours. Le comportement moteur des animaux sera étudié par des tests moteurs et visuels reconnus, et par des tests biochimiques et biomoléculaires. L'objectif de ce projet est de valider une cible thérapeutique et de tester une nouvelle approche pharmacologique pour la SLA et l'ensemble des maladies de l'axe moteur.

Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation des protocoles.

Ainsi, le nombre de souris incluses dans le projet est lié de la nature des tests statistiques utilisés lors de l'analyse des résultats. Ainsi, 80 souris, dont 48 souris SOD1 et 32 souris non transgéniques, seront incluses dans le projet afin d'obtenir des résultats statistiquement robustes et exploitables. Une réduction du nombre d'animaux risquerait d'invalider la significativité des résultats et donc de l'ensemble du projet.

L'enrichissement de l'environnement des animaux, le maintien des interactions sociales et la surveillance quotidienne des animaux permettront de détecter rapidement et de limiter la souffrance des animaux, et de s'assurer de leurs bien-être. De plus, l'administration des molécules se fera par l'alimentation afin de supprimer le stress lié aux injections intrapéritonéales. Nous avons également favorisé au maximum des tests non-invasifs pour étudier les fonctions motrices des animaux.

La sclérose latérale amyotrophique est une maladie d'origine plurifactorielle et multicellulaire. Les cultures cellulaires ne permettent pas de modéliser de façon satisfaisante la complexité des unités motrices. Nous avons donc besoin de recourir à un modèle animal pour ce projet de recherche. Cependant, le choix des molécules a été orienté grâce à des études de pharmacologie « in vitro », qui ont remplacés des études in vivo.

3908. Avec le vieillissement de la population et l'incapacité du cartilage à se régénérer, les pathologies du cartilage sont de plus en plus fréquentes. En France, 5 millions de personnes sont concernées par cette pathologie. Au cours de la vie, des lésions surviennent généralement sur une matrice saine dans un contexte de traumatisme, d'activités sportives (entorse grave, rupture du ligament croisé antérieur ou encore après luxation rotulienne), de dégénérescence chronique (surchARGE mécanique) ou d'anomalies de l'os sous-chondral (nécrose, ostéochondrite). Ces lésions conduisent à une altération progressive de l'articulation. Le tissu de réparation obtenu se révèle être du fibrocartilage ne possédant pas les caractéristiques biomécaniques et biochimiques du cartilage natif, prompt à une dégradation à court terme. Ces lésions focales

concourent à l'établissement d'une arthrose plus ou moins rapide à long terme. Actuellement aucune thérapie utilisée en pratique clinique ne permet la régénération d'un tissu cartilagineux originel.

L'objectif de ce projet est d'étudier le comportement d'un greffon cartilagineux après implantation en site articulaire chez le rat afin de valider la bio-intégration et la bio-fonctionnalité de ce greffon cartilagineux. Ce greffon cartilagineux a été conçu in vitro par ingénierie tissulaire à partir d'un biomatériau à base de collagène et de cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse humaine de patients jeunes et de patients âgés. Les lésions du cartilage atteignent une population d'âge variable. Pour ces raisons, nous utiliserons une population cellulaire jeune et une population cellulaire âgée dont les capacités de différenciation chondrogénique peuvent diminuer. Le modèle sera réalisé chez le rat immunodéprimé afin d'éviter le rejet du greffon produit à partir de cellules humaines. Il consistera en un forage calibré du cartilage articulaire fémoral (condyle médial) du genou droit. Le genou controlatéral servira de témoin.

Pour cela, 18 rats immunodéprimés (athymiques) séparés en trois groupes :

- groupe 1 : sur le genou droit, nous procéderons à une arthrotomie (ouverture chirurgicale de l'articulation) suivie d'un forage calibré au sein du condyle médial sans greffe d'implant cartilagineux de substitution générant ainsi un tissu de réparation spontanée

- groupe 2 : sur le genou droit, nous procéderons à une arthrotomie suivie d'un forage calibré au sein du condyle médial et d'une greffe d'un implant cartilagineux de substitution obtenu par ingénierie tissulaire à partir d'un biomatériau à base de collagène et de CSMs de patients très jeunes (cellules jeunes)

- groupe 3 : sur le genou droit, nous procéderons à une arthrotomie suivie d'un forage calibré au sein du condyle médial et d'une greffe d'un implant cartilagineux de substitution obtenu par ingénierie tissulaire à partir d'un biomatériau à base de collagène et de CSMs de patients âgés (cellules vieillissantes)

A la fin de l'étude, les animaux seront mis à mort 28 jours après la réalisation du modèle de greffe ostéochondrale et les genoux seront prélevés pour des analyses des caractéristiques mécaniques (données quantitatives) du tissu de réparation et des analyses histologiques et immunohistologiques (données semi-quantitatives) en comparaison avec le cartilage natif du genou controlatéral et le cartilage adjacent au greffon.

Les lésions ostéochondrales et la greffe ne sont pas invalidantes pour l'animal et ne peuvent pas conduire à la mort de l'animal. Dans notre pratique, les rats ne boîtent plus dès le lendemain de l'intervention, ce qui justifie une antalgie péroopératoire et pendant les 48 heures suivantes par buprénorphine (0,05 mg/kg). Cependant nous surveillerons quotidiennement les animaux et ceux qui présenteront des anomalies du comportement (vocalise, piloérection, cachexie) et/ou une perte de poids supérieure à 20% (sur une semaine sans reprise de poids) seront mis à mort en conformité avec les recommandations éthiques. L'apparition d'une infection articulaire (tuméfaction de l'articulation et boiterie) consécutive à l'intervention (en pratique quasi nulle) nous obligera aussi à mettre à mort l'animal.

Ce modèle animal est indispensable pour connaître la biofonctionnalité et le devenir de la greffe cartilagineuse dans le cadre de la thérapie des lésions focales du cartilage. Enfin, dans un souci d'éthique, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum et est nécessaire et suffisant pour les études statistiques. De plus, seul le côté droit sera opéré de façon à conserver le genou gauche comme témoin (Réduction). Ce modèle de greffe ostéochondrale chez le rat athymique est un modèle connu et maîtrisé par notre laboratoire (Raffinement). A la fin de l'étude, soit 28 jours après opération, tous les animaux seront mis à mort selon la méthode réglementaire. Les genoux seront prélevés de façon à effectuer les études histologiques et immunohistologiques pour évaluer la gravité des lésions en fonction des traitements.

3909. La robustesse des poussins futurs poulets de chair définit leur potentiel d'adaptation et leur capacité à endurer différents stress, tout en conservant un potentiel de production élevé. Il s'agit d'un paramètre crucial à optimiser afin de limiter leur mortalité, augmenter leur bien-être et réduire l'usage des antibiotiques durant la phase d'élevage. La robustesse des poussins et les performances zootechniques qui en découlent au cours de l'élevage dépendent de nombreux facteurs comme la qualité des oeufs à couvrir (OAC) dont ils sont issus (elle-même liée à l'âge du troupeau reproducteur et à la durée de stockage des oeufs avant incubation) ou à la durée d'attente des poussins avant l'arrivée en élevage. Ces paramètres sont inhérents à la disponibilité en troupeaux de reproducteurs ainsi qu'aux besoins du marché, et ne peuvent donc pas toujours être optimisés. Ce projet vise à tester différentes actions intervenant lors du stockage des OAC avant incubation et lors de l'attente des poussins avant transport vers les élevages, pour compenser ces situations critiques mais impondérables, afin d'améliorer la robustesse des poussins.

Le projet comprend trois procédures : la première vise à comparer des conditions d'attente optimales des poussins aux conditions habituelles, la deuxième vise à comparer un stockage des OAC à priori optimal à la situation habituelle rencontrée en couvoir, et la troisième consiste en une combinaison des meilleures actions identifiées. Les actions seront appliquées à des OAC ou des poussins provenant de troupeaux reproducteurs en début et milieu de ponte, car les réponses peuvent varier.

A chacune des 3 procédures, 208 + 260 + 296 poussins (futurs poulet de chair) seront utilisés soit au total 764 animaux (dont 374 euthanasiés, les autres utilisés pour des prises de sang). Ils seront élevés avec d'autres poulets en conditions classiques d'élevage : par groupes de 300 animaux dans 15 m² de surface pour avoir une densité ressemblante à celle utilisée en élevage commercial et pour observer les effets sur la litière, comparable aux conditions d'élevage du terrain ou les problèmes de santé et de bien-être sont visibles. 5 répétitions par traitement seront étudiées (5 groupes de 300 animaux), minimum nécessaire pour que l'étude soit statistiquement viable et ainsi parvenir à des résultats fiables pour les mesures zootechniques. La majorité de ces animaux servant pour les mesures zootechniques seront abattus en circuit classique pour commercialisation et consommation.

Les 374 animaux euthanasiés le seront au laboratoire pour les besoins de l'étude : prélèvement de tissus ou de sang important nécessitant la mise à mort pour des mesures de stress oxydatif ou de génomique (étude de l'activation des gènes). De plus, les animaux présentant des signes de souffrance, définis selon une grille préétablie, seront euthanasiés. Pour tous, un étourdissement par électroanesthésie avant la mise à mort sera effectué.

Le projet a donc pour objectif final d'optimiser à la fois les performances d'éclosion et la robustesse des poussins, mais aussi les performances zootechniques, la santé et le bien-être des animaux tout au long de la phase d'élevage, évalués par une approche multicritères (comportement, physiologie) et par le biais d'indicateurs innovants dans le domaine des technologies émergentes.

3910. L'objectif de ce projet est de comparer trois méthodes de conservation du greffon hépatique durant la période de temps qui sépare le prélèvement chez le donneur de la transplantation chez le receveur. Actuellement, la conservation du greffon peut se faire de manière statique (CS), à l'aide d'une solution spécifique, ou de manière dynamique (CD) par perfusion hypothermique continue. Cette seconde méthode est plus performante que la CS grâce à l'apport d'oxygène dissous, ce qui permet aux cellules d'améliorer l'intégrité de leur structure. Cependant, la CD nécessite un appareillage complexe, des produits onéreux et une surveillance permanente qui freinent sa diffusion en pratique clinique. La saturation en oxygène des solutions de CS à l'aide d'un transporteur de haute affinité pourrait assurer une conservation un peu moins égale à celle de la CD. Le but de ce travail sera donc d'évaluer les performances d'une solution de CS du greffon hépatique enrichie en oxygène à l'aide d'une hémoglobine de très haute affinité pour l'oxygène, issue d'un ver marin (HEMARINA-M101®).

Nous utiliserons un modèle de transplantation hépatique chez le porc, que des mises au point préliminaires permettront de valider sur 6 animaux hors expérimentation, puis nous étudierons 3 groupes de cinq animaux transplantés (soit 36 animaux au total : 6 pour les essais préliminaires, puis 15 animaux donneurs, 15 animaux receveurs) :

Le Groupe CS, constitué d'animaux transplantés avec un greffon conservé en ischémie froide (l'organe, non approvisionné en sang, est conservé au froid) sans supplémentation en transporteur d'oxygène.

Le groupe CS-M101®, constitué d'animaux transplantés avec un greffon conservé à l'aide d'une solution identique au groupe CS et supplémentée en M101® saturé en O₂.

Le groupe CD, constitué d'animaux transplantés avec un greffon conservé par perfusion pulsatile hypothermique oxygénée à l'aide d'une solution non supplémentée en transporteur d'oxygène.

Nous pensons que les performances de la conservation statique enrichie en M101 seront supérieures à la conservation statique seule et comparable à la conservation dynamique.

Toutes les interventions seront réalisées sous anesthésie générale et respecteront la charte nationale d'éthique sur l'expérimentation animale. Dix minutes avant la pré-anesthésie, les animaux recevront une prémédication à l'atropine (0,05 mg/kg en sous-cutané). Après une pré-anesthésie à la kétamine (5 mg/kg en intramusculaire, Rhône Mérieux), l'anesthésie sera induite sous masque à l'isoflurane (3-5% v/v, Baxter, France) jusqu'à suppression du réflexe pharyngo-trachéal, puis poursuivie sous intubation. Après intubation, la ventilation se fera par un mélange d'air et d'oxygène. Un niveau chirurgical d'anesthésie sous isoflurane (2-3%, v/v) sera maintenu tout au long de l'acte réalisé sous monitoring et délivré par un respirateur mécanique à pression positive de manière à ce que la MAC (Minimal Alveolar Concentration) soit à minima de 2. La fraction inspirée en oxygène (FiO₂) et le volume courant seront ajustés de manière à ce que la spO₂ mesurée par oxymétrie de pouls (Ohmeda) soit au moins de 98% et que la spCO₂ mesurée par capnométrie infrarouge (Armstrong) soit inférieure à 5%. L'analgésie au cours de l'intervention sera réalisée par l'administration en perfusion de Fentanyl (18 µg/kg/min soit 0,4 ml/min). Une antibioprophylaxie par céfoxitine (1g iv) sera réalisée avant l'incision cutanée. L'analgésie sera complétée au réveil par une dose de chlorhydrate de morphine par voie sous cutanée (10 mg in toto). La survie des animaux, ainsi que les paramètres biologiques de la reprise de fonction des greffons seront étudiés jusqu'au 7ème jour post-opératoire.

Le modèle porcin utilisé dans cette étude est le plus pertinent pour des essais de transplantation d'organe. Le nombre d'animaux par groupe (N=5) a été calculé au minimum pour observer des différences significatives entre modes de conservation des greffons avant transplantation. Les techniques d'anesthésie et de chirurgie employées utilisent des appareillages de pointe et seront réalisées par des chirurgiens spécialistes de la transplantation hépatique chez l'Homme, avec l'aide de personnels compétents en anesthésie et analgésie porcine. Enfin, le suivi et l'analgésie post-opératoires des animaux seront effectués par des personnels compétents de manière à réduire la douleur et la souffrance des animaux.

3911. Avec l'essor des nanotechnologies, de plus en plus de nanoparticules (NPs) sont fabriquées par l'homme pour des applications nombreuses et variées dans le secteur industriel ou le domaine de la santé. Mais, ceci suscite des inquiétudes, car les NPs manufacturées s'apparentent aux particules de la pollution urbaine ou industrielle qui sont mises en cause dans la survenue et l'aggravation de l'asthme allergique, une maladie qui touche plus de 4 millions de personnes en France. Dans ce contexte, il est indispensable d'étudier l'impact des nanoparticules manufacturées sur le poumon, afin d'évaluer les risques sanitaires respiratoires encourus par les travailleurs de l'industrie et la population générale suite au développement des nanotechnologies. Par ailleurs, une meilleure compréhension des caractéristiques physicochimiques qui influencent la toxicité respiratoire des NPs manufacturées permettrait de concevoir des nanomatériaux sûrs. L'étude proposée portera sur 14 à 20 NPs de caractéristiques différentes et nécessitera au maximum 504 souris de souche BALB/c sur une période de 3 ans. Pour respecter la règle des 3R, les particules feront tout d'abord l'objet d'une étude dans des modèles cellulaires humains en culture afin de ne sélectionner que les particules les plus pertinentes à étudier in vivo (6 au maximum sur les 14 à 20 initiales). Ceci permettra de remplacer, et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les particules sélectionnées lors des essais in vitro seront ensuite testées chez la souris, qui est une des espèces de rongeurs couramment utilisées pour l'étude des

pathologies respiratoires. Cette évaluation in vivo est indispensable, car il n'existe pas, à l'heure actuelle, de modèle in vitro validé permettant de mimer les pathologies respiratoires, et notamment l'asthme. De plus, l'utilité des modèles in vitro reste discutée dans la littérature, car ces modèles ne sont pas (ou peu) représentatifs de l'architecture des organes qu'ils sont sensés mimer, et encore moins de l'organisme entier. Toujours afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque NP sera évaluée par étape, i.e. d'abord chez la souris normale, puis dans le modèle d'inflammation aiguë, et enfin dans le modèle d'inflammation allergique, afin de ne retenir à l'étape suivante que les NPs les plus pertinentes. Chaque fois que possible, plusieurs NPs seront évaluées en parallèle, afin de n'utiliser qu'un lot d'animaux contrôle. L'hébergement des animaux se fera par groupe de 4 dans un environnement enrichi, et les individus d'une même cage resteront ensemble tout au long des expérimentations, afin de garantir leur bien-être (raffiner). Les procédures expérimentales seront mises en oeuvre de telle sorte à réduire au maximum le stress, l'inconfort et la souffrance (raffiner). Elles seront réalisées par une seule et même personne expérimentée, suivant des protocoles standardisés, afin de garantir une bonne reproductibilité des expériences et de réduire le nombre d'animaux à engager dans les différents protocoles (réduire). Les traitements seront réalisés sous anesthésie afin d'immobiliser et de tranquilliser l'animal et de palier une douleur (raffiner). L'utilisation d'anti-inflammatoires ou d'antalgiques pour remédier à la souffrance n'est pas souhaitable dans notre projet, car elle influencerait les données recherchées. Aussi, les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne basée sur l'apparence, l'abreuvement, l'alimentation, l'examen clinique et le comportement, tout au long de leur hébergement et des expérimentations, afin d'évaluer la souffrance qui pourrait résulter des traitements. En cas de souffrance, l'animal concerné fera l'objet d'un suivi intensifié. En dernier recours, il sera euthanasié sur la base de points limites bien définis.

3912. Notre sujet de recherche est orienté vers l'étude de la physiopathologie des maladies neuro-développementales d'origine génétique chez l'homme caractérisée par une déficience intellectuelle (DI). De nombreux gènes ont été impliqués dans ces maladies. L'objectif principal de notre travail est de mieux comprendre les rôles de ces gènes et de leurs protéines dans les cellules du système nerveux central ainsi que d'éclaircir les mécanismes soutenant l'apparition de ces maladies chez l'homme et d'ouvrir la voie à de futures approches thérapeutiques. L'utilisation de modèles murins est indispensable pour étudier le développement du cerveau in vivo car aucun modèle d'expérimentation in vitro ne peut mimer ou refléter toute la complexité des phénomènes ayant lieu dans le cerveau. De plus, l'utilisation d'échantillons de cerveaux humains issus de patients atteints de DI est inenvisageable. Pour surmonter ces obstacles, nous avons créé des modèles de souris génétiquement modifiées. Nous proposons ici de tester chez un modèle murin en particulier l'efficacité d'une molécule sur les phénotypes précédemment observés dans ce modèle. Nous espérons que ce projet confortera l'intérêt de cette molécule en tant qu'agent thérapeutique potentiel dans les DI liées certaines mutations génétiques.

Le nombre total de souris utilisées pour ce projet est estimé à 20 (5 animaux par groupe).

Toutefois, nous garderons à l'esprit notre responsabilité de diminuer au maximum le nombre d'animaux expérimentés tout en atteignant le seuil de la significativité statistique. Pour minimiser le nombre d'animaux utilisés, aucune nouvelle expérience ne sera effectuée avant qu'une analyse complète des précédentes n'ait été réalisée.

Nous prendrons en compte avec la plus grande attention le bien-être de nos animaux. L'élevage et la reproduction de nos animaux se font dans un environnement contrôlé permettant une réduction du stress pour l'animal.

3913. Le but de ce projet est d'étudier le développement tumoral, le rôle du microenvironnement ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus.

Pour cela différentes lignées cellulaires cancéreuses fluorescentes seront injectées chez la souris et les tumeurs ainsi générées seront alors analysées in vivo par imagerie intra-vitale. L'approche proposée est originale et innovante. L'équipe est un leader mondial dans cette approche de pointe qui utilise l'imagerie intra-vitale pour visualiser un évènement à l'échelle de la microscopie optique pour le suivre ensuite au niveau de l'échelle de la microscopie électronique (l'acronyme de cette approche est appelé CLEM pour "correlative light and electron microscopy").

Réduire:

Le nombre de souris utilisé a été réduit au plus juste pour pouvoir réaliser une analyse statistique pertinente, sachant que le projet est avant tout descriptif. Aucune étude n'a été publiée abordant cette problématique des mécanismes ultra-structuraux de la progression tumorale.

Raffiner:

Ce projet est basé sur une méthode d'imagerie non invasive sous anesthésie, qui n'induit pas de stress chez l'animal. Des points limites ont été établis pour éviter toute souffrance animale. Les souris sont maintenues en groupe de 5 par cage pour maintenir une interaction entre individus. L'environnement d'élevage est enrichi à l'aide de carrés de cellulose pour la construction des nids et de tunnels et balancelle en plastique rouge pour favoriser l'activité des souris. Les souris ont accès ad libitum à une nourriture de type normal (RM1, Dietex) et à de l'eau filtrée.

Remplacement:

Le modèle animal est nécessaire car il n'existe pas de modèle pour reproduire in vitro la cascade d'évènements qui sont analysés ici.

400 souris seront utilisées dans ce projet.

3914. La maladie d'Alzheimer (MA) est la plus fréquente des démences. L'exploration du cerveau des sujets atteints de cette maladie in vivo par imagerie moléculaire TEP (tomographie par émission de positons) doit permettre de disposer d'un outil de diagnostic sensible et spécifique. Cette méthode nécessite de disposer de traceurs radioactifs, ou radiopharmaceutiques,

spécifiques de la cible cérébrale à explorer qui peut être un récepteur, un transporteur de neurotransmetteur, ou des agrégats de protéines anormales.

Les neurones cholinergiques sont largement impliqués dans les processus affectés au cours de la MA et sont la cible privilégiée des traitements actuels. L'objectif de ce projet est de développer de nouveaux radiopharmaceutiques marqué au ^{18}F pour le diagnostic et le suivi thérapeutique de la MA par imagerie moléculaire TEP de 2 cibles de systèmes cholinergiques : les récepteurs nicotiques $\alpha 7$ ($\text{R}\alpha 7$) et les transporteurs vésiculaires de l'acétylcholine (VAcHT). Les objectifs spécifiques sont d'évaluer ces nouveaux traceurs chez l'animal et de les valider afin de les transposer en clinique humaine.

Remplacement : 180 rats par an mâles adultes Wistar sont nécessaires à la totalité de cette étude préclinique. En effet, cette étude de caractérisation in vivo des radiopharmaceutiques sur des rongeurs ne peut être substituée par une méthode alternative in vitro ou sur cellules.

Réduire : Grâce à une planification rigoureuse des expériences, le nombre d'animaux utilisés proposé est réduit au minimum indispensable afin d'obtenir des résultats interprétables.

Raffinement : De plus, le développement et l'utilisation des techniques d'exploration fonctionnelle in vivo telle que la micro-TEP permettent de considérablement diminuer la pénibilité des expériences subies par l'animal de laboratoire dans l'objectif de réduire la souffrance et le stress de l'animal.

Les animaux hébergés par deux seront en présence d'un enrichissement (tunnel plastique, papier absorbant).

Cette procédure étant peu invasive, les effets secondaires de l'anesthésie sont peu probables, si nous observons une diminution de la fréquence respiratoire et du rythme cardiaque, nous diminuerons la fraction d'isoflurane respirée.

La durée de l'étude est évaluée à 3 ans, le total d'animaux s'élèvera à 540.

3915. Le but de ce projet vise à comprendre le rôle d'une protéine, l'Autotaxine (ATX), naturellement présente dans la circulation sanguine sur le maintien de la masse et de la structure osseuse. Grâce à des modèles de souris, le projet va permettre d'étudier l'effet de l'inhibition conditionnelle globale l'expression de l'Autotaxine au niveau de la structure osseuse que ce soit à l'état normal ainsi qu'en situations pathologiques mimant les pathologies humaines de la perte osseuse dans l'ostéoporose et dans la polyarthrite rhumatoïde. Les animaux seront suivis quotidiennement et toutes les procédures expérimentales seront réalisées en tenant compte de la règle des 3R. Réduire : Le nombre d'animaux sera limité aux seules expériences indispensables. Le nombre d'animaux est estimé à 210 sur une période de 5 ans permettant l'obtention de résultats statistiquement exploitables sans avoir recours à une répétition des protocoles. Remplacer : L'emploi des modèles animaux est nécessaire au projet car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives permettant de reproduire in vitro la complexité physiologique des échanges entre les nombreux types cellulaires responsables de la formation du tissu osseux. Raffiner : Les expériences seront menées sur la base des meilleures connaissances actuelles de l'os humain et de souris à partir des protocoles les plus pertinents réalisés chez la souris. Ces protocoles seront réalisés en tenant compte de la sensibilité des animaux à l'environnement (enrichissement du milieu, soins, suivi du bien être) et à la douleur (traitements antalgiques pré- et post-opératoires, imagerie non-invasive sous anesthésie volatile). Les souris seront mises à mort à la fin des protocoles selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever les échantillons tissulaires permettant une exploitation maximale par des analyses histologiques des données issues de l'expérimentation.

3916. Les complications cardiovasculaires représentent une des premières causes de morbi-mortalité chez les patients âgés. Dans ces pathologies, un défaut de formation des néovaisseaux est constaté. Dans cette étude, ce défaut est exploré dans un modèle de vieillissement vasculaire secondaire à un désordre métabolique, mis au point au laboratoire, et basé sur l'administration d'un régime riche en protéines et pauvre en carbohydrates à des souris âgées de 6 mois à travers des approches précliniques in vivo et ex vivo. Ce projet s'intéresse au rôle d'une protéine présente dans l'endothélium des vaisseaux dans le processus de régénération lié à un désordre métabolique au cours du vieillissement artériel. Afin de mieux définir le rôle de cette protéine dans les pathologies cardiovasculaires liées au vieillissement, nous avons construit un modèle de souris qui ne possède plus cette protéine au niveau de l'endothélium. Dans ce projet, nous nous intéresseront donc au rôle joué par cette protéine dans les anomalies de régénération vasculaire observées lors du vieillissement. Cette étude nécessite un organisme entier et ne peut être réalisée en culture cellulaire. Cette étude portera sur 80 souris et nous utiliserons le modèle in vivo d'ischémie de la patte inférieure où chaque animal pourra être son propre témoin, l'ischémie n'étant réalisée que sur une des deux pattes, et une approche ex vivo avec la mise en culture d'anneaux d'aorte de ces mêmes souris permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux. Pour le raffinement, une échelle de suivi avec un score permettra de proposer une analgésie dès que nécessaire et ce avant de considérer l'euthanasie. Ce travail permettra de montrer le rôle majeur de cette protéine dans les défauts de régénération vasculaire observés lors du vieillissement afin de proposer cette protéine comme cible thérapeutique.

3917. Une tumeur du sein constitue l'apparition d'une grosseur palpable au niveau du sein qui provient du développement anormal du tissu mammaire. Le cancer du sein est donc une tumeur maligne de la glande mammaire. Autrement dit, c'est un cancer qui naît dans les cellules dont la fonction est de sécréter le lait. Il apparaît essentiellement chez la femme, avec 89 cas pour 100 000 (le cancer du sein survient 200 fois moins souvent chez l'homme, qui possède lui aussi des seins, bien qu'atrophés). 500 000 femmes meurent chaque année de ce cancer dans le monde selon l'OMS.

5 à 10 % de ces cancers ont une origine génétique héréditaire ; 85 à 90% des cas (forme dite sporadique ou non-héréditaire) ont des origines environnementales mal comprises. Une proportion importante des cancers du sein sporadiques est induite par des traitements hormonaux chez les femmes présentant une prédisposition à ce type de cancer. Certains choix de mode de

vie (alcool, régime gras, obésité, manque d'exercice physique) ou gynécologiques (première grossesse tardive, absence d'allaitement, etc.) favorisent aussi ce cancer.

L'objectif de cette étude est de montrer l'efficacité de composés immunostimulants contre le développement de tumeurs induites chez le rat femelle. La femelle a été choisie compte-tenu de la prévalence du développement de ces cancers chez la femme. La stimulation du système immunitaire doit permettre de retarder l'apparition des tumeurs ainsi que leur importance en agissant directement sur les cellules tumorales. Le traitement est préventif afin de pouvoir proposer des solutions de prévention aux femmes ayant des cancers d'origine génétique ainsi qu'aux femmes ayant des facteurs de risque environnementaux importants comme l'exposition régulière à des produits chimiques ou un mode de vie augmentant le risque.

Quarante rats femelles seront réparties en 4 groupes de traitements (un groupe sans induction de tumeur servant de contrôle et 3 groupes avec induction de tumeurs) et traitées pendant 7 mois, 5 jours sur 7, par une injection intrapéritonéale (reproduisant une injection dans le ventre pour la femme) avec 3 produits : un placebo, et deux produits reconnus comme immunostimulants (procédure 1). Les tumeurs mammaires sont induites 2 semaines après le début des traitements par une administration orale unique d'un composé chimique ciblant le tissu mammaire (procédure 2). Un suivi du développement des tumeurs est effectué chaque semaine et des prélèvements de sang sont effectués régulièrement pour vérifier les paramètres sanguins et également des marqueurs immunitaires (procédure 3). Le poids des animaux est mesuré 2 fois par semaine et un suivi des prises alimentaire et hydrique est effectué une fois par semaine tout au long de l'expérimentation. La mise à mort des animaux a lieu 26 semaines après l'induction des tumeurs par injection d'une surdose d'anesthésique. Les animaux seront placés à deux par cage (48 x 27 x 20 cm) pendant toute la durée de l'étude, sans enrichissement pour ne pas influencer sur l'induction des tumeurs mammaires et sur les paramètres mesurés au cours de l'étude. Des points limites concernant une perte de poids de 20% du poids maximum ou de 15% cumulés sur 3 jours consécutifs, une souffrance (cachexie, affaiblissement, hypothermie persistante), difficulté à bouger ou à manger, diarrhée pendant au moins 48h, taille des tumeurs importante ou des tumeurs interférant avec la locomotion des animaux, seront suivis et toute atteinte de l'un de ces points limites entrainera la mise à mort des animaux en conformité avec les recommandations éthiques (Raffinement). Des études précédemment réalisées sur ce modèle d'induction de tumeurs mammaires (ne pouvant être effectuées sur des modèles *in vitro*) (Remplacement), ont permis de démontrer que le nombre d'animaux par groupe prévu pour cette étude, 10 rats, permettait d'obtenir des résultats significatifs (Réduction).

Cette étude présente un enjeu socio-économique certain compte-tenu de l'incidence des cancers du sein chez la femme dans le monde. Les composés testés chez le rongeur pourraient ensuite être testés chez l'Homme, ouvrant ainsi la voie à des traitements moins coûteux et surtout avec peu ou pas d'effets secondaires associés.

3918. La Tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle qui permet d'explorer *in vivo* de manière non-invasive chez l'Homme, la physiologie et la physiopathologie du système nerveux central et périphérique. L'imagerie moléculaire en TEP est de plus en plus employée en clinique pour le diagnostic et le suivi thérapeutique de certaines pathologies comme le cancer ou les maladies neurodégénératives. Cette technique nécessite le développement, la validation et l'utilisation de molécules (dites radiotraceuses) spécifiques de cibles moléculaires et impliqués dans les phénomènes biologiques à étudier. Ces molécules, marquées par des isotopes radioactifs, sont injectées par voie intraveineuse avant l'acquisition des images TEP.

La validation de ces radiotraceurs comporte plusieurs étapes depuis la sélection de la molécule, son radiomarquage, sa caractérisation biochimique et pharmacologique *in vitro*, jusqu'à son essai chez l'animal (requis par la réglementation) puis son utilisation chez l'Homme. Ces nouveaux radiotraceurs permettent de réaliser des images de certaines cibles moléculaires (récepteur particulier, dépôt de plaques amyloïdes, etc...) permettant ainsi d'étudier le rôle de ces cibles dans certaines pathologies.

3919. Le but de ce projet est de caractériser et de valider des radiotraceurs pour la TEP chez le rongeur. Ce projet impliquera le développement de 10 radiotraceurs sur une période de 5 ans. L'étape d'évaluation pharmacologique chez le rongeur intervient seulement après une phase de validation chimique et pharmacologique *in vitro* (sur des cellules, des membranes tissulaires, etc..) et constitue l'ultime étape avant son utilisation chez le primate non humain et chez l'Homme

Le nombre d'animaux nécessaire pour cette étude (300 animaux nés et élevés dans un élevage reconnu) a été déterminé grâce à un test statistique appliqué pour chaque expérience, à des données de la littérature, et à des études précédemment réalisées dans le cadre de projet semblables concernant le développement de radiotraceurs pour TEP. Ceci nous a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences.

Les conditions expérimentales mises en œuvre dans ces protocoles sont semblables à celles utilisées chez l'homme (imagerie non invasive, injection d'une dose non pharmacologique de radiotraceur). Par ailleurs, l'animal est anesthésié pendant l'examen. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre les traitements appropriés.

Afin qu'un nouveau composé devienne un médicament sûr et efficace, un ensemble d'études expérimentales utilisant des animaux est nécessaire. Dans ce contexte, il s'agit ici de mettre en place un modèle d'insuffisance hépatique chez le rat afin d'évaluer dans un autre projet l'efficacité de produits à tester dont la visée thérapeutique est le traitement de cette maladie. Le

recourt à l'animal est nécessaire car l'utilisation de cellules hépatiques seules ou de foie isolé ne permettrait pas d'atteindre l'objectif de l'étude.

Pour cela, trente rats seront utilisés dans la mise en place du modèle, ce nombre d'animaux correspondant au minimum afin d'évaluer plusieurs doses et obtenir des résultats pertinents. Ces animaux seront hébergés selon les standards en vigueur et feront l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. Ils recevront par voie orale un produit de référence pour une durée maximale de 21 jours, couvrant la mise en place de l'insuffisance et l'administration du produit qui sera testé dans un futur projet. Un certain nombre d'examen seront réalisés afin d'évaluer l'insuffisance hépatique et des mesures appropriées seront prises pour maintenir le bien-être des animaux.

3920. Les complications cardiovasculaires représentent une des premières causes de morbi-mortalité chez les patients âgés. Dans ces pathologies, un défaut de formation des néovaisseaux est constaté. Dans cette étude, ce défaut est exploré dans un modèle de vieillissement vasculaire secondaire à un désordre métabolique, mis au point au laboratoire, et basé sur l'administration d'un régime riche en protéines et pauvre en carbohydrates à des souris âgées de 6 mois à travers des approches précliniques *in vivo* et *ex vivo*. Ce projet s'intéresse au rôle d'une protéine présente dans l'endothélium des vaisseaux dans le processus de régénération lié à un désordre métabolique au cours du vieillissement artériel. Afin de mieux définir le rôle de cette protéine dans les pathologies cardiovasculaires liées au vieillissement, nous avons construit un modèle de souris qui ne possède plus cette protéine au niveau de l'endothélium. Dans ce projet, nous nous intéresseront donc au rôle joué par cette protéine dans les anomalies de régénération vasculaire observées lors du vieillissement. Cette étude nécessite un organisme entier et ne peut être réalisée en culture cellulaire. Cette étude portera sur 80 souris et nous utiliserons le modèle *in vivo* d'ischémie de la patte inférieure où chaque animal pourra être son propre témoin, l'ischémie n'étant réalisée que sur une des deux pattes, et une approche *ex vivo* avec la mise en culture d'anneaux d'aorte de ces mêmes souris permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux. Pour le raffinement, une échelle de suivi avec un score permettra de proposer une analgésie dès que nécessaire et ce avant de considérer l'euthanasie. Ce travail permettra de montrer le rôle majeur de cette protéine dans les défauts de régénération vasculaire observés lors du vieillissement afin de proposer cette protéine comme cible thérapeutique.

3921. La maladie de Marek, causée par un virus, est associée à un cancer mortel chez la poule, de type lymphome. Les vaccins utilisés depuis les années 1970 préviennent la formation des tumeurs mais n'empêchent pas la propagation du virus encore très présent dans les élevages à l'échelle mondiale. Cette infection provoque une diminution marquée de l'efficacité de la réponse immunitaire, ou immunosuppression (IS) : bien que transitoire, elle est susceptible d'accroître la vulnérabilité des animaux à d'autres agents infectieux présents dans les élevages et de diminuer l'efficacité de la réponse aux vaccins administrés aux poussins.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de l'IS restent encore méconnus à l'heure actuelle.

L'objectif du projet proposé est d'étudier, suite à l'infection virale, les mécanismes à l'origine de l'atrophie des organes impliqués dans la réponse immunitaire. Nous souhaitons également proposer une méthode non invasive pour le diagnostic de l'IS.

Les infections expérimentales seront menées sur des poussins de 2 jours et se dérouleront dans les deux semaines suivant l'infection, avant le début du développement attendu des tumeurs.

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

- Réduction : nous suivrons plusieurs paramètres biologiques en parallèle. De plus, un même lot de poussins sera utilisé pour deux expériences.
- Raffinement : Afin d'assurer le bien-être des animaux, les expériences se dérouleront avant le début de la phase tumorale de la maladie de Marek. Les poussins seront observés tous les jours afin de repérer d'éventuels signes cliniques, et leur milieu sera enrichi (jouets suspendus).
- Remplacement : Il n'existe à ce jour aucune véritable méthode *in vitro* pour appréhender l'immunosuppression chez les oiseaux et donc de remplacer l'expérimentation *in vivo*; Dans une perspective de remplacement, nous effectuerons en parallèle des expériences *in vitro* sur culture de cellules de l'immunité.

L'ensemble de ce projet nécessitera l'utilisation (au maximum) de 334 animaux.

3922. Notre entreprise travaille sur le développement de molécules thérapeutiques permettant de traiter les différents types de fibrose, qui sont un problème de santé majeur.

La fibrose désigne la transformation de certains tissus en un tissu composé de fibres, proche du tissu conjonctif. Elle intervient souvent à la suite d'une lésion tissulaire ou d'une inflammation d'un tissu où ceux-ci ne se régénèrent pas correctement : les tissus initialement sains sont alors remplacés par un tissu fibreux. Lors d'une lésion tissulaire, l'évolution normale se fait vers la cicatrisation. En cas de déséquilibre du système entrant dans ce phénomène de réparation, il y a une production excessive de collagène ce qui conduit vers la fibrose. C'est à peu près le même schéma en cas d'inflammation chronique. La fibrose peut toucher de nombreux organes tels que le pancréas, le rein, la peau, le foie ou le poumon.

A ce jour, aucun médicament utilisé dans le traitement de la fibrose n'a permis de guérir une fibrose établie que ce soit sur le plan histologique ou clinique.

Les composés testés chez l'animal seront sélectionnés à l'aide de tests cellulaires afin de minimiser leur nombre et donc dans le but d'optimiser au maximum le nombre d'animaux utilisés dans les études en respect de la règle des 3R. Seules les molécules présentant une activité sur les tests *in-vitro* et ayant des caractéristiques pharmacocinétiques adéquates seront testées sur les

animaux. Ce système permet de réduire considérablement le nombre de molécules testées chez l'animal et donc le nombre d'animaux utilisés. Nous estimons à environ 10 000 animaux sur 5 ans (8 650 souris et 1 350 rats) le nombre d'animaux utilisés dans les études dédiées au projet fibrose.

lorsque le pic inflammatoire entraînant la fibrose est trop important, les animaux sont euthanasiés dès qu'il y a un signe de souffrance.

il n'y a pas d'anxiété infligée chez l'animal.

3923. La thérapie génique consiste à corriger une maladie héréditaire par un transfert de gène à l'intérieur des cellules malades, ce qui permettra à l'organisme de fabriquer ses propres médicaments pour lutter contre la maladie. Ce transfert de gène est réalisé à l'aide d'un véhicule ou vecteur issu d'un virus qui a été modifié pour ne plus être pathogène (vecteur recombinant). Les vecteurs viraux recombinants dérivés du virus adeno-associé (rAAV) sont des vecteurs de choix pour le transfert de gène à long terme dans différents tissus.

Cependant, l'homme est naturellement exposé au virus et développe une immunité médiée par les anticorps contre la structure externe du virus (la capside). Ces anticorps neutralisants sont capables de reconnaître des structures similaires sur les vecteurs rAAV et d'entraîner la neutralisation des vecteurs injectés qui ne peuvent donc plus atteindre leur cible et permettre un transfert de gène efficace. Aussi, il a été démontré récemment que les anticorps sont capables d'induire la dégradation des virus à l'intérieur des cellules. Par ailleurs, le tropisme et l'efficacité du transfert de gène peuvent être influencés par d'autres facteurs. Ainsi, il est rapporté que l'AAV a la capacité d'interagir avec des protéines du sérum qui facilitent ou inhibent le transfert de gène. In vitro, nous avons mis en évidence que l'AAV interagit avec des protéines intracellulaires, en particulier avec la protéine ligase X. De façon très intéressante, cette protéine réduit l'expression du transgène véhiculé par l'AAV in vitro, ce qui en fait une cible intéressante pour améliorer le transfert de gène médié par l'AAV. Cependant, la protéine ligase X est exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme.

L'étude de cette protéine dans le processus de reconnaissance et de dégradation du vecteur AAV ne pourra se faire que sur des organismes vivants. Ainsi, les modèles animaux sont nécessaires pour évaluer in vivo l'impact de cette protéine sur la reconnaissance de l'AAV pendant le développement animal au cours de plusieurs jours. Cela permet aussi d'évaluer les interactions avec les différents organes et le système immunitaire. Ainsi, seule l'expérimentation utilisant un modèle in vivo mimant le plus fidèlement possible (avec ou sans expression de la protéine ligase X) le microenvironnement cellulaire permettra de répondre à notre problématique.

Pour identifier le rôle de la ligase X dans la reconnaissance, la dégradation intracellulaire du complexe AAV vecteur et anticorps et le déclenchement de la réponse immunitaire, nous utiliserons un modèle déficient en protéine ligase X (modèle murin issu des souris C57BL/6).

Dans le respect de la règle des 3R, une pré-évaluation in vitro de l'effet de la protéine ligase X a été effectuée. Par ailleurs, nous allons faire appel à des techniques permettant l'analyse de plusieurs paramètres sur un même prélèvement, comme par exemple l'analyse des ARN et des protéines à partir des mêmes prélèvements tissulaires. Nous aurons également recours à des techniques d'imagerie sur petit animal pour assurer un suivi longitudinal du vecteur sur les mêmes animaux (suivi dans le temps de l'animal qui reste son propre témoin par le suivi de l'expression du transgène au cours du temps).

En vue de réaliser ce projet, nous souhaiterions étudier un total de 890 souris, ce nombre a été calculé et réduit à l'aide d'un test statistique afin d'obtenir des résultats les plus robustes (Réduction).

L'utilisation de souris déficientes en ligase X nous permettra de comparer le phénotype de souris normales et déficientes sur l'expression du transgène suite à l'administration de l'AAV, si notre hypothèse se confirme, ce projet aura un impact important sur les essais précliniques de thérapie génique médiée par le vecteur AAV, notamment sur la réduction de la dose d'AAV à injecter.

Chaque animal présentera un tableau de suivi afin de s'assurer de l'absence de souffrance de nos souris. Nous nous attacherons également, dans un souci d'application de ces principes, à faire en sorte d'optimiser l'utilisation combinée d'analgésiques et d'anesthésiques lors des différents prélèvements (sang et tissus). Enfin nous optimiserons l'utilisation des animaux entre procédures chaque fois où cela s'avère possible.

3924. Nous avons montré chez les patients tolérant une greffe rénale la présence d'un nombre plus élevé de lymphocytes B (LB) sécrétant du granzyme B (GZMB) et capable d'inhiber la prolifération des LT effecteurs de façon dose dépendante (Chesneau et al. JASN, 2015). Le granzyme B est une sérine protéase principalement connue pour son rôle cytotoxique sur les cellules immunitaires. Il est essentiellement décrit comme étant sécrété par les cellules cytotoxiques (lymphocytes T et NK) induisant la mort par apoptose des cellules cibles. La sécrétion de GZMB par les LB n'a été décrite que très récemment et son rôle régulateur n'a jamais été démontré in vivo. Afin d'étudier plus en détail le rôle régulateur des LB GZMB+ nous avons dans un premier temps cherché à expandre les LB GZMB+ qui sont présents en très faible quantité dans le sang d'individus sains (<1 % des LB). Nous avons ensuite montré in vitro que les LB expandus après 3 jours de culture gardent une fonction régulatrice sur la prolifération des LT effecteurs. Ces LB GZMB+ expandus pourraient constituer un intérêt thérapeutique très intéressant en transplantation d'organes solides et pour les maladies auto-immunes. Cependant, à ce stade de l'étude nous devons démontrer que ces LB GZMB+ après expansion gardent leur fonction régulatrice in vivo. Pour ce projet nous voulons utiliser des souris humanisées chez lesquelles nous allons induire une réaction du greffon contre l'hôte (GVHD pour Graft Versus host disease). L'injection de cellules humaines chez une souris immunodéficiente (NOD/SCID.IL2R gamma-/-) induit une réaction du greffon contre l'hôte qui se traduit par une perte de poids de l'animal. L'objectif de ce projet étant de voir l'effet régulateur in vivo des LB GZMB+ après expansion. L'effet régulateur des LB GZMB+ in vivo pourra être vérifié dans le cas d'un retard

significatif de l'apparition de la GVHD chez les souris ayant reçu les PBMCs enrichis en LB après expansion comparé aux souris ayant reçu les PBMCs seuls.

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

- Remplacer : L'étude de la fonction régulatrice des LB GZMB+ dans un modèle de GVHD chez la souris NSG humanisée permettra de réduire l'administration des drogues immunosuppressives classiques ayant des effets indésirables en transplantation. Le modèle de souris humanisée est une alternative à l'utilisation préclinique de primates.

- Réduire : les données issues de cette saisine, combinées aux résultats obtenus in vivo dans le modèle GVHD permettront de confirmer le potentiel thérapeutique des LB GZMB+ après expansion. Nous prévoyons dans un premier temps 3 groupes de 10 souris. Pour évaluer l'effet immunosuppresseur des LB GZMB+ après expansion et en fonction des résultats obtenus avec les 3 premiers groupes, 9 groupes de 5 souris seront réalisés.

- Raffiner : Les animaux seront pesés et évalués 3 fois / semaine après l'injection des cellules et seront euthanasiés lorsque les animaux atteindront une perte de poids consécutive de 20 % et/ou lorsque les signes cliniques notables ou sévères seront atteints. Tous les animaux seront analysés post-mortem par des études histologiques permettant de caractériser la réponse immunitaire.

Le nombre total d'animaux s'élèvera au maximum à 75 souris.

3925. Le bisphénol A (BPA) est une substance chimique qui rentre dans la composition de plastiques et de résines largement utilisés dans les emballages alimentaires. Il peut migrer dans les aliments et les boissons stockés et constitue donc un contaminant alimentaire.

Le BPA est parmi les contaminants les plus préoccupants en raison de son potentiel oestrogéno-mimétique et de son omniprésence. En particulier, l'exposition du fœtus au BPA doit être évaluée en raison de sa susceptibilité importante aux effets des substances œstrogéniques et du passage avéré du BPA à travers le placenta. Pour répondre à cette problématique, nous avons développé au laboratoire le modèle du fœtus ovin instrumenté qui est pertinent du point de vue de la physiologie fœtale. Ce modèle animal consiste en un fœtus ovin au dernier tiers de gestation dont les vaisseaux sanguins sont cathétérisés au cours d'une intervention chirurgicale pour permettre de réaliser des administrations intraveineuses et des prélèvements sanguins répétés sur une période de plusieurs semaines. L'intérêt de ce modèle est qu'il autorise la réalisation de prélèvements sanguins répétés du côté fœtal et du côté maternel, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux dans le respect des 3Rs et d'accroître la précision des mesures alors que les rongeurs ne peuvent être prélevés qu'une seule fois. Le projet vise à réaliser sur des brebis gravides des expériences de toxicocinétique afin de déterminer les facteurs déterminant l'exposition fœtale au BPA et à ses métabolites. Pour cela, des prélèvements sanguins répétés et des administrations intraveineuses fœtales et maternelles seront réalisées sur différents couples mère fœtus. La complexité des fonctions physiologiques mises en jeu ne permet pas le remplacement du modèle animal intégré par des approches cellulaires forcément réductrices qui ne peuvent mimer les processus d'échanges placentaires. Les brebis seront hébergées dans les installations de l'école vétérinaire, avec à la fois libre accès au pré et à la bergerie en dehors des périodes expérimentales. Les expérimentations ont lieu dans des locaux adaptés, assurant à tout moment le confort et bien-être des animaux. Un lot de 8 animaux sera utilisé pour caractériser à la fois les paramètres pharmacocinétiques fœtaux et maternels du BPA et de son métabolite principal le BPA-glucuronide (BPAG). Un lot de 4 animaux sera utilisé pour caractériser les paramètres pharmacocinétiques fœtaux du Bisphénol A sulfoconjugué (BPA-S, second principal métabolite). Enfin, un lot de 4 animaux sera utilisé pour caractériser spécifiquement la réactivation du BPAG par le fœtus. Les animaux seront ensuite euthanasiés afin de déterminer les tissus fœtaux les plus exposés au BPA. Seize animaux seront donc utilisés pour l'ensemble des expériences décrites concernant le BPA, mais un protocole identique pourra être mis en œuvre pour d'autres molécules à préciser, mais posant des problèmes de santé publique en termes de toxicité. Ainsi un maximum de 32 brebis supplémentaires pourra être utilisé au cours des trois prochaines années, portant le nombre total prévisible à 48 brebis gravides. Le nombre de 16 individus correspond au nombre minimum qui permet d'assurer la reproductibilité des mesures et la robustesse des paramètres estimés pour une molécule.

3926. L'être humain est soumis à l'alternance du cycle veille-sommeil.

L'éveil est un état permettant la réalisation d'activités diverses, durant cet état de vigilance le cerveau reçoit des informations, les analyse pour y répondre de manière adaptée. Le sommeil lent est un état comportemental de repos, au cours duquel l'absence d'activité motrice permet à l'organisme d'assurer les régulations végétatives dans des conditions de dépense énergétique minimale. Le sommeil paradoxal quant à lui, est un état permettant la réalisation des rêves. Le "paradoxe" du sommeil paradoxal se révèle de manière évidente au niveau de l'activité électro-encéphalographique (EEG), où son empreinte ressemble à celle observée lors de l'état d'éveil, et ce malgré les différences cognitives fondamentales qui existent entre ces deux états.

L'objectif de ce projet sera, dans un premier temps, de « dénouer » le paradoxe du sommeil paradoxal. Dans un deuxième temps, de mieux comprendre comment les différents états de vigilance influencent la perception sensorielle au niveau du cortex, là où l'information est intégrée au plus haut niveau.

Toute information circulant d'un relai cortical à un autre est soumise à une modulation générée localement par des cellules spécialisées baptisées « interneurons ». Ce projet utilisera des modèles de souris transgéniques qui marquent spécifiquement ces cellules, permettant leur identification visuelle sous microscopie, et la manipulation précise de leur activité par différentes approches électrophysiologiques.

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

1) Remplacement :

Le sommeil ne peut s'étudier que dans les conditions in vivo chez l'animal entier. 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 à une meilleure compréhension des mécanismes neurophysiologiques régulant les états de vigilance (cycle veille-sommeil-rêve). La souris offre en outre des avantages conséquents (modèles génétiques et identification des neurones plus aisée) pour raffiner notre compréhension des processus d'intégration de l'information sensorielle à un niveau cellulaire.

2) Réduction :

220 souris seront utilisées dans cette étude sur une durée de 4ans. Ce nombre de souris est établi au plus juste à partir de nos précédentes études ainsi que celles publiées par des experts du domaine, dans le but d'obtenir une reproduction fiable de nos expériences, en utilisant les tests statistiques adaptés. Nous avons minimisé le nombre de souris en utilisant chaque animal comme son propre contrôle. Nos procédures ont été établies afin de réduire au maximum le stress des animaux avec des procédures d'habituation appropriées et une attention particulière sera portée à leur bien-être.

3) Raffinement

Les études sur le sommeil nécessitent des observations sur des animaux non anesthésiés vivants dans de bonnes conditions psychophysiologiques. Nos procédures ont été établies afin de réduire au maximum le stress des animaux avec des procédures d'habituation appropriées et une attention particulière sera portée à leur bien-être, notamment par l'inclusion d'un environnement enrichi. L'implantation des électrodes se fait sous anesthésie générale par du personnel compétent. Après la chirurgie les animaux sont laissés au repos un mois, pendant lequel leur bien-être est surveillé quotidiennement.

3927. Comment l'information est-elle traitée dans le cerveau et comment contrôle-il le comportement ? Ce sont des mécanismes beaucoup trop complexes qui ne peuvent être étudiés par de simples systèmes de cultures. Pour répondre à ces questions, il faut un cerveau complet d'un organisme modèle tel que la souris.

Nous utilisons le système olfactif des souris comme système modèle pour répondre à cette question car ce sont des animaux qui sont génétiquement très connus et proche de l'homme et chez qui l'odorat est le sens privilégié. Nous utiliserons des conditionnements olfactifs (comportements appris), des enregistrements optiques de l'activité neuronale (par microscope) et manipulation de l'activité neurale par la lumière pour comprendre comment les stimuli sensoriels provoquent l'activité neuronale et comment cette activité contrôle le comportement olfactif. Les déficits dans le traitement et le comportement sensoriel sont associés aux maladies neurologiques et neuropsychiatriques humaines incluant Alzheimer, crises d'angoisse et dépressions. Une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux de traitements sensoriels pourrait donc conduire à une nouvelle approche thérapeutique plus performante pour l'homme.

Pour toutes nos expériences les souris sont anesthésiées selon les normes officielles. Toute souris ayant subi une expérience sous anesthésie est ensuite placée dans des conditions enrichies pour son bien-être (pièce chauffée, placée sur un tapis chauffant, injection d'anti-douleur et crème cicatrisante, éventuellement enrichissement alimentaire). De plus nous cherchons à minimiser le nombre d'animaux utilisés. En effet, dans notre projet, nous avons optimisé les accouplements afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Nous avons également développés nos conditions d'expérimentations afin d'obtenir des résultats rapidement pour ne pas avoir besoin de les reproduire de nombreuses fois. En effet, nous limitons le stress de l'animal occasionnant des échecs d'expériences grâce à l'utilisation d'une pièce isolée pour limiter le bruit et les stress environnants, optimisation de la température pour le bien être, habituation de l'animal à la manipulation. Enfin chaque animal est utilisé pour répondre à plusieurs questions et les techniques d'imageries choisies par notre projet permettent d'enregistrer de très nombreuses informations.

Il est cependant nécessaire de reproduire les résultats de manière indépendante et d'avoir plusieurs échantillons pour éviter les différences dues à la variabilité biologique. Le nombre de souris estimé entre 870 et 1300.

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. Les souris sont hébergées dans une animalerie nouvellement rénovée. Elles sont sous contrôle de la température et de la lumière (en cycle jour/nuit). Elles bénéficient de l'équipement complet pour leur bien-être (cotons pour leur nid, nourriture et eau libre d'accès, nourriture plus riche si besoin). Les visites pour veiller à leur bien-être sont journalières.

3928. Le projet vise à évaluer l'efficacité de molécules innovantes (autres que des antibiotiques) dans le traitement d'infections bactériennes. Ces molécules permettraient de réduire l'utilisation des antibiotiques et de limiter l'émergence de résistances bactériennes aux antibiotiques. L'efficacité de ces molécules a déjà été prouvée in vitro, il faut maintenant vérifier qu'elles permettent de contrôler une infection sur un organisme intégré. Nous utiliserons pour cela des animaux modèles de laboratoire, pouvant seuls rendre compte de la complexité des processus (absorption, distribution, excrétion des molécules administrées) mis en jeu dans les phénomènes étudiés. Ainsi, 6 groupes de 12 souris seront constitués pour chaque molécule testée. Les souris seront hébergées dans des locaux d'animalerie standardisés, leur assurant les meilleures conditions de bien-être et de santé. Pour les expérimentations, les souris inhaleront des bactéries sans être manipulées ou anesthésiées. Elles seront ensuite traitées par injections avec différentes doses de molécules à tester ou d'antibiotiques (contrôle positif). Les animaux seront euthanasiés en fin de protocole afin de pouvoir évaluer la guérison bactériologique au niveau des poumons. Le protocole initial prévoit de tester 2 molécules et utilisera au total 144 souris (72 souris/molécule testée).

Les infections chroniques par les virus de l'hépatite C (VHC), de l'hépatite B (VHB) et de l'hépatite Delta (VHD) sont un problème majeur de santé publique du fait de leur prévalence élevée (3% de la population mondiale, soit 170 millions d'individus infectés par le VHC et 4.2% soit 240 millions par le VHB). L'infection par le VHD est concomitante à une infection par le VHB et entraîne une aggravation de la maladie hépatique. La sévérité de des complications, cirrhose hépatique et carcinome hépatocellulaire (CHC), font de ces infections l'une des indications majeures de la greffe de foie. La mise au point d'un vaccin contre le VHC a été entravée par le manque d'un petit modèle animal idéal pour l'infection par ce virus. De même, l'investigation de traitements permettant l'éradication du VHB et/ou du VHD ne peut se faire que grâce à la mise au point d'un modèle in vivo permettant le développement d'une infection chronique. En effet, les cellules de foie (hépatocytes) de souris sont naturellement résistantes à l'infection par ces 3 virus. Le chimpanzé a été utilisé pour étudier l'infection aiguë et chronique par le VHC et le VHB mais l'utilisation de ce modèle est interdite en Europe depuis la nouvelle loi relative à l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales. De fait, des modèles animaux alternatifs pour la recherche sur les virus hépatotropes ont été mis au point. Ils sont basés sur l'utilisation de souris immunodéficientes et hépatodéficientes greffées avec des hépatocytes primaires humains (PHH) qui vont pouvoir reconstituer un foie "chimérique". Ces souris FRG-NOD ainsi humanisées peuvent alors être inoculées avec des virus recombinants ou naturels, issu de sérums de patients chroniquement infectés. Notre objectif est donc de produire en routine de telles souris "humanisées" afin d'étudier la carcinogenèse et les interactions virus-hôte et de valider au niveau préclinique les approches thérapeutiques innovantes développées au sein de notre laboratoire. Ces approches sont basées sur l'utilisation d'inhibiteurs viraux (anticorps monoclonaux, molécules chimiques, nanoparticules, ARN interférent...) ou sur des approches d'immunothérapie cellulaires. Ainsi, nous greffons des PHH par injection intrasplénique à des souris âgées de 6 à 8 semaines. La prise de greffe est monitorée par dosage de l'albumine humaine présente dans le sérum de la souris, prélevé 4 et 8 semaines après la greffe. Une fois la greffe établie, les animaux peuvent être inoculés par les virus VHC, VHB +/- VHD, en zone de confinement de sécurité biologique de niveau 3 pour être utilisés en expérimentation. Les niveaux d'infections sont mesurés par détection de l'ADN du VHB ou de l'ARN du VHC ou du VHD dans le sérum des souris inoculées. Il s'agit d'une production en routine. En estimant une vingtaine de greffes par mois pendant 5 ans (durée maximale autorisée), le nombre de souris utilisées devrait avoisiner les 1200. Afin de réduire le nombre de souris nous utilisons un maximum de 5 à 6 souris par groupe expérimental. Afin de raffiner au mieux notre méthodologie, nous avons mis en place des points limites que sont les signes de douleurs persistants plus de 48h post-greffe, ainsi que les dosages de l'albumine humaine sérique. En effet des souris avec des taux inférieurs à 50µg/mL ne pourront être utilisées ultérieurement en expérimentation du fait du faible nombre d'hépatocytes ayant repopulé le foie. Afin de remplacer le plus possible l'utilisation d'animaux pour l'étude des virus hépatotropes, nous réalisons, quand cela est possible un maximum de tests in vitro en lignées cellulaires.

3929. Les troubles neuropsychiatriques sont aujourd'hui les premières causes de souffrance et d'handicap à l'échelle mondiale, avec les pathologies cardiovasculaires et les tumeurs cancéreuses. La résistance aux traitements pharmacologiques classiques a mené au développement d'alternatives thérapeutiques, les plus prometteuses étant les méthodes de neurostimulation. Le progrès considérable réalisé dans les domaines de la stimulation magnétique et électrique profonde souffre cependant de limitations techniques (précision ou chirurgie invasive).

Il a été démontré récemment que la stimulation transcrânienne par ultrasons, c'est à dire des ondes mécaniques, permettait de moduler l'activité électrique cérébrale de façon non-invasive et géométriquement précise, outrepassant les limites des méthodes actuelles. L'altération de l'activité de certaines zones cérébrales étant caractéristique des troubles neuropsychiatriques, la stimulation ultrasonore pourrait prendre place dans l'arsenal thérapeutique.

Malgré cet intérêt théorique et certaines études exploratoires, la stimulation ultrasonore n'a encore jamais été utilisée dans des thématiques cliniques. Les bases méthodologiques et fondamentales de la stimulation ultrasonore doivent donc être consolidées afin de palier à ce problème.

L'objectif de cette étude sera alors d'évaluer la faisabilité de la stimulation ultrasonore chez la souris en testant plusieurs variables propres à cette technique. La capacité des ultrasons à produire une activité cérébrale significative s'observera par stimulation des zones motrices et obtention d'une contraction musculaire en retour, une technique renseignée dans littérature chez l'humain et le rongeur.

Nous chercherons à optimiser les différents paramètres ultrasonores afin d'obtenir une telle intensité de stimulation pour produire une réponse motrice seuil moteur, puis des échantillons cérébraux seront prélevés afin de vérifier l'activation cérébrale du point de vue cellulaire. Une cohorte de 32 souris sera nécessaire afin de tester ces différents paramètres et ainsi optimiser la faisabilité de la stimulation ultrasonore dans de futurs objectifs thérapeutiques.

Les règles de raffinement, remplacement et réduction (3R) sont appliquées à ce projet :

- Raffinement : les différentes procédures seront réalisées sous anesthésie. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu et hébergement en groupe.
- Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée, les procédures doivent être réalisées sur l'animal vivant afin d'engager des études pré-cliniques par la suite
- Réduction : les effectifs sont optimisés, l'évaluation de plusieurs variables méthodologiques nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n = 32). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

3930. Au cours de l'évolution les êtres vivants ont développé des mécanismes leur permettant de s'adapter aux variations journalières et saisonnières de l'environnement, en organisant leur processus biologiques au cours du temps, ceci de manière

à augmenter leurs chances de survie. Pour cela, le cerveau des mammifères et notamment les noyaux suprachiasmatiques (NSC) de l'hypothalamus jouent le rôle d'horloge centrale. Les NSC possèdent une activité pacemaker suivant un rythme d'environ 24h (circadien). Selon le moment de la journée, les NSC par l'intermédiaire de voies nerveuses entraînent l'activation ou l'inactivation de certaines régions cérébrales impliquées dans la réalisation de nombreux processus biologiques (métabolisme, reproduction) qui se déroulent chaque jour à la même heure (par exemple pic de cortisol tous les matins) selon donc un rythme circadien. En outre, cette horloge contrôle la libération uniquement nocturne de mélatonine, une hormone produite au sein de la glande pinéale. La mélatonine joue un rôle d'hormone « donneuse de temps » et permet de synchroniser l'activité de l'organisme avec celle de l'horloge centrale. Ce système répartit ainsi l'ensemble des processus biologiques et comportementaux (régulation de la température, prise alimentaire, sommeil) sur 24h. Afin d'optimiser le déroulement de ces processus avec les facteurs environnementaux, l'activité des NSC et donc la durée du pic de mélatonine sont corrélés à la durée de la photopériode (durée d'ensoleillement sur 24h). La lumière joue donc un rôle de « synchroniseur photique ». Cette synchronisation de l'horloge centrale avec la photopériode n'est possible que grâce à l'activité des photorécepteurs au sein de la rétine. Les cônes et les bâtonnets, qui sont appelés photorécepteurs « classiques », permettent principalement la vision (couleur, forme etc.). Plus récemment, un troisième type de photorécepteurs : les cellules ganglionnaires rétinienne intrinsèquement photosensibles (ipRGCs) à mélanopsine a été décrit comme étant le principal acteur de la perception de la photopériode. Son activation par la lumière entraîne un changement dans l'activité des NSC et permettrait ainsi la synchronisation du rythme circadien interne avec la photopériode. Ce phénomène est notamment responsable de la préparation à l'hibernation et à la reproduction chez certains mammifères qui sont ainsi capables de « mesurer » la photopériode et de différencier les jours longs d'été avec les jours courts d'hiver. Cependant, le rôle de chaque type de photorécepteurs dans la perception de la photopériode n'est pas encore connu. Le but de ce projet est de déterminer le rôle que joue la mélanopsine dans la perception de la photopériode chez le rongeur, par mesure de la libération de mélatonine. Nous porterons une attention particulière aux aspects éthiques de la recherche sur animal. En termes de remplacement, nous ne pouvons pas travailler sur des cellules isolées car notre étude porte sur la rétine, ses projections vers l'hypothalamus et le dosage de l'hormone mélatonine dans le sang des souris. En termes de réduction, nous avons établi un nombre d'animaux à 10 par groupe expérimental (tests statistiques de type ANOVA) pour obtenir des résultats statistiquement valides et nous aurons besoin de 64 souris au total sur 1 an. En termes de raffinement, le milieu sera enrichi avec un nid et un barreau à ronger. Bien que ce projet nécessite une approche invasive (injections dans l'œil, prélèvements sanguins répétés) le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux tout au long de l'expérience (habituation à l'expérimentateur, anesthésiques, analgésiques, suivi du score de douleur).

3931. L'objectif du projet est d'étudier les mécanismes moléculaires de la réplication de l'ADN avec l'aide du système modèle de Xénope. Pendant la division cellulaire le matériel génétique, les chromosomes doivent être dupliqués avant la séparation en deux cellules filles identiques. Cette réplication de l'ADN est un événement fondamental de la prolifération cellulaire. Depuis 30 ans le seul système in vitro de la réplication de l'ADN chez les eucaryotes et le système in vitro utilisant des extraits interphasiques d'œufs de Xénope. Ce système est robuste, reproductible et bénéficie d'années d'expérience de la communauté scientifique.

La réplication démarre à des milliers de sites sur l'ADN appelés origines de réplication. Nous analysons comment différents facteurs régulent le positionnement et le moment d'activation des origines de réplication qui sont mal caractérisés. La dérégulation de l'activation des origines provoque des instabilités génomiques et le cancer, d'où l'intérêt de comprendre les mécanismes d'un point de vue fondamental.

Pour ce projet nous utiliserons 50 femelles *Xenopus laevis* sur 5 ans. Les xénopes sont utilisés pour produire un modèle d'étude in vitro. Les femelles sont réutilisées tous les 6 mois ce qui permet de les habituer à la manipulation, et de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont maintenus dans des conditions recommandées pour l'espèce et la procédure relève du degré de sévérité de classe légère.

3932. Le cerveau est constitué de neurones ainsi que d'un autre type cellulaire au moins aussi abondant appelé astrocytes. Alors que le rôle des premiers dans le fonctionnement cérébral est largement reconnu et étudié, l'implication des astrocytes et de leurs interactions avec les neurones dans le contrôle des fonctions cérébrales dans un contexte normal ou pathologique reste très peu connu. Tel est précisément le but de ce projet.

Pour accéder à l'activité des astrocytes et des neurones, nous travaillerons chez la souris. Notre étude couvre des mécanismes cellulaires et moléculaires qui peuvent être étudiés sur culture mais également des aspects plus comportementaux et impliquant la compréhension du fonctionnement de plusieurs aires cérébrales qui ne peuvent être étudié que chez l'animal entier. Il n'est en effet actuellement pas possible de remplacer les enregistrements du cerveau intact par des simulations ou par des cultures de cellules du cerveau.

Sur les 5 années du projet nous utiliserons entre 2345 et 3350 souris. Nous effectuerons notamment des enregistrements chroniques des activités neuronales et astrocytaires lors de tâches cognitives ou lors de développement de pathologies. Cette chronicité implique un suivi et donc une "réutilisation" des animaux. Ceci permettra de réduire leur effectif tout en minimisant la variabilité inter-animaux.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisé, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante: (1) Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. (2) Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes, et utiliserons anesthésie et analgésie avant chaque procédure chirurgicale de façon adaptée au

poids de l'animal. Les animaux seront logés dans les meilleures conditions possibles. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience, en particulier après les procédures chirurgicales, afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie. (3) Ce projet de recherche implique neurophysiologie et neurosciences comportementales et nécessite des interventions intracérébrales qui ne peuvent se faire que chez l'animal, ainsi que l'étude de rythmes cérébraux et de comportements déjà bien caractérisés chez la souris. Le suivi longitudinal des animaux opérés permet de réduire le nombre de souris utilisées.

3933. La réglementation « bien-être » dans les élevages de porc impose une mise en liberté des truies pendant la gestation, ce qui génère une activité physique supplémentaire des animaux. Pendant la gestation, l'apport alimentaire est restreint afin de limiter un engraissement excessif des truies, tout en couvrant les besoins énergétiques pour l'entretien (incluant une activité physique modérée), la gestation (croissance des porcelets, de l'utérus et préparation de la glande mammaire) et la (re)constitution des réserves corporelles. L'application de la réglementation « bien-être » dans les élevages de production s'accompagne de modifications des bâtiments d'élevage et d'une augmentation générale du niveau d'activité physique des truies, avec également une forte disparité comportementale entre les individus. Il devient ainsi très difficile aujourd'hui de rationner correctement les truies pendant la gestation, du fait d'une méconnaissance du niveau d'activité physique individuel et de la dépense énergétique liée à cette activité physique. L'objectif du projet (faisant partie d'un programme plus vaste de caractérisation du bien-être et de l'activité physique des truies) est de mesurer la dépense énergétique liée à l'activité physique des truies dans des conditions d'activité physique modérée ou plus importante. Le projet sera conduit sur 12 truies de différents âges et poids vifs. Les truies seront équipées de dispositifs de mesure du niveau d'activité physique et elles seront hébergées individuellement en semi-liberté. Elles seront d'abord réparties en deux lots :

- lot 1 : ration quotidienne proposée en un repas journalier
- lot 2 : ration quotidienne proposée en 4 repas journaliers

Après une semaine d'adaptation aux conditions expérimentales, les truies seront placées individuellement en chambre respiratoire pendant une semaine afin de quantifier leur dépense énergétique et analyser la cinétique journalière de cette dépense en liaison avec l'activité physique des truies (conditions d'activité physique modérée). Les truies seront ensuite entraînées à marcher et courir sur un tapis roulant (vitesse variant de 2 à 8 km/h) pendant deux semaines. Chaque truie sera ensuite placée en chambre respiratoire sur le tapis roulant pour 3 séances de mesure de la dépense énergétique en fonction de la vitesse du tapis (2, 5 ou 8 km/h). Chaque séance aura une durée de 20 minutes. Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de caractériser la dépense énergétique des animaux en fonction de leur activité physique. Réduction : le nombre d'animaux et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin de disposer de suffisamment de mesures tout en limitant le nombre d'animaux. Raffinement : en dehors des périodes d'adaptation et de mesures, les truies seront hébergées en groupe. Afin de limiter les effets du cycle sexuel sur le comportement alimentaire, elles recevront un progestagène oral au lieu de subir une ablation chirurgicale des ovaires.

3934. Eu égard au positionnement de l'espèce féline comme sentinelle de populations humaines dans un contexte d'exposition domestique et à la contribution possible du bisphénol A (BPA) à une pathologie endocrinienne majeure dans cette espèce, documenter la pharmacocinétique du BPA chez le chat pourrait présenter un intérêt certain. L'objectif de cette étude sera donc de déterminer dans quelle mesure le chat pourrait être surexposé au BPA du fait du déficit d'expression dans cette espèce de certaines voies de glucuroconjugaison. Dans un premier temps, le dosage sera validé sur un pool de plasma provenant de 3 chats, la cinétique du BPA administré par voie veineuse sera réalisée sur 3 autres animaux afin de déterminer si ce déficit en glucuroconjugaison est associé à une métabolisation différente du BPA. Dans un deuxième temps, et en supposant que la cinétique intraveineuse montre des différences marquées chez le chat par rapport aux autres espèces, la biodisponibilité et autres paramètres pharmacocinétiques du BPA par la voie de contamination préférentielle dans cette espèce, la voie orale résultant de la contamination des aliments en conserve, seront déterminés sur 6 nouveaux animaux. Pour ce faire, on doit disposer sur ces mêmes animaux d'une cinétique par voie veineuse et d'une par voie orale. Afin de réduire le nombre d'interventions et d'échantillons autant que possible, une approche permettant de réaliser simultanément les deux cinétiques sur les mêmes animaux sera privilégiée plutôt qu'un protocole classique en cross over nécessitant deux cinétiques distinctes. Au total 12 chats provenant d'un éleveur agréé seront utilisés. Ils seront hébergés dans les locaux d'animalerie de l'école vétérinaire, adaptés pour leur offrir les meilleures conditions de bien-être pendant toute la période du protocole expérimental.

3936. Le DHA est un acide gras polyinsaturé n-3 essentiel qui participe au bon développement du cerveau chez l'enfant. Le DHA peut être synthétisé in vivo à partir de ses acides gras précurseurs n-3 (ALA, DPA). Cependant, les mammifères n'arrivent pas à synthétiser cet acide gras à un niveau suffisant pour entraîner ses effets bénéfiques connus au niveau des tissus. Il doit donc être apporté directement par l'alimentation mais les sources alimentaires de DHA sont peu présentes dans l'alimentation occidentale humaine. Il faut donc rechercher des solutions pour augmenter la synthèse ou l'assimilation de cet acide gras. La demande d'autorisation concerne l'étude de l'enrichissement du cerveau des nourrissons en DHA chez un modèle rat en fonction de la consommation de 3 acides gras n-3 (ALA, DPA et DHA) et du vecteur d'apport des acides gras. Chez les nourrissons, le DHA ou ses précurseurs sont apportés par le lait, les régimes réalisés à façon utilisés dans cette étude miment donc la formulation de certains laits infantiles.

L'objectif de cette étude est de comparer l'enrichissement de DHA dans le cerveau des nourrissons. Pour cela le métabolisme lipidique des animaux sera étudié en fonction :

- des différents acides gras n-3 apportés par l'alimentation (ALA, DPA, DHA)
- des vecteurs d'apports des acides gras n-3 (matière grasse laitière ou végétale).

Cette expérimentation est réalisée sur 6 lots de 8 rats Sprague-Dawley, soit 48 animaux pris au sevrage et nourris pendant 6 semaines avec un régime dont la part lipidique est fabriquée à façon au laboratoire.

Ce projet se base sur la règle des 3R dans sa démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale. Réduction : Cette étude nutritionnelle nécessite un modèle in vivo pour permettre une approche multi-organes. Le nombre d'animaux par lot est choisi en fonction des données issues d'études similaires de la littérature pour permettre une étude statistique suffisamment puissante des résultats. Raffinement : Une observation quotidienne des animaux est effectuée pour identifier les possibles comportements de stress ou d'anxiété et l'absence de blessures et de maladies. Remplacement : Cette approche in vivo sera complétée par une étude in vitro (non présentée ici) pour l'étude des mécanismes associés.

3937. L'ischémie-reperfusion est une séquence inhérente à la transplantation d'organe solide. L'ischémie correspond à la phase où l'organe du donneur est isolé de la circulation sanguine et subit un défaut d'apport en nutriment et en oxygène. La reperfusion de l'organe chez le receveur se traduit par une reprise de la circulation sanguine en lien avec le retour de l'apport en nutriment et de l'oxygène. Globalement, la séquence d'ischémie-reperfusion est connue pour entraîner des lésions sévères de l'organe transplanté, lesquelles sont reconnues pour induire des dysfonctions d'organe/rejets de greffes à court et long-terme. Or des travaux récents en modélisation animale suggèrent la mise en jeu du système immunitaire dans les lésions tissulaires observées au décours immédiat de la séquence d'ischémie-reperfusion. Notre objectif général est : 1) de caractériser les cellules de l'immunité ainsi que les molécules circulantes de l'inflammation qui sont responsables des effets délétères accompagnant la séquence d'ischémie-reperfusion rénale ; 2) d'explorer si des outils neutralisant les molécules circulantes délétères ainsi identifiées peuvent constituer in fine les cibles de nouvelles armes thérapeutiques pour réduire les rejets de greffe d'organe solide. Pour mener à bien ce programme de recherche, nous utiliserons un modèle murin d'ischémie-reperfusion par clampage-déclampage du pédicule rénal ainsi que le modèle de lésions aiguës rénales induites par le cisplatine, qui ont déjà été tous les deux documentés dans la littérature pour dépendre du système immunitaire. L'implication de cellules immunitaires particulières ainsi que d'une molécule circulante de l'inflammation sera recherchée in vivo en utilisant des souris rendues déficientes par transgénèse spécifiquement pour ces éléments de l'immunité. La règle des 3R a été prise en compte dans ce projet. Ainsi, afin d'étudier la séquence d'ischémie-reperfusion, les méthodes d'étude in vitro sont très limitées en raison de l'absence de vascularisation permanente du rein ou des cellules rénales et de l'impossibilité d'étudier in vitro les multiples conséquences de l'ischémie-reperfusion. Il est donc nécessaire d'évaluer la mise en jeu des éléments immunitaires dans les lésions d'ischémie-reperfusion en utilisant un modèle animal. Le choix porté à la souris repose sur l'utilisation de souris transgéniques irremplaçables et à notre expertise acquise dans la lecture des réponses immunes chez la souris. Pour ce projet de 5 ans, nous utiliserons un total de 864 animaux, minimum requis pour les analyses statistiques, découlant d'un compromis entre les questions de minimisation d'une part et l'accès à l'information scientifique d'autre part, et établi selon les expérimentations antérieures publiées par le laboratoire en modélisation des réponses immunes chez la souris. Toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie et les animaux, hébergés en groupe, bénéficieront d'une analgésie afin de réduire au minimum la douleur liée à la chirurgie.

3938. L'insuffisance cardiaque (IC) a longtemps été associée à une fonction systolique altérée du ventricule gauche (VG; fonction de pompe). Récemment, un «nouveau» sous-type d'IC a été identifié. La moitié des patients en IC a en effet une fonction diastolique altérée en dépit d'une fraction d'éjection (FE) préservée. Cette Insuffisance à Fraction d'Ejection préservée (ICFEp), est en train de devenir un problème de santé majeur. Elle est mal connue, difficile à diagnostiquer et mal soignée. La population âgée, en particulier les femmes, est très concernée avec des impacts médicaux, sociaux et économiques forts.

L'ICFEp est caractérisée par un remodelage cardiaque probablement différent de celui de l'IC systolique malgré des symptômes cliniques semblables. À l'heure actuelle, le traitement de l'IC/EFp est empirique avec un manque de preuves des bénéfices thérapeutiques. Les approches sont réalisées « en aveugle » avec des médicaments utilisés classiquement pour l'IC systolique, mais qui ne marchent pas pour l'ICFEp. Comprendre les mécanismes impliqués constitue un enjeu majeur.

Ce projet propose d'étudier des mécanismes physiopathologiques cellulaires et moléculaires de l'ICFEp sur un modèle expérimental chirurgical (constriction aortique trans-abdominale) induisant une situation pathologique semblable à celle de l'homme. Les résultats devraient nous apporter des éléments solides de compréhension de cette pathologie et, nous l'espérons, ouvrir des voies thérapeutiques. Nous testerons deux candidats médicaments choisis rationnellement par rapport à leurs cibles potentielles.

La partie expérimentale de l'étude est basée sur l'utilisation de rats adultes (nombre estimé : 110 animaux, répartis en 6 groupes expérimentaux sur 3 ans). Nous respecterons le principe des 3 R. Aujourd'hui, aucune alternative basée sur l'utilisation de méthodes in vitro ne peut mimer la pathologie étudiée (absence de connaissances de base des mécanismes impliqués). Si une alternative est identifiée pendant la réalisation de nos travaux, nous Remplacerons notre stratégie immédiatement. Nous avons organisé nos expériences au mieux pour Réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition des données qui seront obtenues en parallèle in vivo et in vitro sur les mêmes animaux (diminution du nombre d'animaux par groupe expérimental). Nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux. Notre étude fournira des informations "pré-cliniques" essentielles pour le développement de médicament chez l'homme.

3939. Les grandes pertes de substance osseuse, secondaires à un traumatisme, une résection tumorale, ou une infection osseuse, représentent un défi en chirurgie orthopédique dû aux défauts de consolidation très fréquemment rencontrés dans ces situations. Afin de remplacer ces pertes de substance osseuse, il est nécessaire de pratiquer une greffe osseuse. Après le sang, l'os est le second tissu le plus transplanté, avec 2,2 millions de greffes réalisées chaque année dans le monde. La greffe osseuse constitue actuellement le traitement de référence pour le comblement de perte de substance osseuse car elle contient toutes les propriétés nécessaires à la régénération du tissu osseux : des facteurs de croissance, des cellules capables de former de l'os et un support. Elle est prélevée sur le patient ce qui occasionne une intervention chirurgicale supplémentaire. La morbidité liée à son prélèvement (saignement important, douleur au site de prélèvement) et la quantité disponible parfois limitée sont autant d'éléments en faveur du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'utilisation de produits d'ingénierie tissulaire combinant un support résorbable associé à des cellules capables de former de l'os constitue une approche intéressante de façon à éviter une deuxième intervention et ses conséquences et à avoir une source inépuisable pour traiter des pertes très étendues.

Depuis plusieurs années, différents produits d'ingénierie tissulaire dans le comblement de grandes pertes de substance osseuse ont été évalués et ont donné des résultats prometteurs mais inconstants. En particulier, des supports coralliens associés à des Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSMs = cellules des cellules) capables de former de l'os) pour remplacer, chez la brebis, une grande perte de substance osseuse ne réparant pas lorsqu'elle est laissée vide (modèle animal de défaut osseux de taille critique). Ces travaux ont apporté la preuve du concept selon laquelle il est possible d'obtenir une réparation osseuse d'un défaut osseux de taille critique en utilisant de tels produits d'ingénierie tissulaire.

De façon à prévoir une utilisation clinique à grande échelle, il est important de standardiser la fabrication du produit d'ingénierie tissulaire et de garantir une homogénéité et une stérilité. Dans ce but des bioréacteurs ont été développés : ceux sont des systèmes clos avec circulation de fluides. Nous avons établi in vitro les conditions nécessaires à ces fins et mis au point des bioréacteurs de grande tailles applicables chez le grand animal. Il n'existe pas d'étude portant sur l'utilisation d'implants coralliens associant des CSMsensemencées en bioréacteurs appliquant de réelles conditions dans un modèle préclinique de large résection segmentaire osseuse. Le modèle consiste en une résection osseuse métatarsienne (os au dessus du sabot) réalisée à la scie et stabilisée par plaque vissée. Une attelle et une résine sont mise en place également pour limiter le risque de fracture.

A des fins statistiques et compte-tenu de notre maîtrise du modèle (la morbidité est très faible), le nombre de 7 brebis semble un choix judicieux à la fois très limité afin de réduire l'utilisation d'animaux et suffisant pour produire des données scientifiques exploitables. De plus, nous possédons des témoins historiques ce qui permettra de n'implanter qu'un seul groupe tout en contrôlant chaque effet sur le remplacement osseux. L'utilisation d'animaux est indispensable afin d'étudier l'efficacité globale de nos substituts osseux sur l'ensemble des mécanismes impliqués dans la réparation osseuse. Notre expérience dans ce type d'études nous permet d'affirmer que la couverture analgésique que nous utiliserons est suffisante pour que l'impact de la chirurgie sur l'animal n'affecte pas son état général. Le suivi consistera à la réalisation de clichés radiographiques durant 4 mois (1 fois par mois). A l'issue du protocole, tous les animaux seront sacrifiés et les membres opérés explantés pour analyses scanner et histologiques de façon à quantifier la production osseuse et la dégradation de l'implant.

3940. Le coronavirus de la bronchite infectieuse (IBV) provoque chez le poulet des infections respiratoires et rénales qui ont des conséquences économiques très importantes chez les volailles d'élevage en absence d'immunité préexistante. De nombreux vaccins vivants ou inactivés contre la bronchite infectieuse sont commercialisés et sont largement utilisés en élevage pour induire un niveau élevé d'anticorps anti-IBV chez les jeunes poulets. Des études ont suggéré que la pression de ces anticorps, lorsqu'un virus IBV se propage en infectant successivement différents animaux au sein d'une population vaccinée, pourrait être un facteur contribuant à l'émergence de souches d'IBV qui échappent aux anticorps induits par le vaccin. L'objectif de cette expérimentation est donc de déterminer l'effet de l'immunité vaccinale préexistante sur l'évolution d'un virus IBV et de mieux comprendre la dynamique de l'émergence de variants antigéniques IBV dans des populations de poulets vaccinée ou non.

Il n'existe pas de méthode alternative pour tester l'effet d'un vaccin sur l'immunité préexistante, le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire. Le poulet étant l'espèce cible, la procédure expérimentale fait appel à 30 poulets exempts d'organismes pathogènes spécifiés qui seront hébergés en isolateurs. Quinze sujets seront vaccinés à un jour d'âge avec un vaccin commercial, et quinze sujets seront conservés comme témoins non vaccinés. La présence ou l'absence d'anticorps induits par la vaccination sera vérifiée chez tous les sujets à trois semaines d'âge. A cet âge, cinq sujets vaccinés et 5 sujets non vaccinés seront transférés dans des isolateurs séparés et contaminés par voie naturelle avec le virus d'épreuve. Les sujets contaminés seront observés quotidiennement et leurs signes cliniques notés. Un point limite est défini sur la base des signes cliniques pour limiter à son minimum la douleur des sujets infectés. Après cinq jours, les sujets contaminés seront euthanasiés et des prélèvements trachéaux et rénaux seront réalisés. Ces prélèvements seront utilisés i) pour suivre les variations génétiques chez les sujets vaccinés ou non et ii) pour inoculer deux nouveaux groupes de 5 sujets (vaccinés ou non) dans d'autres isolateurs. Ce procédé sera répété une troisième fois, un total de 30 sujets sera donc utilisé. Cet effectif correspond au nombre minimum d'animaux permettant la mise en œuvre des tests statistiques non paramétriques adaptés à l'analyse de petites séries de données.

La même procédure expérimentale sera répétée cinq fois pour tester l'effet de différents vaccins vis-à-vis de différentes souches virales d'épreuve. Un total de 150 poulets seront donc placés en expérimentation.

3941. Le DHA (Acide Docosahexaénoïque) est un acide gras polyinsaturé n-3 qui participe au bon développement du cerveau chez l'enfant s'il est présent en quantité suffisante dans les tissus. Il peut être synthétisé à partir d'acides gras précurseurs présents dans l'alimentation comme l'ALA (Acide Alpha-Linoléique), l'EPA (Acide EicosaPentaénoïque) et le DPA (Acide DocosaPentaénoïque).

Chez les nourrissons, le DHA ou ses précurseurs sont apportés par les laits maternel ou infantile. Ces produits sont composés de matière grasse laitière ou de matière grasse végétale comme base lipidique en fonction des fournisseurs. Le premier but de cette étude est d'observer si un régime à base de matière grasse laitière augmente ou diminue la synthèse du DHA à partir de son précurseur DPA par rapport à de la matière grasse végétale.

Le DHA et ses précurseurs possèdent aussi des effets physiologiques spécifiques au niveau de différents tissus et organes comme le foie, les globules rouges, le cœur, la rate... Le deuxième but de cette étude est d'appréhender les effets physiologiques associés à une supplémentation en chaque acide gras polyinsaturé n-3 (EPA, DPA, DHA).

Pour cela le métabolisme lipidique des animaux sera étudié en fonction de la base lipidique et des différents acides gras n-3 apportés par le régime, du temps sous régime et de la dose en précurseur DPA. Cette expérimentation est réalisée sur 9 lots de 8 rats Sprague-Dawley, soit 72 animaux pris au sevrage et nourris ad libitum pendant 3 ou 6 semaines.

Ce projet se base sur la règle des 3R dans sa démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale.

Réduction : L'étude des effets physiologiques du DPA n'a jamais été réalisée à moyen terme in vivo. Les différents effets étudiés (temps, dose, acides gras, vecteur lipidique) utilisent le même lot témoin, ceci permet d'éviter la répétition de ce lot si les études étaient réalisées séparément. Le nombre d'animaux par lot est choisi et réduit au maximum pour permettre néanmoins une étude statistique suffisamment puissante des résultats.

Raffinement : Par rapport à certaines études basées sur des régimes caricaturaux où l'acide gras peut atteindre 60% des acides gras totaux, les acides gras apportés par le régime dans notre étude sont à des doses qui restent physiologiques. De plus, les animaux sont habitués à la contention une semaine avant la fin de l'expérimentation pour éviter le stress engendré par la piqûre de l'anesthésie, la seule procédure invasive de l'expérimentation.

Remplacement : Cette étude nutritionnelle nécessite un modèle in vivo car il n'existe pas à ce jour de modèle in vitro permettant de reproduire la complexité du métabolisme des acides gras avec une approche multi-organe.

3942. Nous avons récemment observé que certains antibiotiques avaient un effet inhibiteur sur la croissance des cellules souches cancéreuses (CSC), une sous-population de cellules tumorales impliquée dans la résistance aux traitements de chimiothérapie et de développement de métastases. Nos données préliminaires ayant été obtenues in vitro, nous souhaitons à présent déterminer si les antibiotiques sélectionnés peuvent avoir un effet identique in vivo. Notre objectif est de combiner chimiothérapie et traitement antibiotique afin d'éliminer le noyau de cellules résistantes et prévenir les rechutes. Cette étude est une étape essentielle avant tout passage en essai clinique.

Pour répondre à cette question nous utiliserons le modèle murin ainsi que 3 lignées cellulaires :

- une lignée cellulaire établie dans notre équipe à partir d'une biopsie de patient atteint de cancer colorectal.
- deux autres lignées cellulaires tumorales de provenance métastatique (T84 et SW620).

Un grand nombre de données in vitro ont permis de limiter cette étude à un seul composé et, ainsi, réduire le nombre de souris. Les animaux utilisés feront l'objet d'une surveillance régulière et les procédures expérimentales mises en place permettront de limiter au maximum leur souffrance. Leur milieu sera enrichi à l'aide de litière mélangée à des copeaux, ainsi que de briques de peuplier.

Pour l'ensemble de ce projet, nous avons prévu un nombre de 186 souris sur une durée de 3 ans.

3943. Contrairement aux mammifères, la croissance musculaire des poissons d'élevage est continue ce qui implique une prolifération continue des cellules souches musculaires. Aujourd'hui il n'existe pas de marqueurs moléculaires pour tracer ces progéniteurs musculaires qui sont en prolifération et engagés dans le programme myogénique. L'objectif de cette expérimentation est de marquer les cellules myogéniques en prolifération au sein du muscle de truite.

Remplacement : Nous souhaitons quantifier le nombre de cellules souches en prolifération au sein du muscle in vivo.

Réduction : Nous limiterons le nombre de poissons à 5 par stade soit 25 poissons, ce qui nous permet de réaliser une cinétique.

Raffinement : L'injection de BrdU n'induit pas de douleur. L'injection sera faite sous anesthésie.

3944. Les études réglementaires de déplétion des résidus sont requises par la loi. Elles respectent la réglementation relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, la réglementation relative aux médicaments vétérinaires et les lignes directrices en vigueur.

Les études réglementaires de déplétion des résidus ont pour objectif, chez les animaux de production élevés à des fins agronomiques :

- de démontrer la déplétion des résidus suite à l'arrêt de la prise ou l'administration d'un produit pharmaceutique vétérinaire (afin de déterminer les limites maximales de résidus),
- de déterminer un délai d'attente approprié à la sécurité des consommateurs.

Conformément à la ligne directrice en vigueur, les études réglementaires de déplétion des résidus in vivo sont nécessaires et ne peuvent être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

Grâce à une bonne standardisation des essais, le nombre d'animaux est réduit à son minimum tout en évitant de compromettre les objectifs des études.

Ainsi, un maximum de :

- 250 bovins,
- 250 ovins,
- 100 caprins,
- 250 porcins,
- 50 équins,
- 250 volailles (poules, dindes, canards),
- 250 lapins,

pourra être inclut dans les études sur une durée de 5 ans.

Pour chacune des espèces, le nombre d'animaux est soigneusement évalué à l'aide de la ligne directrice en vigueur, des informations disponibles sur la molécule, de la bibliographie, et des analyses statistiques prévues. Dans tous les cas, ce nombre doit permettre d'observer des différences entre les groupes de traitement.

En règle générale, 4 groupes d'au moins quatre animaux sont utilisés. Le nombre d'animaux inclus et le nombre de groupe dans les études varient en fonction des temps choisis pour définir le délai d'attente (au moins 4 animaux / temps choisi).

L'Etablissement Utilisateur fournit des conditions d'hébergement adaptées. Les animaux bénéficient d'un logement, d'un environnement, d'une alimentation, d'un apport en eau et en soins appropriés à leur santé et à leur bien-être. Un enrichissement est mis à disposition des animaux dès que cela est possible. Afin de maintenir des conditions optimales d'hébergement, les paramètres d'ambiance, l'aliment, l'abreuvement sont vérifiés quotidiennement.

Les animaux sont suivis quotidiennement. Lors de ces observations, si un animal montre des signes de pathologie, de souffrance ou de douleur, le vétérinaire (ou tout autre personne compétente) interviendra pour mettre en place un traitement thérapeutique et/ou des soins divers dans le but de le soigner ou de le soulager.

3945. Comprendre les mécanismes qui régulent le pH de la viande mesuré 24h après l'abattage (pH ultime) et apprécier les conséquences des régulations mises en jeu sur le stockage de glycogène et la qualité technologique de la viande est un enjeu majeur pour l'industrie avicole. En effet, cette qualité est très importante dans l'élaboration de produits découpés et transformés. Des lignées divergentes sur le pH ultime du filet de poulet ont été sélectionnées sur plusieurs générations pendant leur croissance et à l'âge d'abattage (6 semaines) pour mesurer des caractères de qualité et de métabolisme musculaire. A l'éclosion les animaux sont déjà très divergents et ce n'est pas l'utilisation des nutriments post-éclosion qui provoque le phénotype divergent des animaux. Nous voudrions maintenant explorer la période avant éclosion, moment très critique de la vie de l'oiseau, pour vérifier si les différences entre ces deux lignées sont déjà présentes avant que tous les processus d'éclosion ne se mettent en route ou voir si c'est une utilisation différente des nutriments au cours de l'éclosion, processus très énergivore, qui conduit au phénotype divergent des deux lignées. Il est alors nécessaire d'évaluer si les animaux de ces lignées sont déjà divergents avant l'éclosion et de caractériser leur réponse métabolique à l'éclosion puis après 5 jours. Pour ce faire, 25 embryons maximum de chaque lignée seront euthanasiés à E16 (16 jours de développement embryonnaire) et du sang ainsi que différents tissus présentant un intérêt métabolique (muscle, foie, tissus adipeux) seront prélevés pour une caractérisation métabolique. Vingt-cinq autres animaux maximum de chaque lignée seront étudiés à J0 (avant toute consommation d'aliment) et enfin 25 animaux maximum de chaque lignée à J5 (à jeun ou réalimentés pendant 1H). Les animaux surnuméraires seront remis en élevage. Ces nombres d'animaux (150 soit 75 par lignée) sont nécessaires et suffisants pour pouvoir tirer des conclusions significatives en tenant compte de nos expériences précédentes et de la variabilité interindividuelle attendue pour ces analyses biochimiques et moléculaires (Réduire). Ce type d'étude du métabolisme et de ses régulations en fonction d'un génotype ou de la nutrition ne peut se faire que dans une démarche intégrative sur un animal dans son ensemble du fait des échanges et des dépendances des différents tissus présentant un intérêt métabolique (foie, muscle, tissu adipeux, sang...) et exclut la possibilité de réaliser ces expériences sur lignées cellulaires (Remplacer). Les procédures seront interrompues en cas d'atteinte des points limite définis (Raffiner) pour ces études. Ce travail permettra de mieux comprendre quelles sont les caractéristiques physiologiques des poussins qui peuvent expliquer leur différence de capacité à stocker le glucose sous forme de glycogène. Ce dernier peut être corrélé avec le pH ultime, critère clé quant aux qualités technologiques, sensorielles et gustatives de la viande.

3946. Dans le cadre de la nouvelle Politique Commune de la Pêche, la mise en œuvre de l'obligation de débarquement progressive pour l'ensemble des navires de l'UE est en cours de définition. A partir de 2016, il y aura obligation de débarquement de tous les individus pêchés (de certaines espèces), c'est à dire sans rejet en mer des animaux hors maille. Cela s'appliquera aux pêcheries ciblant les espèces vivant près des côtes et/ou sur le fond (démersales ou benthiques) sous quotas (i.e. sous quantités capturées fixées réglementairement). Au 1er janvier 2016, les pêcheries concernées par l'obligation de débarquement dans le Golfe de Gascogne sont celles ciblant la langoustine, la sole commune, la plie et le merlu.

La possibilité d'exemption totale à l'obligation de débarquement au titre du taux de survie a été spécifié dans le règlement UE de cette façon « L'obligation de débarquement ne s'applique pas aux espèces pour lesquelles des preuves scientifiques démontrent des taux de survie élevés, compte tenu des caractéristiques des engins, des pratiques de pêche et de l'écosystème ». Cela signifie que si un haut taux de survie a été prouvé scientifiquement, alors cela peut faire l'objet d'une exemption totale non décomptée des quotas de pêche. Cette demande d'exemption doit être validée par les comités ad hoc. La demande d'exemption doit présenter les références des études scientifiques prouvant un taux de survie élevé. Le seuil minimal

définissant un taux de survie élevé n'est pas défini par la communauté scientifique. Ce sera à la Commission Européenne de le définir mais il semblerait qu'un taux de survie supérieur à 50 % soit nécessaire pour obtenir une exemption pour taux de survie élevé.

L'objectif de ce projet est d'étudier expérimentalement le taux de survie post pêche de la sole hors maille (<24 cm de longueur totale). A cet effet, des individus seront capturés lors d'opérations de pêche faites sur un mode habituel, les animaux seront hébergés en conditions optimisées sur les navires (bacs de maintenance avec circulation d'eau thermorégulée et oxygénation) puis transportés à terre en installations expérimentales afin d'étudier leur taux de survie, leur état de santé et leur capacité de reprise d'une activité alimentaire sur une période de 10 jours. Plusieurs lots de 70 individus (1 lot contrôle, 9 lots de pêche) seront accueillis en installations expérimentales provenant de différents engins de pêche (3 engins) opérés à différentes saisons (printemps, été, automne). Ainsi la survie d'un nombre maximum de 700 individus sera étudiée. La règle des 3R a été prise en compte de la façon suivante : Le Remplacement n'est pas possible dans ces expériences puisqu'il faut des animaux vivants de cette espèce en particulier. La Réduction a été prise en compte en limitant au maximum le nombre d'animaux employés (70 par lot) pour conserver une significativité statistique dans les analyses de survie (type Mentel-Cox). Enfin, le Raffinement comprendra d'une part la mise en oeuvre des conditions optimales d'élevage pour cette espèce de poisson marin (bacs de taille et volume adaptés, thermorégulation, oxygénation) et, d'autre part, la réalisation des manipulations sous anesthésie légère (pratique habituelle lors du transport de poissons) concernant le transfert entre le lieu de capture et les installations expérimentales et lors des manipulations des animaux pour l'examen initial de leur état sanitaire, leur pesée et la mesure de la longueur. Des analyses de survie de type Mentel-Cox seront réalisées sur les différents lots étudiés.

3947. La dépression majeure fait partie des troubles neuropsychiatriques les plus préoccupant de ce début de siècle. Avec une prévalence d'environ 15%, cette pathologie fait partie des principales causes de souffrance, d'handicap et de suicide (10000 à 15000 en France par an), et ceux, à l'échelle mondiale. La résistance aux traitements pharmacologiques nécessite la mise au point de nouveaux traitements et la compréhension des mécanismes sous-jacents. Certains de ces mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant l'utilisation de techniques d'immunohistochimie par exemple.

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

Plusieurs études ont associé la neuroinflammation (observée dans la physiopathologie dépressive) comme explication potentielle de la résistance aux ADs. Notre expérience a donc pour objectif d'améliorer notre compréhension du lien inflammation/dépression. Notre intérêt c'est porté sur le récepteur P2X7, indispensable à l'établissement d'états neuroinflammatoires et dont certaines mutations sont connues comme facteur de vulnérabilité à la physiopathologie dépressive. Afin d'étudier ce récepteur, nous utiliserons des souris Knock out, génétiquement modifiées pour inactiver le gène codant pour le récepteur P2X7 (permettant d'étudier les conséquences physiologiques).

Nous envisageons donc d'exposer ces souris mutantes à un stress chronique. Pour ce faire, une cohorte de 96 souris (réparties en 8 lots) sera nécessaire afin de tester au mieux les facteurs comportementaux, physiologiques et immunohistochimiques altérés par notre protocole SCI. Cela nous permettra de consolider nos connaissances sur l'implication du récepteur P2X7 dans la physiopathologie de la dépression avant de pouvoir l'envisager comme cible thérapeutique potentielle afin d'améliorer notre arsenal thérapeutique.

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

Raffinement : les stress appliqués aux animaux peuvent être qualifiés de léger à moyen, sans stress physique douloureux pour l'animal. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu.

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

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=12 sujets par groupe).

3948. La toux est un moyen efficace et rapide permettant de protéger les poumons contre des substances irritantes inhalées. En coordination avec le système muco-ciliaire, ce réflexe permet également d'éliminer les sécrétions produites par l'épithélium respiratoire. Cependant dans les conditions pathologiques comme celles liées à l'inflammation, elle peut devenir excessive, non productive et difficilement traitée, car les mécanismes, par lesquels ces pathologies déclenchent la toux réflexe, ne sont que partiellement compris. Le phénomène inflammatoire lors de l'asthme allergique semble jouer un rôle important dans le déclenchement de la toux excessive dans ces maladies. Au niveau des voies aériennes, les médiateurs

libérés par les cellules inflammatoires peuvent sensibiliser les voies nerveuses afférentes impliquées dans le réflexe de toux et ainsi induire une augmentation de la sensibilité de ce réflexe. Nous avons développé au laboratoire un modèle animal aigu qui permet d'étudier les mécanismes responsables de la toux et de tester différentes situations pathologiques. L'objectif de ce projet est d'étudier plus précisément le rôle de l'inflammation allergique dans le phénomène de déclenchement du réflexe de toux au stade précoce de l'inflammation induite localement par un allergène. En effet une étude préalable réalisée a permis de montrer que les cellules recrutées pendant la phase tardive de l'inflammation ne sont pas impliquées dans le phénomène de sensibilisation du réflexe de toux. Ce résultat suggère que les médiateurs potentiels de l'hypersensibilité du réflexe de toux seraient plutôt libérés au cours de la phase précoce de l'inflammation (c'est-à-dire dans les premières heures qui suivent l'exposition à l'allergène). Pour ce faire, des lapins vont être préalablement sensibilisés puis exposés par voie aérienne à un allergène pour déclencher une réaction inflammatoire locale précoce durant laquelle les paramètres respiratoires et le réflexe de toux seront mesurés. Cette expérimentation comprend dans un premier temps une étude cinétique de suivi du déclenchement de la phase précoce de l'inflammation et des modifications physiologiques respiratoires induites. Dans un second temps, la sensibilité du réflexe de toux sera investiguée selon plusieurs modalités (mécanique et chimique) aux temps critiques de l'inflammation précédemment déterminés. En conséquence cette étude nécessite pour le premier temps 10 lapins pour le suivi cinétique et dans un deuxième temps 32 lapins répartis comme suit : deux lots exposés à l'allergène (2x8 lapins) et deux lots témoin (2x8 lapins) soit 42 lapins au total. Le réflexe de toux sera induit par un stimulus mécanique et un stimulus chimique chez l'animal anesthésié. Ces approches complémentaires permettent d'étudier deux modalités d'induction du réflexe de toux chez le même animal au stade précoce de l'inflammation dans la première heure qui suit l'exposition à l'allergène. Dans la mesure de la conformité avec les exigences des 3 R, il n'existe pas d'étude antérieure faite dans un autre pays destinée à répondre aux questions scientifiques posées dans ce protocole. L'étude de ce réflexe nécessite l'utilisation d'un modèle physiologique intégré qui ne peut être remplacé par des méthodes alternatives. Ainsi, le modèle lapin adulte de type Néo-zélandais a été choisi car c'est un modèle animal qui présente un réflexe de toux contrairement au modèle rongeur souris ou rat. De plus, l'acclimatation des animaux pendant une semaine après réception, la surveillance quotidienne des lapins pendant la période de sensibilisation ainsi que la surveillance de la profondeur de l'anesthésie et de l'analgésie toutes les 15 minutes pendant l'expérimentation chez l'animal anesthésié servira à la diminution du stress de l'animal et la réduction de la souffrance et de douleur lors d'expérimentation animale. De plus, le déclenchement de la réaction allergique et la mesure de la toux induite seront réalisés en intégralité chez l'animal anesthésié.

3949. La technologie des anticorps monoclonaux est un outil permettant la production de grande quantité d'anticorps hautement spécifiques et a des répercussions considérables sur les méthodes de diagnostic et de thérapie ainsi que sur l'ensemble de la recherche biomédicale. Cette technologie comprend l'immunisation des souris avec des antigènes connus, la préparation des hybridomes par fusion de lymphocytes prélevés sur les souris immunisées et des cellules myéломateuse, le clonage et le criblage des hybridomes et l'établissement de cellules monoclonales sécrétant un seul type d'anticorps. la génération des anticorps par immunisation in vitro est très difficile à cause de la faible durée de vie des lymphocytes en culture. Les anticorps monoclonaux sont essentiellement produits chez la souris car les cellules myéломateuses ayant des caractéristiques permettant de générer des hybridomes n'existent que pour cette espèce. Une fois l'hybridome développé, il est possible de le cultiver in vitro pour produire de l'anticorps ou de l'injecter dans le péritoine de souris pour obtenir une ascite tumorale riche en anticorps. L'intérêt de l'ascite chez la souris réside dans le fait que tous les hybridomes ne prolifèrent pas bien in vitro et l'anticorps produit in vitro pourrait être de plus faible affinité. Pour chaque programme, nous limitons l'utilisation de souris à deux pour l'immunisation et cinq pour la production d'ascites. Nous réalisons entre 20 et 40 programmes par an. soit un maximum de 560 souris sur une période de 2 ans. Les animaux sont suivis quotidiennement et afin d'éviter toute souffrance, ils reçoivent un traitement anti-douleur dès que nécessaire ou même sortis du protocole expérimental pour un niveau de douleur dépassant le seuil fixé.

3950. Le magnésium (Mg) est un macroélément présent à 0,05% dans l'organisme, dont 65% se trouve dans les os associé au calcium (Ca) et au phosphore (P). A ce titre, il assure une fonction structurelle en tant que constituant secondaire de l'os, il joue un rôle primordial dans le processus d'ossification en favorisant la stabilisation des complexes d'hydroxyapatite de l'os, et il a aussi un rôle dans la prévention des effets du stress de l'animal. Chez le porc, le besoin de Mg alimentaire est très faible (0,04% de l'aliment ; NRC, 1998), et les situations de carence sont exceptionnelles du fait de teneurs en Mg de l'ensemble des matières premières relativement élevée (de 0,12 à 0,15% dans les grains de céréales). Peu d'études ont quantifié les effets de la supplémentation en Mg et de la source de Mg utilisée, ainsi que les interactions potentielles du Mg avec d'autres minéraux (en particulier le Ca et P) au niveau digestif chez le porc. En outre, des aliments contenant des matières premières à forte teneur en fibres sont de plus en plus utilisés dans le contexte mondial de l'alimentation animale. Récemment, il a été observé que l'ingestion de certains types de fibres alimentaires donne lieu à une augmentation de l'absorption de certains minéraux dans le gros intestin chez l'homme. Néanmoins, on ne sait pas si ces effets peuvent être reproduits chez le porc. Donc, l'objectif de ce projet est d'évaluer les effets de la supplémentation de Mg et de la source de Mg, avec l'inclusion de fibres dans l'aliment sur le bilan des principaux macroéléments, notamment Mg, Ca, P et autres nutriments chez le porc en croissance. Afin de répondre à cet objectif, 60 animaux seront logés en cages individuels permettant de contrôler leur consommation et de prélever les fèces et les urines de chacun séparément au moyen de plateaux récupérateurs pendant 21 jours. A la fin de la période expérimentale, l'ensemble des animaux sera euthanasié. Ce protocole respecte la règle des 3R appliquées à l'expérimentation animal parce que le nombre d'animaux (10 par traitement) est le minimal à utiliser pour permettre de mettre en évidence une différence de digestibilité des nutriments entre

traitements avec une puissance statistique de 90% et une confiance statistique de 95% (réduire). De plus, des mesures sur des animaux individuels limitent le nombre d'animaux expérimentaux (réduire, raffiner). Pour réduire le stress des animaux, les cages seront contiguës, ce qui permettra aux animaux de se voir et de se sentir afin d'éviter l'isolement social. Les animaux seront surveillés régulièrement, afin de permettre une intervention immédiate en cas de souffrance, maladie ou tout autre problème (raffiner). Ce projet nous permettrait aussi d'alimenter une base de données dédiée à l'établissement des modèles de prédiction de la digestion des nutriments, ce qui fera respecter la règle de remplacement dans les expérimentations animales futures (et non présente dans cet étude).

3951. Les microalgues sont sujettes à un fort engouement en nutrition et santé humaine, par leur richesse en nutriments et l'effet avéré de certaines molécules sur la protection de l'organisme. Cependant, les effets de l'introduction des microalgues dans la ration sur les performances et la santé des animaux d'élevage sont peu connus. Ce projet, impliqué dans un programme de thèse, fait suite à deux projets réalisés en mars 2014 et juin 2015 ayant montré un effet modéré de la supplémentation en chlorelle et spiruline après la phase d'allaitement sur la santé et la fonction digestive.

Au cours des 48 heures post-sevrage, ont lieu d'importantes modifications physiologiques impliquées par le stress du sevrage qui mènent aux troubles digestifs et à la réduction de la croissance des animaux. L'anorexie du porcelet pendant les premiers jours qui suivent le sevrage peut expliquer la faible efficacité de la supplémentation en microalgues après le sevrage sur le maintien de la santé digestive.. Les effets bénéfiques sur la santé, recensés chez chlorelle et spiruline, pourraient présenter un intérêt en amont du sevrage, afin de limiter les effets néfastes du sevrage sur le système digestif du porcelet. Ainsi, le projet vise à étudier l'effet de la supplémentation en chlorelle et spiruline chez le porcelet en amont du sevrage sur trois critères :

- Effet sur la santé digestive et la santé générale
- Effet sur l'assimilation des nutriments
- Effet sur les performances zootechniques

Les effets sont étudiés par comparaison à un groupe témoin recevant un placebo.

Le protocole comprend 108 porcelets de 14 jours d'âge répartis en trois lots de 36 porcelets, élevés sous la mère puis sevrés à 28 jours, et recevant l'un des trois traitements expérimentaux suivants, administrés quotidiennement :

- 400 mg/kg de poids vif de chlorelle broyée et lyophilisée + eau
- 400 mg/kg de poids vif de spiruline broyée et lyophilisée + eau
- un placebo (eau)

Le traitement est administré sous forme de pâte par voie orale (biomasse algale + eau ou eau uniquement pour le placebo). Les animaux sont logés avec leur mère, puis sont sevrés à 28 jours d'âge et placés en cages individuelles pendant deux semaines pour contrôler les performances de croissance et observer quotidiennement les diarrhées. Des collectes ponctuelles de fèces sont réalisées sur 10 porcelets mâles par lot pour analyser l'utilisation digestive de l'aliment. Trois séries d'animaux sont abattus pour réaliser des prélèvements de sang (mesure du statut inflammatoire), d'intestin grêle (analyse de la structure de l'intestin et mesure de la réponse inflammatoire locale) et de contenus digestifs (analyse du microbiote). Ces trois séries de prélèvements sont effectuées en amont du sevrage à 27 jours d'âge (18 porcelets), à 30 jours d'âge soit 48 heures après le sevrage (30 porcelets) et en fin d'expérience à 42 jours d'âge (18 porcelets).

Le nombre d'animaux et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin d'atteindre le niveau de précision souhaité pour la comparaison des performances de croissance et des mesures de santé digestive. Le protocole prend en compte la règle des 3R : Réduction (les effectifs ont été calculés afin d'utiliser le minimum d'individus nécessaires pour obtenir une précision satisfaisante sur les paramètres étudiés, le projet nécessite l'application d'un traitement spécifique pour chaque animal ne permettant pas la réduction des effectifs calculés.), Raffinement (la notion de point limite a été prise en compte afin de réduire la douleur et le stress, les traitements expérimentaux sont administrés par prise orale volontaire), Remplacement (le porcelet est le modèle animal choisi pour étudier la santé digestive au moment du sevrage, choix pertinent dans le cadre de ce projet).

3952. Le mélanome dérive de la transformation maligne des mélanocytes. Le traitement du mélanome cutané repose sur la chirurgie «élargie», mais celle-ci ne permet la guérison que des mélanomes diagnostiqués très précocement, à un stade métastatique le pronostic est extrêmement péjoratif. Bien que des thérapies ciblées et les immunothérapies aient été développées, la plupart des patients traités développent des résistances et il n'existe pas de guérison d'un mélanome métastatique. Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui contrôlent la survie, la prolifération et la mort des cellules de mélanome afin d'améliorer les traitements existants.

ASAH1 (N-Acylsphingosine Amidohydrolase-1) est une enzyme nécessaire dans le métabolisme des sphingolipides. Les sphingolipides sont impliqués dans la régulation de divers processus biologiques (apoptose, sénescence, survie...) par conséquent, la modulation du métabolisme des sphingolipides représente un intérêt dans le traitement du cancer et pourrait offrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Récemment, il a été montré qu'ASAH1 est anormalement exprimé dans divers types de cancers humains et que l'inhibition de l'expression d'ASAH1 dans des cellules de cancer du sein ou de la prostate entraîne une perte de viabilité cellulaire. Une étude bioinformatique a démontré qu'ASAH1 était surexprimée dans le mélanome par rapport à d'autres types de cancers et que ceci était associé à un mauvais pronostic. Au laboratoire, nous avons observé que l'inhibition d'ASAH1 entraîne une diminution de prolifération des cellules de mélanome mais stimule leur migration.

Afin d'étudier l'implication d'ASAH1 dans le développement du mélanome dans un contexte plus physiopathologique (in vivo) nous avons mis en place des cellules de mélanome sous-exprimant ou surexprimant ASAH1. Nous les injecterons dans des souris par voie sous-cutanée ou intra-caudale afin d'observer le développement de tumeurs et de métastases suivant

l'expression d'ASAH1. Le but étant d'évaluer les effets de l'extinction ou de la surexpression d'ASAH1 dans le développement de tumeurs sous-cutanées et de métastases pulmonaires.

Nous utiliserons des souris nude, qui constituent le modèle le plus couramment utilisé pour les études de cancérogenèse in vivo. Ces souris permettent d'étudier l'effet in vivo de cellules de mélanome humain car elles ont un système immunitaire affaibli, et donc sont sans risque de rejet des cellules humaines greffées. Les cellules que nous utiliserons dans ces expériences sont couramment utilisées au laboratoire pour ce genre de tests. Ce projet in vivo nous permettra de compléter le travail que nous avons déjà réalisé in vitro et d'apporter de nouvelles connaissances concernant le rôle d'ASAH1 dans la prise tumorale, la colonisation et l'apparition de métastases de mélanomes humains. Nous utiliserons le nombre d'animaux le plus restreint permettant l'analyse statistique des résultats.

En termes de réduction, les expériences in vitro réalisées au laboratoire nous ont permis de définir le nombre de cellules à injecter dans les souris. Le nombre d'animaux nécessaire à cette étude a été déterminé à l'aide d'un test de puissance statistique. Un nombre minimum d'animaux sera donc utilisé pour vérifier les effets d'ASAH1 in vivo dans un modèle qui apporte le rôle de l'environnement tissulaire (interaction cellulaire, système immunitaire présent même si incomplet) qui peut jouer un rôle clé dans le développement tumoral. De plus, nous allons maximiser l'utilisation de ces animaux en prélevant les tumeurs/métastases et organes (tels que le foie, la rate, les poumons) pour étude (immunohistochimie, western blot, qPCR). De plus, dans la procédure 3 nous injectons à la fois les cellules contrôles et les cellules sous-exprimant ou surexprimant ASAH1 dans la même souris ce qui nous évite de multiplier nos groupes par deux.

En termes de raffinement, les souris seront observées quotidiennement par les animaliers et de façon exhaustive deux fois par semaine par les demandeurs du projet afin de prendre en charge tout signe de douleur, de stress ou d'inconfort. Les manipulateurs sont habitués à l'expérimentation sur les souris ce qui permet d'éviter tout dommage à l'animal lors des injections. Nous n'utiliserons pas d'anesthésiques ni d'analgésiques dans nos expériences car nous ne pouvons pas garantir que l'utilisation de ces médicaments soit sans effet sur nos expériences.

De plus, les souris sont plusieurs par cage, ces dernières sont ventilées individuellement et sont enrichies systématiquement. Des points limites précis sont définis dans chaque procédure.

En termes de remplacement, des tests in vitro ont été effectués au laboratoire pour connaître l'effet d'ASAH1 sur ces cellules de mélanomes humains (tests de prolifération, migration...). Nous réutiliserons ces cellules dans notre étude et c'est pourquoi nous utiliserons des souris nude (évitant tout rejet de greffe). Après avoir testé in vivo l'effet d'ASAH1 dans le développement et la progression du mélanome, nous retournerons in vitro avec les cultures de cellules utilisées précédemment pour étudier les mécanismes moléculaires par lesquels ASAH1 exerce ses effets sur la prolifération et la migration.

Tous les demandeurs sont titulaires d'une formation à l'expérimentation animale de niveau B. Nous utiliserons un total 384 animaux dans ce projet.

3953. Les spirulines sont des cyanobactéries possédant des propriétés nutritionnelles reconnues depuis l'antiquité et autorisées pour l'alimentation humaine. Elles ont la capacité d'absorber et d'accumuler des oligoéléments qui sont métabolisés et incorporés dans des molécules organiques (protéines, polysaccharides...). Elles constituent ainsi un bon support pour l'enrichissement en micronutriments comme le fer, le sélénium ou encore le silicium. Le silicium intervient dans le maintien de l'élasticité des tissus en participant à l'organisation des fibres de collagène et d'élastine. Or ces structures macromoléculaires altérées au cours du vieillissement pourraient être impliquées dans certaines dysfonctions et dans de nombreuses pathologies (cardiovasculaires, métaboliques, osseuses). La baisse du taux de silicium dans les tissus avec l'avancée en âge pourrait être corrélée à certaines des altérations structurelles des tissus, justifiant l'intérêt suscité par son utilisation en prévention des effets du vieillissement. Une première étude réalisée sur un modèle d'obésité nutritionnelle chez le hamster a permis de poser les bases d'un effet bénéfique d'un complément alimentaire (spirulines enrichies en silicium) sur le système cardiovasculaire. L'entreprise régionale (Languedoc-Roussillon) qui commercialise ce complément alimentaire vise l'obtention d'une allégation santé attestant des effets bénéfiques du supplément spirulines enrichies en silicium chez l'homme. Un projet collaboratif de recherche et développement regroupant l'entreprise et deux laboratoires de recherche dont le nôtre, est financé sur des fonds européens pour le développement régional (FEDER). Ce projet a pour but de comprendre les mécanismes tissulaires et cellulaires impliqués dans les effets bénéfiques d'une supplémentation nutritionnelle en spirulines enrichies en silicium sur les altérations de la fonction cardiovasculaire observées au cours du vieillissement.

L'étude sera réalisée sur le rat spontanément hypertendu (SHR) qui représente un modèle de vieillissement artériel accéléré et qui est un modèle de référence pour les pathologies cardiovasculaires. Des animaux contrôles non hypertendus seront intégrés à l'étude (Wistar Kyoto, fond génétique du SHR). Différents groupes d'animaux seront étudiés : des animaux ayant une alimentation standard, ou une supplémentation en spirulines, en spirulines enrichies en silicium ou en silicium (poudre de préle). La supplémentation sera réalisée sur des animaux adultes (3 mois) sur une durée de 3 mois. Le nombre d'animaux prévus sera au total de 120 rats, 60 SHR et 60 Wistar-Kyoto répartis en 4 groupes de 15 animaux correspondant aux différents traitements et répartis sur 2 ans.

A la fin du traitement, des explorations morphologiques et fonctionnelles non invasives (échocardiographie, enregistrement ECG par télémetrie) seront réalisées sur les animaux vivants. Puis des études de réactivité artérielle (réalisées in vitro) et des mesures réalisées à partir de prélèvements sanguins tissulaires et cellulaires seront effectuées (paramètres biochimiques et moléculaires).

Le déroulé expérimental sera le suivant :

-supplémentation quotidienne (placebo, spiruline, spiruline enrichie, silicium) pour une durée de 12 semaines.

- échocardiographie et pose de capteurs pour les enregistrements électrocardiogrammes (ECG) deux semaines avant la fin du protocole et réalisées sous anesthésie.

- au bout des 12 semaines de supplémentation, sacrifice des animaux avec une anesthésie profonde par injection de pentobarbital, exsanguination et prélèvement des différents tissus d'intérêt (aorte, artère mésentérique, cœur, peau, queue..). La supplémentation sera réalisée quotidiennement par la prise d'un comprimé réalisé à base de la nourriture standard des animaux additionnée de spirulines, de spirulines enrichies en silicium ou de poudre de prêle (silicium). Taille et goût des comprimés ont été étudiés pour en favoriser la prise afin de réduire le stress induit par cette manipulation. Notre étude permettra de valider la preuve de concept sur l'efficacité du complément alimentaire en vue de l'obtention d'une allégation santé.

3954. Chez l'homme, la toxine botulique est utilisée dans le traitement des maladies neurologiques caractérisées par une contraction exagérée d'un muscle entraînant des troubles des mouvements et/ou de posture qui peuvent être chroniques et douloureux (spasticité des membres, torticolis, le pied bot équin, contractions de la mâchoire, contraction des paupières entraînant la fermeture répétitive et incontrôlée des paupières...). Le traitement consiste en l'injection de petites quantités de toxine botulique dans les muscles atteints empêchant la stimulation du muscle par le nerf associé. La toxine botulique induit alors une faiblesse des muscles hyperactifs injectés. Ce traitement est efficace mais n'agit qu'après quelques jours et doit être renouvelé après plusieurs mois.

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

L'activité des toxines est testée selon un processus qui débute par une évaluation in vitro (mesure de l'activité de la toxine sur sa cible) puis sur des cultures de différents types cellulaires et ensuite différents types de muscles isolés de rongeurs. Le recours aux animaux n'est fait que si les toxines ainsi testées répondent aux critères recherchés. Elles seront alors testées sur le rat.

Ce projet a pour objectif d'étudier l'effet de toxines sur la fonction musculaire spontanée de la patte et après stimulation en utilisant 2 méthodes complémentaires largement décrites et utilisées.

1-Tout d'abord, la toxine ou son solvant (milieu dans lequel elle est préparée) est injecté dans un muscle d'une patte arrière du rat anesthésié. Cette injection est faite au travers de la peau ou après une petite incision de la peau préalablement rasée ceci afin de bien identifier le muscle d'intérêt. L'incision est refermée par une agrafe et suivie lors de la surveillance quotidienne de l'état de santé des animaux.

Dans un premier temps, des toxines de référence seront caractérisées et serviront de référentiel à l'étude de nouvelles toxines qui leur seront ainsi comparées.

2- Les modèles pour mesurer la fonction musculaire après l'injection de toxine sont :

- La faiblesse musculaire spontanée de la patte injectée par simple observation et quantification de l'écartement reflexe des doigts lorsque l'animal éveillé est soulevé.

- La force musculaire développée par la contraction des muscles de la patte après stimulation nerveuse (électrodes) chez le rat anesthésié. La patte à mesurer est attachée grâce à un adhésif à une pédale qui transmet la force développée à un capteur relié à un système d'acquisition qui permet de la quantifier. Les 2 pattes de l'animal peuvent être mesurées pour vérifier l'absence d'atteinte de la patte injectée par le solvant ou pour mettre en évidence un effet de la toxine sur la patte opposée considéré comme un effet secondaire. L'intérêt est de pouvoir comparer la marge entre la dose induisant un effet du côté injecté et la dose induisant en plus un effet du côté opposé. Cette marge peut varier d'une toxine à l'autre et permet donc de les caractériser et de les comparer. Le nombre de mesures sera de 3 maximum par semaine et réduit à 2 maximum en cas de longue durée d'action ceci afin de limiter le nombre d'anesthésie et de stimulations.

L'anesthésie utilisée est une anesthésie gazeuse par inhalation qui permet un réveil rapide lorsqu'elle est arrêtée. Les animaux sont hébergés en groupe durant toute l'étude. Les animaux sont pesés tous les jours pendant une semaine, puis 2 fois par semaine si l'étude se prolonge permettant ainsi de compléter la surveillance quotidienne de leur état de santé.

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

Le nombre d'animaux par groupe est de 6 à 8, ce nombre dépend du paramètre principal étudié (puissance, durée d'action, comparaison de toxine) et est basé sur des données bibliographiques sur ces 2 modèles, des données internes et d'expert consulté. Une expérience comporte 6 groupes. Pour ce projet est prévue l'utilisation de 2000 rats sur une période de 5 ans.

3955. Les vésicules extracellulaires (VEs) sont des fragments membranaires de petite taille expulsés par différents types cellulaires, qui circulent dans les fluides corporels et transportent ADN, ARN et protéines vers des cellules cibles. Ce projet vise à définir le rôle des vésicules extracellulaires tumorales (VET) dans la formation de métastases in vivo.

Pour cela différentes lignées cellulaires cancéreuses fluorescentes seront injectées, en présence ou non de vésicules extracellulaires tumorales chez la souris et les tumeurs ainsi générées seront alors analysées in vivo par imagerie intra-vitale. L'approche proposée est originale et innovante et utilise l'imagerie intra-vitale pour visualiser un évènement à l'échelle de la microscopie optique pour le suivre ensuite au niveau de l'échelle de la microscopie électronique (l'acronyme de cette approche est appelé CLEM pour "correlative light and electron microscopy").

Réduire:

Le nombre d'animaux nécessaire a été déterminé au minimum mais néanmoins suffisamment pour pouvoir réaliser une analyse statistique pertinente. Le protocole expérimental prend en compte un potentiel impact sur la souffrance animale et différents critères ont été établis pour justifier un arrêt de l'expérience en cours. Une étude exhaustive des données récentes de la littérature n'a pas permis d'identifier une équipe réalisant des expériences similaires. De plus l'équipe est un des leaders mondiaux de ce type d'approche.

Raffiner:

Des points limites ont été établis pour éviter toute souffrance animale. Les souris sont maintenues en groupe de 5 par cage pour maintenir une interaction entre individus. L'environnement d'élevage est enrichi à l'aide de carrés de cellulose pour la construction des nids et de tunnels et balancelle en plastique rouge pour favoriser l'activité des souris. Les souris ont accès ad libitum à une nourriture de type normal (RM1, Dietex) et à de l'eau filtrée. Si une souris présentait des symptômes traduisant l'apparition de douleurs (réduction de la réactivité, difficulté de locomotion, fourrure non entretenue, tendance à l'isolement) une injection en IP d'un analgésique sera effectuée une fois par jour (Ketofen1%, à raison de 15µl/10g de souris) jusqu'à disparition des symptômes.

Remplacement:

Le modèle animal est nécessaire car il n'existe pas de modèle pour reproduire in vitro la cascade d'évènements qui sont analysés ici.

240 souris seront utilisées dans ce projet.

3956. Le but de ce projet est d'étudier le développement tumoral, le rôle du microenvironnement ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus.

Pour cela différentes lignées cellulaires cancéreuses fluorescentes seront injectées chez la souris et les tumeurs ainsi générées seront alors analysées in vivo par imagerie intra-vitale. L'approche proposée est originale et innovante. L'équipe est un leader mondial dans cette approche de pointe qui utilise l'imagerie intra-vitale pour visualiser un évènement à l'échelle de la microscopie optique pour le suivre ensuite au niveau de l'échelle de la microscopie électronique (l'acronyme de cette approche est appelé CLEM pour "correlative light and electron microscopy").

Réduire:

Le nombre de souris utilisé a été réduit au plus juste pour pouvoir réaliser une analyse statistique pertinente, sachant que le projet est avant tout descriptif. Aucune étude n'a été publiée abordant cette problématique des mécanismes ultra-structuraux de la progression tumorale.

Raffiner:

Ce projet est basé sur une méthode d'imagerie non invasive sous anesthésie, qui n'induit pas de stress chez l'animal. Des points limites ont été établis pour éviter toute souffrance animale. Les souris sont maintenues en groupe de 5 par cage pour maintenir une interaction entre individus. L'environnement d'élevage est enrichi à l'aide de carrés de cellulose pour la construction des nids et de tunnels et balancelle en plastique rouge pour favoriser l'activité des souris. Les souris ont accès ad libitum à une nourriture de type normal (RM1, Dietex) et à de l'eau filtrée.

Remplacement:

Le modèle animal est nécessaire car il n'existe pas de modèle pour reproduire in vitro la cascade d'évènements qui sont analysés ici.

400 souris seront utilisées dans ce projet.

3957. Le but de ce projet est de développer un traitement pour la dysplasie spondylo-épiphysaire congénitale (SEDC), une collagénopathie de type 2. La SEDC est une dysplasie osseuse génétique qui cause une forme rare de nanisme chez l'être humain. Elle est caractérisée phénotypiquement par une petite taille avec un raccourcissement du tronc et du cou, induisant un risque important d'instabilité aux niveaux des vertèbres cervicales pouvant induire une paralysie. Les patients souffrent également d'anomalies au niveau du vitré et perte d'audition. Cette pathologie est due à des mutations perte de fonction dans le gène du collagène de type 2.

Pour réaliser ce projet, nous utiliserons un modèle de souris atteinte de SEDC (B6(Cg)-Col2a1sedc/J). Il s'agit d'un mutant spontané dont le phénotype dommageable est similaire à la pathologie humaine avec des atteintes du squelette, des anomalies rétiniennes et un développement anormal de l'oreille interne. Nous mettrons en place ce modèle localement en caractérisant le phénotype et développerons une approche thérapeutique.

Ce projet aura des bénéfices pour l'homme sur plusieurs niveaux. D'une part, à l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement pour les collagénopathies de type 2 permettant de restaurer une croissance osseuse et donc de permettre aux patients de grandir mais surtout d'éliminer les complications dues à cette pathologie. D'autre part, cette pathologie étant encore peu connue ce projet nous permettra de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie.

Afin de satisfaire aux exigences de remplacement, nous avons réalisé un screening in vitro des approches thérapeutiques à tester afin de ne tester in vivo que les stratégies présentant un potentiel thérapeutique élevé. De manière à répondre aux exigences de réduction nous allons utiliser des groupes contrôles en commun quand cela est possible et utiliser les données obtenues en procédure 2 comme données contrôles en procédure 3. Dans le but de répondre aux exigences de raffinement, nous avons établi des points limites adaptés aux animaux que nous utilisons et aux expérimentations que nous pratiquons. Nous estimons que nous allons utiliser au maximum 2345 souris soit 280 souris dans la procédure 1, 565 souris dans la procédure 2, 1500 souris dans la procédure 3.

3958. La majorité des patients atteints de cancers développent des métastases à distance de la tumeur primaire, qui sont le plus souvent responsables du décès des patients. Il est donc important de développer de nouvelles thérapies innovantes ciblant ces métastases.

Les métastases cancéreuses représentent un phénomène complexe dont seulement certaines étapes peuvent être modélisées in vitro. Il est donc nécessaire de disposer de modèles sur animaux permettant de récapituler ce phénomène complexe. Ce projet sera donc réalisé sur des rongeurs, en considérant la forte homologie biologique avec l'humain, et la facilité de leur manipulation.

Les modèles animaux de cancer ne développent que rarement des métastases spontanées ou avec une incidence faible ou tardive. Nous allons donc mettre au point un modèle permettant d'obtenir des métastases expérimentales en court-circuitant les premières étapes du phénomène métastatique (migration dans la matrice extracellulaire, intravasation dans le vaisseau sanguin) en injectant des cellules tumorales directement par voie sanguine. Ces cellules auront une préférence d'invasion métastatique (tropisme) pour les poumons avec une incidence élevée. Cette procédure ne nécessite pas de chirurgie.

Une procédure pilote de mise au point sera réalisée et nous permettra d'établir une grille précise des points limites, de déterminer le taux de prise tumorale, l'incidence, l'apparition des métastases, et de déterminer les critères d'évaluation de l'efficacité d'une molécule sur ce modèle. Une étude statistique permettra une évaluation du nombre d'animaux nécessaire par groupe pour tester l'efficacité de plusieurs molécules anti-tumorales dans le but de réduire le nombre d'animaux.

Ces molécules testées auront été préalablement sélectionnées à partir de modèles expérimentaux réalisés sur des cellules en culture, ou auront déjà démontré une activité dans d'autres types de cancer.

Une quantité totale de 5000 souris est estimée sur les 5 ans du projet.

3959. Des travaux pratiques (TP) en Physiologie sont prévus dans le Programme Pédagogique National de première année du Diplôme Universitaire de Technologie (DUT) Génie Biologique. Le programme prévoit l'apprentissage des techniques utilisées en expérimentation animale afin de réaliser des études permettant une compréhension des grandes fonctions et de leur régulation. Les étudiants doivent connaître les pratiques chirurgicales de base ainsi que les modes d'injections et de prélèvements.

Les TP présentés ici ont donc pour but de familiariser les étudiants, futurs techniciens de laboratoire, à l'expérimentation animale, de leur donner les règles de Bonnes Pratiques de Laboratoire "dans le respect de la réglementation" et de leur apprendre à exécuter un protocole expérimental.

Ces TP, réalisés en première année du DUT, sont réalisés sur un maximum de 120 rats anesthésiés par an soit 600 rats sur 5 ans. Il s'agit de mesurer les volumes plasmatiques et sanguins et de comprendre les mécanismes de régulation de la diurèse et de la glycémie.

Le module de Physiologie s'adresse à l'ensemble de la promotion. Cependant nous avons prévu une séance pour l'ensemble de la promotion et limité les séances suivantes aux étudiants de l'option "Analyses Biologiques et Biochimiques" pour qui cette formation est jugée indispensable. Cela nous permet de réduire le nombre de rats utilisés de 192 à 120 rat par an donc 600 sur 5 ans.

Un environnement enrichi est assuré lors de l'hébergement dans l'animalerie. Les expérimentations se font sous anesthésie générale et l'enseignant s'assure du bon niveau d'anesthésie et d'analgésie ainsi que du déroulement correct des manipulations.

3960. Des travaux pratiques (TP) en Pharmacologie sont prévus dans le Programme Pédagogique National du Diplôme Universitaire de Technologie (D.U.T.) Génie Biologique, option Analyses Biologiques et Biochimiques. Le programme prévoit "une mise en évidence et une quantification d'une activité pharmacologique et/ou toxicologique in vivo".

Les 4 séances de TP présentées ici ont donc pour but de familiariser les étudiants, futurs techniciens de laboratoire, à l'expérimentation animale, de leur donner les règles de Bonnes Pratiques de Laboratoire et de leur apprendre à mettre au point un protocole expérimental ainsi qu'à exploiter les résultats obtenus.

Ces TP réalisés pendant 4 semaines de la deuxième année du D.U.T. sont réalisés sur un maximum de 172 souris non consanguines vigiles ou anesthésiées soit 3 souris par étudiant et 4 pour les démonstrations faites par l'enseignante. Pour l'ensemble du projet demandé pour 5 ans, cela donne un total de $172 \times 5 = 860$ souris.

Les résultats de l'ensemble du groupe de TP sont regroupés pour être exploités statistiquement de façon pertinente tout en limitant le nombre d'animaux utilisés. En effet il est prévu 3 souris par étudiant. Lors des études d'effet, réalisées par un groupe de travaux pratiques, dans le test de nage forcée, cela donne 21 souris témoins et 21 souris traitées par la substance à étudier. Compte-tenu des erreurs de manipulations qui limitent le nombre de valeurs exploitables, c'est le nombre minimal pour arriver à mettre en évidence une différence significative. Pour l'étude pharmacocinétique du paracétamol cela donne 6 souris par temps et ce qui est aussi le nombre minimum pour avoir une courbe de la Concentration plasmatique en fonction de Temps correcte.

L'enseignant s'assure que les manipulations réalisées soient faites correctement et dans le respect de l'animal. En cas de souffrance liée à une mauvaise manipulation (le plus probable) se traduisant par un isolement de l'animal, un poil hérissé et un dos voûté, la souris est euthanasiée par dislocation cervicale.

Ce module de formation prévoit une étude d'effet sur des modèles in vivo. Cependant un module intitulé "Cultures cellulaires-Méthodes alternatives à l'expérimentation animale" est prévu dans la formation et assuré à la suite du module de Pharmacologie.

3961. 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 utilisé dans le cadre de ces modèles est estimé à 1000 souris par an.

3962. La paralysie faciale est une pathologie fréquente responsable d'un déficit moteur des muscles servant à la mobilité du visage en lien avec une lésion du nerf facial.

Les principales complications de cette pathologie concernent l'œil et peuvent aboutir à la perte de la vision. Cela est dû au fait que la paupière paralysée n'est plus capable de se fermer et donc ne peut plus assurer son rôle de protection du globe oculaire contre les agressions extérieures.

De nombreuses techniques médico-chirurgicales ont déjà été développées afin d'améliorer la symétrie faciale et l'occlusion palpébrale lors de ces paralysies faciales mais sans obtenir de réelle efficacité. Cela se rapporte au fait que jusqu'à présent on ne s'est pas attaché à la mesure de l'occlusion palpébrale, indispensable pour réaliser une commande asservie. L'objectif de ce projet est de réaliser et de tester, in vivo, un dispositif implantable, capable de mesurer la position de la paupière. Le but de ce projet à terme vise à réhabiliter le mouvement de paupière de patients souffrant de paralysie faciale.

La mise en place d'un modèle animal s'avère être indispensable puisque l'étude porte sur le mouvement de la paupière. Ce modèle animal repose sur le lapin. Ce dernier possède une paupière qui se rapproche le plus de celle de l'Homme. Les résultats obtenus seront par conséquent les plus proches de ce que l'on souhaite obtenir chez l'Homme.

Au total, 13 lapins seront utilisés afin d'étudier la compatibilité du capteur ainsi que la faisabilité et l'efficacité de ce dernier. Un premier lapin sera utilisé afin d'étudier l'anatomie de sa paupière afin de créer un capteur implantable conforme à

la morphologie du lapin. Il en résultera un prototype de capteur qui sera testé auprès de deux lapins afin d'évaluer la tolérance et l'adaptabilité du dispositif. Si ce test est concluant, le dispositif sera ensuite implanté unilatéralement auprès de 10 lapins sur lesquels les mesures seront effectuées. Ce nombre permet d'avoir suffisamment de données pour que les résultats soient interprétables.

L'implantation du capteur sera réalisée sous anesthésie, une surveillance quotidienne associée à une cure d'antibiothérapie ainsi qu'une analgésie découlera de cet acte chirurgical afin d'assurer un confort post-opératoire optimal pour les animaux.

Les techniques de mesures se feront quant à elles sans aucune médication. Elles reposent sur la mesure du signal provenant du capteur implanté et d'autre part la mesure du mouvement de la paupière grâce à une caméra de haute vitesse. Les lapins seront en dehors de ces temps de mesures surveillés de façon quotidienne afin de vérifier leur bien-être.

Dans un dernier temps, une imagerie IRM AUPRES DE 5 LAPINS anesthésiés MAXIMUM avec le capteur sera réalisée si les tests in vitro (capteur uniquement) sont concluants afin de montrer l'innocuité de la présence de l'implant lors de la nécessité d'avoir recours à ce type d'imagerie chez l'Homme.

3963. Nos projets visent à étudier l'efficacité de nouveaux traitements anticancéreux dans des cancers d'origines diverses qui présentent soit une insensibilité aux thérapies conventionnelles, soit ayant acquis des résistances aux traitements ayant l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) et indiquées dans ces pathologies. Tous les cancers que nous étudierons ont tous comme principale caractéristique d'être incurables et/ou fortement métastatiques.

En plus d'étudier l'efficacité de nouveaux traitements, nous tacherons de déterminer de nouveaux marqueurs prédictifs de la réponse aux traitements de référence. Nous déterminerons également si ces marqueurs peuvent également être considérés comme de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour cela, nous étudierons l'effet de la modulation (extinction ou surexpression) de ces marqueurs sur la prise tumorale. Le but final est de proposer des méthodes rapides de détection de la perte d'efficacité d'un traitement et donc une réactivité interventionnelle lorsque plusieurs lignes thérapeutiques ont une AMM. Notre but est également de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour répondre aux besoins des patients atteints de cancer du rein (protocoles 1, 2 et 3), de cancer du sein (protocoles 4 et 5) et de cancers ORL (protocole 6). Pour ce faire, nous réaliserons différentes études de régression tumorale (xénogreffe) chez la souris nude.

En effet, le protocole 1 a pour but de confirmer que l'inhibition de la polo like kinase 1 (Plk1) par un agent pharmacologique, le volasertib, induit une diminution de la prise tumorale, et ceci afin de pouvoir à terme proposer cette alternative de traitement aux patients atteints de cancer du rein résistants au traitement de référence, le sunitinib.

Les protocoles 2 et 3 ont pour but de déterminer le rôle des protéines Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGFC), neuropiline 2 (NRP2) et tristetraproline (TTP) dans les mécanismes de résistance au sunitinib mis en place dans les patients atteints de cancer du rein. Cette partie a pour objectif d'apporter une connaissance fondamentale du mécanisme de résistance et de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant être inhibées au diagnostic ou consécutivement à l'apparition de phénomènes de résistance.

Le protocole 4 a pour but de déterminer si la protéine TTP est impliquée dans la résistance aux traitements de référence dans les cancers du sein HER2+. De la même manière que les protocoles précédents, cette étude nous permettra d'obtenir des informations sur les mécanismes de résistance mis en place mais aussi de déterminer si TTP pouvait devenir un marqueur prédictif de réponse aux traitements ciblant HER2 ayant une AMM depuis de nombreuses années et ceux mis sur le marché récemment ou en essais cliniques.

Le protocole 5 a pour but de déterminer si l'utilisation du sunitinib, qui est aussi un inhibiteur de la protéine RET surexprimée dans les cancers du sein résistants à l'hormonothérapie, est capable de bloquer le développement tumoral. Cette étude a pour but de pouvoir à termes proposer cette alternative de traitement aux patients atteints de cancer du sein résistants au traitement de référence, le tamoxifen.

Pour finir, le protocole 6 a pour but de déterminer l'efficacité de radiothérapie, par photons ou par protons, dans les cancers de la tête et du cou (cancers ORL). Nous essaierons de comprendre lequel de ces deux traitements induit le moins de phénomènes de sélection de cellules agressives. Pour cela nous comparerons la prise et la croissance de tumeurs générées par xénogreffes de cellules ayant survécues à une ou plusieurs irradiations par photons ou protons.

Conformément aux exigences de remplacement, réduction et raffinement, les expériences sur les animaux ont été précédées de nombreuses expériences réalisées sur des lignées cellulaires. Ces mises au point in vitro nous permettent de diminuer le nombre d'animaux à utiliser dans les expériences in vivo. De plus, une grande importance sera accordée au bien-être des animaux avec un suivi régulier, par un personnel formé à l'expérimentation animale, afin de détecter tout signe de détresse et/ou de souffrance. Si de tels signes devaient apparaître, les mesures nécessaires seront prises grâce à l'application des points limites clairement définis. Conformément aux recommandations en vigueur, nos souris bénéficient d'un milieu enrichi et l'ensemble des manipulateurs est dument qualifié et diplômé dans le domaine de l'expérimentation animale.

En vue de futures applications cliniques, ces études in vivo sont nécessaires et non contournables.

Nous utiliserons pour ce projet un total de 430 souris nude (commercialisées par Janvier Labs).

Nous avons choisi d'utiliser des souris nude (Hsd:ATHymic Nude-Foxn1nu) car elles constituent le meilleur modèle pour la prise tumorale de cellules humaines lors d'une injection sous-cutanée. En effet, ces souris sont immuno-déficientes ce qui permet de réaliser des xénogreffes sous cutanée de cellules humaines dans un modèle murin sans rejet. L'utilisation de cette espèce animale nous permet par ailleurs de réduire le nombre d'animaux nécessaire car nous nous servons d'un modèle expérimental que nous connaissons parfaitement.

3964. Avec plus de 40 000 nouveaux cas et 17.000 victimes par an, le cancer colorectal (CCR) est la plus fréquente des tumeurs malignes et la deuxième cause de décès par cancer en France. Si la survie relative à 5 ans est de 57 %, le pronostic est étroitement lié au stade auquel le cancer est diagnostiqué. Notamment, elle n'est que de 5 % en cas de cancers métastatiques malgré l'amélioration de la chirurgie, des chimiothérapies et des thérapies ciblées. A ce jour, la chirurgie et des cocktails de chimiothérapies (5-fluorouracile, irinotécan et oxaliplatine) visant uniquement les cellules tumorales en prolifération demeurent la pierre angulaire du traitement des CCR métastatiques. Cependant, l'efficacité de ces traitements est fortement entravée par l'apparition fréquente de la résistance aux médicaments et la récurrence tumorale. La compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans la récurrence tumorale a connu un essor important avec la découverte de l'existence des cellules souches cancéreuses (CSC) dans de nombreux cancers, incluant le cancer du côlon. Des données récentes montrent que ces CSC résisteraient aux thérapies conventionnelles et seraient à l'origine de l'apparition de métastases et de la récurrence tumorale.

Il est donc primordial de décrypter les voies de signalisation contrôlant leur programme leur capacité de dissémination et de chimiorésistance. La connaissance de la biologie des CSC coliques permettra le développement de nouvelles thérapies ciblées plus spécifiques. Dans ce contexte, nous avons récemment identifié une nouvelle voie de signalisation impliquée dans la chimiorésistance des CSC. Nous avons montré que le récepteur PXR (NR1I2) est responsable de la chimiorésistance des CSCs (brevet WO 2016/026933 A1 "Adjuvant or neoadjuvant therapy for sensitizing cancer stem cells to chemotherapy"). Parallèlement à ces résultats, nous avons récemment réalisé un criblage à haut débit de deux bibliothèques d'ARN interférents afin de bloquer ou d'augmenter l'activité de microARNs (miRNAs). Cette stratégie a permis d'identifier un miRNA (le miR-148a-3P) capable d'un part d'inhiber l'expression de PXR et d'autre part de diminuer la population CSC.

Dans le cadre de ce projet de recherche, nous voulons donc évaluer l'impact du miR-148a-3P sur le potentiel d'échappement aux chimiothérapies et d'initiation tumorale des cellules souches cancéreuses coliques. Pour mener à bien notre projet, nous réaliserons des xénogreffes de cellules tumorales humaines (HT29) en sous-cutanée dans des souris immunodéprimées (n=72) afin de déterminer les effets du miR-148-a-3P sur la chimiorésistance, la récurrence post-traitement et le potentiel d'initiation tumorale des cellules tumorales coliques.

Afin de respecter les principes des 3Rs (Réduire, Raffiner et Remplacer), nous avons :

- i) réduit au minimum le nombre d'animaux requis pour ces expériences originales qui ne peuvent pas être réalisées autrement que sur la souris immunodéprimée, sans que cela se traduise par l'obtention de résultats moins fiables.
- ii) évalué les souffrances subies par les animaux (injections de cellules tumorales en sous-cutanée, injections de chimiothérapies et sacrifices) afin de minimiser la douleur subie par les animaux et d'identifier les critères d'interruption.
- iii) optimisé les procédures expérimentales afin de réduire l'inconfort subi par les animaux tout en optimisant les informations obtenues, via notamment la mise en place de procédures de remplacement par des modèles in vitro afin de confirmer et de renforcer les résultats obtenus.

3965. La naissance prématurée est un problème de santé publique important, puisqu'il y a 13 millions de naissance prématurée par an, et que la prématurité entraîne de nombreux troubles du développement. La prématurité est due à une multitude de facteurs inflammatoires, génétiques et environnementaux. Cette prématurité peut être liée à une augmentation de la mortalité périnatale. L'identification de cibles moléculaires pourraient permettre de prévenir certaines naissances prématurées et décès périnataux. Récemment, des voies de signalisation ont été suspectées comme étant importantes dans la régulation de la naissance et des premières heures de la vie. Nous disposons d'un modèle de souris qui présentent un défaut de régulation de ces voies de signalisation, et nos observations préliminaires montrent qu'elles présentent une mortalité périnatale importante par rapport à des souris contrôles. Notre projet vise à déterminer si cette mortalité est associée à une naissance prématurée et à identifier les mécanismes physiologiques qui sont impliqués dans cette mort précoce.

Pour cela, nous proposons un projet qui nécessite l'utilisation de souris sauvage et de souris invalidée pour le gène d'intérêt. Ces souris seront mises en croisement et nous déterminerons avec précision si l'absence du gène rend les embryons "plus sensibles" et donc augmente leur risque de décès. Ainsi ce projet devrait nous permettre d'identifier des cibles qui pourraient jouer un rôle dans la mort périnatale.

Dans ce projet, chaque procédure découle de la précédente. Nous attendrons d'avoir tous les résultats d'une procédure avant de lancer la suivante. De cette manière, nous limiterons l'utilisation des animaux. Evidemment si une procédure ne nous fournit pas de résultats, le projet s'arrêtera et nous n'utiliserons pas le nombre estimé de souris.

L'ensemble du projet devrait nécessiter l'utilisation de 476 souris adultes et 1416 embryons (stade embryonnaire E19) (total 1888 animaux).

3966. Les maladies infectieuses pulmonaires, dont la tuberculose, la mucoviscidose et les pneumonies sont parmi les plus meurtrières. Ainsi par exemple, la tuberculose est responsable d'environ 1,5 millions de décès chaque année dans le monde. Elle est causée par l'infection par voie aérienne de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*. De même la mucoviscidose implique plusieurs pathogènes pulmonaires, principalement *Pseudomonas aeruginosa*, et la bactérie *Streptococcus pneumoniae* est responsable de nombreux cas de pneumonies, dont des surinfection chez les patients infectés par le virus de la grippe.

Parmi les axes principaux de recherche dans ces pathologies figurent la recherche de cibles thérapeutiques (sur l'hôte ou la bactérie elle-même). Notre équipe contribue à cette recherche en tentant de comprendre les mécanismes de l'interaction hôte-pathogène dans ces pathologies, ce qui implique l'utilisation de modèles cellulaires et animaux d'infection.

Cette approche nous a permis d'identifier des cibles d'actions potentielles chez l'hôte. En particulier nous avons récemment identifié un mécanisme permettant à l'organisme de contrôler certaines bactéries pathogènes, dont *M. tuberculosis*, et reposant sur leur intoxication par le zinc dans les macrophages. Des criblages *in vitro* nous ont permis d'identifier des cibles potentielles de ce mécanisme, dont l'inhibition pourrait en augmenter l'efficacité. Le présent projet s'inscrit dans ce cadre et vise à étudier l'effet de l'inhibition de ces cibles par de petites molécules déjà identifiées sur l'efficacité de l'organisme à contrôler les pathogènes pulmonaires cités plus haut. L'efficacité des molécules sera d'abord testée *in vitro* dans des macrophages cultivés au laboratoire. Seules les molécules montrant une efficacité *in vitro* seront testées *in vivo* chez la souris. Par ailleurs, les thérapies ciblant l'hôte complètent l'antibiothérapie plus classique. Dans ce cadre, et en collaboration avec l'Institut Pasteur à Paris, nous souhaitons tester l'efficacité de nouveaux antibiotiques de la famille des fluoroquinolones, dont l'efficacité contre *M. tuberculosis* a été démontrée *in vitro*.

Dans l'ensemble de ces études, les animaux infectés seront utilisés pour déterminer des paramètres de sensibilité à l'infection (charges bactériennes, histologie). Le nombre maximal d'animaux utilisés sera de 3360 souris C57BL/6. Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 3 étapes dans notre raisonnement.

Tout d'abord, les expériences réalisées font suite à des étapes de validation dans des modèles cellulaires : ainsi les expériences proposées sont réalisées au stade où les méthodes de remplacement de l'expérimentation animale ont été exploitées et s'avèrent suffisamment prometteuses pour utiliser le modèle intégré murin.

Ensuite, certaines étapes de nos projets (clairement identifiées dans les procédures détaillées) pourront en effet être suivies de décisions de poursuite ou d'arrêt de l'étude en fonction des promesses offertes par les résultats.

Finalement, l'expérience des années précédentes nous a fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir en première intention des résultats statistiquement significatifs.

La souffrance et/ou le stress animal sont présents à deux niveaux dans nos expériences : i) lors de l'inflammation pulmonaire induite par l'infection et ii) lors des traitements administrés. Ces deux niveaux de stress ou de douleur font l'objet d'une prise en charge spécifique indiquée dans les procédures respectives et déjà appliquées dans nos projets antérieurs.

3967. L'addiction est une maladie chronique caractérisée par un très fort taux de rechute, qui est le problème majeur pour les cliniciens. Néanmoins à l'heure actuelle il est impossible de prédire quels patients rechuteront, et quand cette rechute se produira. Les variabilités individuelles sont en effet extrêmement importantes.

Bien que la recherche de biomarqueurs de la rechute soit en pleine effervescence, elle se heurte en clinique à de très nombreuses interférences, incluant des facteurs confondants et les comorbidités. L'utilisation d'un modèle animal permet de travailler dans un environnement de laboratoire contrôlé en s'affranchissant de ces nombreux facteurs. Le rat est un modèle de choix pour l'étude des phénomènes addictifs. Il possède les structures ancestrales impliquées dans les phénomènes de récompense et a une structuration cérébrale proche de celle de l'homme. Il est également capable d'apprendre des comportements complexes.

Le but principal de ce projet est de mieux comprendre ce phénomène de rechute chez le rat, avec deux objectifs spécifiques : 1) valider un marqueur périphérique permettant d'évaluer la vulnérabilité à la rechute, et 2) comprendre au niveau neurobiologique les raisons moléculaires et cellulaires des rechutes, ouvrant ainsi la voie vers de nouvelles stratégies thérapeutiques. Il est urgent de mieux comprendre la neurobiologie des rechutes, afin d'apporter de nouveaux outils aux médecins, et de nouvelles solutions aux malades.

Ce projet de recherche fondamentale s'intéresse donc à des questions de santé publique. Ce projet ayant pour but d'étudier des phénomènes psychiatriques, les méthodes alternatives actuelles sont insuffisantes. Les modifications cérébrales et comportementales complexes étudiées s'inscrivent dans le cadre d'une étude intégrée et doivent donc être réalisées chez des animaux. Pour cela, nous utiliserons des rats provenant d'un élevage agréé. Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. Le nombre total de rats nécessaire à la réalisation de ce projet est de 1020 pour une durée de 5 ans. Ce projet met en jeu des procédures chirurgicales, l'administration de substances à action psychotrope et des prélèvements sanguins. Les rats seront observés quotidiennement. Toutes douleurs, souffrances, angoisses ou stress qui pourraient être observés seront soulagés avec des analgésiques à n'importe quelle étape de la procédure. Une grille classique d'évaluation sera utilisée pour détecter tout signe de douleur chez les animaux. Le comportement, l'apparence et le poids de chaque animal seront évalués et mesurés chaque jour.

3968. Récemment, l'utilisation de certains anticorps contre des maladies cancéreuses a permis des avancées considérables, en particulier contre le mélanome.

En particulier, les anticorps anti-CTLA4 et anti-PD1 en monothérapie ont démontré leur efficacité clinique dans plusieurs types de cancers dont le mélanome. Ces anticorps monoclonaux permettent un redémarrage de la réponse immunitaire contre le cancer qui est réprimée par les cellules cancéreuses. Par la suite, ces deux anticorps ont été utilisés en combinaison, augmentant ainsi l'effet anti-tumoral chez certains patients atteints de mélanome.

Des résultats obtenus au sein de notre laboratoire ont démontré le rôle crucial des bactéries de la flore intestinale dans le déclenchement des réponses immunitaires anti-tumorales lors d'un traitement anti-CTLA4 et cyclophosphamide. Or chez les patients atteints d'un cancer, de nombreux facteurs entraînent un déséquilibre de la flore intestinale (dysbiose). Par conséquent, nous émettons l'hypothèse que la réponse des patients au traitement anti-CTLA4 + anti-PD1 soit fonction de la composition en bactérie de la flore intestinale. Ainsi, notre objectif est d'analyser l'influence des bactéries de la flore intestinale sur l'efficacité anti-tumorale d'un traitement combinant anti-CTLA4 et anti-PD1. Pour cela, nous collectons les fèces

de patients atteints de mélanome dans le but de réaliser des expériences de transplantation fécale chez la souris. Par ailleurs, nous utiliserons des bactéries ayant été démontré dans notre laboratoire comme activant la réponse immunitaire anti-tumorale et favorisant l'effet de thérapies anti-cancéreuses. Puis, après injection de lignées tumorales, les souris seront traitées ou non avec anti-CTLA4 + anti-PD1 et nous étudierons les conséquences sur la progression tumorale, sur l'efficacité anti-tumorale du traitement et sur l'activation du système immunitaire. Ces manipulations vont nous permettre de déterminer les bactéries ou groupes de bactéries améliorant la réponse au traitement anti-CTLA4 + anti-PD1. Mais également de caractériser les déséquilibres de la flore intestinale des patients liées à la pathologie cancéreuse et ainsi de sélectionner les patients pouvant bénéficier d'une supplémentation en bactéries bénéfiques comme traitement adjuvant (additionnel) au traitement anti-CTLA4 + anti-PD1.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer ex vivo un système immunitaire complet, avec toutes ses interactions humorales et cellulaires du fait de sa complexité. Le projet nécessitera 6520 souris. Ce nombre d'animaux se justifie par les différentes combinaisons thérapeutiques, le nombre de patients et l'étendue de la diversité de la flore intestinale.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de réduction et raffinement. D'une part, elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur). D'autre part, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Les animaux bénéficieront d'un environnement enrichi (cocoons).

3969. La maladie de Huntington est une affection neurodégénérative héréditaire qui entraîne une altération profonde et sévère des capacités physiques et intellectuelles. La personne malade perd peu à peu son autonomie et devient dépendante pour les actes de la vie quotidienne. La maladie touche indistinctement les hommes et les femmes ; quand un des parents est atteint, les enfants ont un risque sur deux d'hériter du mauvais gène qui provoquera la maladie, généralement à l'âge adulte. C'est une maladie génétique qui ne saute pas de génération. Les symptômes peuvent varier d'un malade à l'autre. On peut observer sur le plan moteur : démarche instable, agitation, impatience, tics et mouvements saccadés. Sur le plan intellectuel, on notera la perte du sens de l'orientation, troubles de la mémoire, troubles émotionnels, lassitude, sautes d'humeur, agressivité, repli sur soi. Dans tous les cas les décès sont observés 20 ans après les premiers symptômes qui apparaissent entre 30 et 50 ans. Des traitements sont à l'étude, qu'ils soient médicamenteux ou autres, mais n'ont pas encore abouti à un ralentissement de la progression de la maladie. Les seules médications actuellement utilisées sont symptomatiques. C'est dans un modèle de souris génétiquement modifiées (appelées souris R6/2) que furent initialement mises en évidence des inclusions nucléaires. Elles furent secondairement identifiées chez l'homme. Le modèle souris a donc permis de découvrir une lésion humaine jusqu'alors passée inaperçue. L'enrichissement de l'environnement retarde les signes moteurs et l'atrophie cérébrale associée dans ce modèle. Ainsi il existe une grande similitude entre la maladie humaine et les symptômes observés dans le modèle souris R6/2, ce qui justifie l'utilisation de ce modèle dans la recherche de médicaments contre cette maladie mortelle. L'identification de nouveaux traitements contre la MH est un vrai défi. Le but de cette étude sera d'évaluer le potentiel thérapeutique en bi-thérapies de 2 composés sur le modèle souris R6/2 de la maladie de Huntington. Ces composés ont été inclus dans des nanoparticules, ce qui permet leur administration buccale ou rectale et leur absorption au travers des muqueuses. Individuellement chaque composé a montré des effets protecteurs de la maladie de Huntington dans des modèles de la maladie. Aussi une bithérapie nous semble une stratégie adéquate pour pallier les symptômes variés de cette maladie. Cent vingt six souris seront utilisées pour 2 séries d'expérimentation afin de tester des symptômes différents.

La règle des 3R sera appliquée comme suit :

- 1- Afin de remplacer au mieux les expériences par des méthodes alternatives : Toutes les expériences effectuées sur les souris sont précédées de tests effectués dans des modèles drosophile de la maladie de Huntington.
- 2- Afin de réduire le nombre d'animaux et de limiter la répétitivité, nous avons évalué grâce à nos expériences précédentes que le nombre d'animaux nécessaire était de 10 animaux par groupe permettant d'obtenir des données statistiques.
- 3- Afin de raffiner le traitement, nous avons opté pour des traitements par administration orale, ce qui est encore extrêmement peu utilisé dans le cas de maladies neurodégénératives.
- 4- Les souris sont gardées dans des milieux enrichis (copeaux et jouets ajoutés).

3970. La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative de l'adulte, qui se traduit par une dégénérescence neurologique provoquant d'importants troubles moteurs et cognitifs et conduisant à la perte de l'autonomie et à la mort. La MH est à l'heure actuelle incurable, c'est pourquoi il est urgent de développer des traitements qui pourraient cibler directement les processus moléculaires sous-jacents aux symptômes de cette pathologie. La MH affecte plus spécifiquement le striatum dans le cerveau. Au niveau moléculaire, cela se traduit par la diminution de l'expression de nombreux gènes jouant un rôle essentiel dans l'activité neuronale. Les pathologies neurologiques à répercussions locomotrice et comportementales comme la MH nécessite d'étudier la maladie sur l'organisme entier et ne peuvent être réalisées in vitro. L'animal est donc nécessaire et en particulier les modèles murins de la MH, dont le modèle transgénique R6/1, qui reproduisent les phénotypes moléculaire et comportementaux observés chez les patients. Restaurer l'expression des gènes dérégulés est considéré comme une piste thérapeutique prometteuse. Nous avons identifié une cible thérapeutique dont la modulation améliore l'expression des gènes dérégulés dans la MH. L'objectif du projet est de tester l'effet d'un composé capable d'activer cette cible dans le

cerveau, lorsqu'il est injecté par la voie systémique, sur le phénotype comportemental de souris modèles de la MH. L'étude envisagée consiste à traiter de façon hebdomadaire des souris (R6/1 et contrôle) et d'examiner l'effet du traitement sur les phénotypes cognitifs et moteurs des souris R6/1. Prenant en compte la stratégie des 3R (remplacement, réduction et raffinement) et des calculs de puissance, nous limiterons le nombre de souris au minimum nécessaire (i.e. 216). Par ailleurs, dans un souci de raffinement du projet et du respect du bien-être animal, les expériences seront menées à un âge où les animaux ne sont pas atteints des symptômes les plus invalidants de la MH et tous les animaux sont hébergés dans des cages ouvertes enrichies en matériel ouaté, leur permettant la création d'un nid. Enfin, un suivi quotidien des souris sera réalisé afin d'anticiper tout signe nécessitant chez l'animal des soins particuliers. Toute anomalie repérée de type dos vouté, prostration, tremblement, difficulté respiratoire, vocalises répétées, automutilation, défécation anormale, sera suivie d'un entretien avec le responsable du bien-être animal et le responsable du projet afin de décider de la mise à mort ou non avant la fin de l'expérience. L'apparition de tels signes de détresse ne devrait se produire qu'à titre exceptionnel.

3971. La maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique sont des maladies inflammatoires pouvant conduire dans le temps au cancer du colon. Le mécanisme de ces maladies est multifactoriel et implique un déséquilibre de la flore digestive avec une augmentation de la perméabilité de la barrière muqueuse associée à une dérégulation de la réponse immunitaire. Nous souhaitons donc d'une part définir le rôle peu décrit au cours de ces maladies des macrophages, cellules immunitaires clés dans les réponses inflammatoires, et d'autres part le rôle de la colonisation du tractus gastro-intestinal par une levure, *C. albicans*. Cette étude permettra de mettre en évidence les caractères fonctionnels et phénotypiques des macrophages dans ces pathologies, l'interaction d'un pathogène et ainsi de choisir une approche pharmacologique afin de moduler les fonctions des macrophages et de limiter les mécanismes inflammatoires.

Les modèles expérimentaux murins utilisés, modèle de maladie de Crohn, de rectocolite hémorragique et de carcinogénèse colite, sont des modèles d'induction pharmacologique de l'inflammation ou de la carcinogénèse du colon déjà décrits et validés dans la littérature. Nous rechercherons le rôle de récepteurs exprimés à la surface des macrophages servant à la reconnaissance de pathogènes dont le rôle a récemment été suggéré. Nous disposons de souris spécifiquement invalidées au niveau des macrophages pour les récepteurs Dectine-1 ou Mannose. Nous souhaitons utiliser ces modèles afin de mettre en évidence l'implication des macrophages et de ces récepteurs dans les maladies inflammatoires du colon et dans le développement tumoral. Une approche pharmacologique visant à moduler les fonctions des macrophages sera ensuite mise en place. L'ensemble de cette étude comprendra 1284 souris.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet. L'expérimentation fait l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux adaptée à l'expérience et aux potentiels effets indésirables des procédures sur l'état de santé global des animaux. Les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. Ce projet a déjà obtenu l'accord du comité d'éthique régional et les études effectuées nous ont permis de maîtriser ces modèles murins permettant de réduire le nombre d'animaux et de mieux appréhender les points limites pour le bien-être des animaux. De plus, nous avons également pu valider certaines approches expérimentales in vitro permettant d'optimiser l'utilisation des animaux.

3972. Notre équipe développe de nouvelles approches thérapeutiques pour les maladies autoimmunes/inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR) et la maladie de Crohn. Ces pathologies évoluent par poussées, espacées par des périodes de rémission et, aboutissent en quelques années à une invalidité aux conséquences socio-économiques lourdes.

Lors de maladies auto-immunes, le système immunitaire reconnaît les antigènes du soi comme pathogènes et déclenche une réaction complexe aboutissant à l'élimination de ces antigènes. Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) participent au maintien de l'homéostasie de la réponse immune en réprimant l'emballement de la réponse immunitaire par différents mécanismes de suppression. Notre hypothèse est que la manipulation de ces Tregs permettrait de contrôler la réponse immune au cours de pathologies auto-immunes afin de restaurer une tolérance aux antigènes du soi.

Par ailleurs, les cellules dendritiques (DCs), cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T, jouent également un rôle clé dans la régulation de la réponse immune. En fonction de leur état de maturation, elles sont capables, soit d'inhiber la réponse immune (cas des DCs immatures) pour s'orienter vers des phénomènes de tolérance, soit de stimuler la réponse immune (cas des DCs matures) pour aboutir à l'élimination de l'antigène. Nous avons déjà démontré le potentiel de DCs immatures (iDCs) dans une stratégie thérapeutique préventive de la PR et travaillons aujourd'hui sur des approches visant à bloquer les cellules à l'état immature pour envisager des stratégies thérapeutiques curatives se rapprochant de la situation en clinique humaine.

Plusieurs modèles expérimentaux d'arthrite existent chez la souris et, parmi eux, le modèle d'arthrite induite au collagène bovin (CIA pour « Collagen induced arthritis ») constitue un modèle de choix qui permet de reproduire la majorité des caractéristiques biologiques et cliniques observées dans la PR chez l'homme. Il existe par ailleurs une lignée de souris immunodéficiente knock-out pour le gène RAG (RAG2KO), qui après transfert de cellules CD4 naïves, développe une colite mimant les caractéristiques de la maladie de Crohn.

Notre unité de recherche utilise ces deux modèles expérimentaux pour élaborer et tester de nouvelles approches thérapeutiques afin de rétablir une homéostasie de la réponse immune.

Le but de ce projet est de déterminer l'efficacité thérapeutique de cellules dendritiques (DCs) tolérogènes et de lymphocytes T régulateurs (Tregs) dans la CIA et le modèle de colite expérimentale. Nous souhaitons :

1. Etudier l'impact sur la réponse immune de l'injection de différents types de DCs traitées par des agents bloquant leur maturation ainsi que la migration des DCs in vivo.
2. Définir la sous-population de Tregs la plus efficace en stratégie thérapeutique curative

3. Définir les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de l'effet thérapeutique observé.

Pour réaliser ce projet, 1400 souris seront utilisées au maximum sur 5 ans soit 1 équivalent de 280 souris/an.

Toutes les dispositions seront prises pour respecter la règle des 3R :

- Réduction : le nombre d'animaux a été calculé avec l'aide d'un logiciel permettant d'évaluer le nombre d'animaux minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les paramètres à mesurer (données préliminaires obtenues dans d'autres expériences réalisées au laboratoire)

- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Des gels de nourriture hydratée seront placés dans la litière afin de faciliter l'accès à la nourriture et à l'eau pour les animaux arthritiques. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement.

- Remplacement : Les stratégies de thérapie cellulaire sur des modèles de pathologie auto-immunes ne peuvent être réalisées que sur animaux vivants pour se placer dans un contexte physiologique et immunologique intégré. Il n'est donc pas possible de prévoir une méthode substitutive pour répondre à la question scientifique de ce projet. Néanmoins, il faut souligner que, sur l'ensemble des animaux utilisés dans ce projet, seuls 15 à 20% d'entre eux seront susceptibles de développer une arthrite (groupes contrôles positifs et 50% des groupes traités). Les autres étant des groupes de souris naïves ou servant au prélèvement d'organes.

3973. Le syndrome de Down (SD) est la principale cause génétique de déficience intellectuelle avec des patients présentant un QI proche de 50 et des malformations congénitales. Malgré le fait que ce soit l'une des premières maladies génétique identifiée, ce n'est que récemment, grâce aux études réalisées sur des souris mimant le Syndrome de Down, que nous commençons à comprendre comment la trisomie peut avoir un impact sur les fonctions cognitives. En effet, plusieurs études menées avec des modèles de souris 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 due à un neurotransmetteur (c'est à dire : 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. 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 avons déjà montré l'efficacité d'un traitement avec une molécule agoniste inverse (c'est à dire qui interagit avec le même récepteur mais qui produit l'effet pharmacologique opposé). D'autre part, plusieurs études tendent à montrer que le gène responsable de l'augmentation de cette activité inhibitrice serait une enzyme surexprimée dans la trisomie 21. Pour aller plus loin dans ce domaine et confirmer le potentiel de cette voie de signalisation comme cible thérapeutique pour le Syndrome de Down, nous proposons d'utiliser une molécule agoniste inverse sur une lignée murine qui ne sur-exprime que cette enzyme de façon spécifique et qui présente des déficits cognitifs comparables aux patients. 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. A notre connaissance, cette expérience n'a jamais été réalisée. Ces tests mnésiques ont déjà montré dans ce modèle sur-exprimant cette protéine des déficits marqués. Nous étudierons donc le résultat obtenu en utilisant 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 et sous traitement avec la solution véhicule seule (c'est à dire sans la drogue), 15 animaux sur-exprimant la protéine d'intérêt sous traitement avec la solution véhicule seule (confirmation du phénotype), 15 animaux contrôle sous traitement (effet de la drogue sur des animaux sans modification génétique) et 15 animaux surexprimant la protéine d'intérêt sous traitement (effet de la drogue sur les phénotypes). Le traitement a déjà été utilisé plusieurs fois sur des modèles murins de trisomie 21 complexe (portant une trisomie d'un large fragment homologue au chromosome 21 humain). Le traitement n'a pas montré d'effets néfastes sur les animaux contrôles (sans modification génétique) utilisés précédemment. 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. Cependant, comme le suivi du bien-être animal est primordial pour le bon déroulement des analyses comportementales, 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.

3974. Le virus de la bursite infectieuse aviaire (IBDV) est le principal virus immunodépresseur chez le poulet (*Gallus gallus*) et infecte également, pour certaines souches, la dinde (*Meleagris gallopavo*). Il détruit les lymphocytes B qui en temps normal produisent les anticorps protégeant les animaux des infections microbiennes.

Le virus est extrêmement contagieux et l'infection s'effectue par voie orale ou respiratoire. Les signes cliniques de la maladie, dite bursite infectieuse aviaire (IBD) ou maladie de Gumboro, sont, chez le poulet, durant la phase précoce : anorexie, plumes ébouriffées, dépression, diarrhée suivies d'une prostration de l'animal. La mortalité varie de 0 à 60 % suivant la virulence de la souche. Durant la phase chronique de la maladie, les sujets survivants, du fait de la destruction de leurs lymphocytes B par le virus, sont immunodéprimés et développent des infections secondaires aux manifestations cliniques variables.

Afin de mieux comprendre cette maladie dommageable pour les animaux et les élevages et notamment pour comprendre les bases moléculaires de la virulence (en l'absence de marqueur moléculaire fiable de virulence), la caractérisation *in vivo* du pouvoir pathogène des souches d'IBDV est nécessaire. L'utilisation de l'expérimentation sur animaux est donc obligatoire. Un protocole standardisé, réalisé en conditions confinées, a donc été mis en place au laboratoire. Il est basé sur l'inoculation de poulets ou de dindes exempts d'organismes pathogènes spécifiques à l'aide de stocks viraux de référence. Une notation

clinique régulière des animaux est ensuite réalisée à l'aide d'une grille symptomatique. Un point limite est défini à l'aide de cette grille afin de limiter la souffrance des animaux et de les euthanasier dès que le point limite est atteint. A certains moments-clés de l'infection (2, 4, 10 et 21 jours post-infections), certains animaux sont euthanasiés afin d'effectuer des prélèvements d'organes. Les effectifs des animaux ont été réduits au minimum permettant la mise en évidence de faibles taux de mortalité et l'emploi de tests statistiques à chaque temps de prélèvements. Ce projet, étalé sur 5 ans, emploiera un nombre maximal de 3400 animaux (poulets et dindes confondus).

3975. L'un des objectifs de ces programmes est de développer de nouveaux traceurs utilisables en imagerie scintigraphique pour explorer la neuroinflammation dans différentes atteintes du système nerveux central, en particulier les maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer). Ces traceurs visent différentes cibles moléculaires cérébrales et doivent être validés chez l'animal avant de pouvoir être proposés en clinique. Cette validation est donc réalisée dans un modèle animal qui mime le phénomène de neuroinflammation que l'on retrouve dans différentes pathologies humaines.

Le modèle de neuroinflammation utilisé sera celui d'une lésion d'une partie du cerveau chez le rat adulte. Ce type d'étude nécessite l'utilisation du rat qui est l'espèce la plus adaptée en raison du modèle de lésion à l'acide quinolinique bien décrit pour cette espèce ainsi que de son gabarit et de sa robustesse.

Remplacement : Cette étude de biodistribution in vivo de nouveaux radiotraceurs TEP sur des rongeurs ne peut être substituée par une méthode alternative in vitro ou sur cellules. Car l'objectif final est d'utiliser ces mêmes traceurs pour l'imagerie in vivo en clinique.

Raffinement : Les animaux seront hébergés par deux en présence d'un enrichissement comprenant un tunnel en plastique et papier absorbant.

Réduction : La lésion étant unilatérale, on comparera chez chaque animal l'accumulation du traceur du côté lésé par rapport au côté intact.

Les groupes seront comparés entre eux par des tests statistiques adaptés et l'imagerie permettra de réduire l'effectif.

Ce projet vise à valider de nouveaux traceurs radioactifs qui permettront de quantifier le processus de neuroinflammation en imagerie TEP (tomographie par émission de positron) dans un modèle de lésion cérébrale induit par l'acide quinolinique.

Pour cette étude nous aurons besoin de 540 animaux pour l'ensemble du projet pendant 3 ans.

3976. 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.

3977. 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).

3978. Chez l'homme, les épidémies de grippe saisonnières affectent chaque année 5 à 15 % de la population. Au plan mondial, l'OMS estime que les épidémies de grippe annuelles sont responsables d'environ 250 000 à 500 000 décès par an. De plus, les retombées économiques des épidémies grippales saisonnières sont considérables. Malgré la disponibilité de vaccins et de traitements antiviraux spécifiques, la grippe saisonnière reste encore à l'heure actuelle un problème mondial de santé publique. Deux formulations sont couramment utilisées pour l'élaboration des vaccins antigrippaux humains. Toutes deux nécessitent, lors de la première phase de production, la culture et l'amplification de virus grippaux dans la cavité allantoïque d'œufs de poule embryonnés. Par conséquent, la technique de production vaccinale est un processus particulièrement long, qui peut prendre de 7 à 13 mois. Comme cela fut le cas dans le contexte de l'émergence du virus pandémique H1N1 en 2009, ce délai est trop important pour répondre à un besoin urgent de doses vaccinales. Ainsi, le développement de formules vaccinales innovantes, capables de proposer un mode de production plus rapide et moins coûteux, reste nécessaire.

Dans ce contexte, nous proposons la mise au point d'un nouveau vaccin permettant de répondre aux différentes problématiques liées à la vaccination antigrippale. Ainsi, la formulation innovante de ce vaccin permettra de diminuer significativement le temps de production vaccinal et de réduire son coût. De plus, nous utiliseront un mode d'administration innovant, non invasif et sûr, qui permettra d'atteindre plus rapidement un fort taux de couverture vaccinale.

Afin de mettre au point notre modèle expérimental puis de tester l'efficacité de notre vaccin et d'optimiser le schéma thérapeutique, ce projet durera 5 ans et comprendra 6 expérimentations sur un total de 440 souris femelles. Le nombre d'animaux inclus dans une expérience répond à des besoins statistiques et à la nécessité d'inclure des groupes expérimentaux témoins non vaccinés.

Dans le cadre de ce projet, nous appliquerons la règle des 3R (Réduction, Raffinement et Remplacement). La stratégie pour réduire le nombre d'animaux reposera sur une expérience préliminaire permettant, d'une part, de valider le modèle expérimental et d'autre part, de définir les meilleures conditions de vaccination. Les souris seront hébergées par groupes sociaux et disposeront d'eau de boisson et de nourriture à volonté. Afin d'enrichir le milieu et de maximiser le bien-être animal, les animaux auront à leur disposition une maisonnette ainsi que des rouleaux en carton. De la musique sera également diffusée au sein de l'animalerie. De plus, une gestion précise de l'anesthésie/analgésie est étudiée pour chaque procédure expérimentale en vue d'optimiser le bien-être animal. Des points limites quantitatifs, spécifiques aux procédures, ont également été établis pour l'ensemble des procédures expérimentales (= raffinement). Le remplacement n'est pas envisageable car il n'existe, à l'heure actuelle, aucune méthode in vitro permettant de tester l'efficacité d'un vaccin.

3979. Le squelette constitue une entité anatomique, qui contient 99% du calcium corporel total, a pour rôle de protéger les organes vitaux, contient la moelle osseuse et est central pour la locomotion. Les os sont un tissu vivant qui se reconstruit constamment tout au long de la vie par l'intermédiaire d'un processus au cours duquel les os sont formés et remodelés.

Comme tous les autres tissus, les os peuvent être touchés par des maladies complexes qui endommagent le squelette et rendent les os faibles et vulnérables aux fractures. La maladie osseuse la plus commune est l'ostéoporose, qui est caractérisée par une faible masse osseuse et une détérioration de la structure osseuse qui augmente les risques de fractures. L'ostéoporose est une maladie fréquente chez les femmes après la ménopause quand la masse osseuse diminue à cause de la carence en hormones féminines (œstrogènes). Afin d'acquérir une connaissance de la pathogenèse des maladies osseuses et leur traitement, l'utilisation d'animaux de laboratoire est devenue essentielle. Parmi les modèles expérimentaux, le plus utilisé est l'ostéoporose induit par l'ovariectomie (castration chirurgicale) bilatérale. Chez la souris, après ovariectomie, les altérations osseuses imitent les modifications osseuses suivant la ménopause chez les humains. Le grand intérêt de ce modèle d'ostéoporose médié par les hormones est de pouvoir étudier l'évolution de la déstructuration et la régénération de l'os sur les mêmes animaux de manière longitudinale.

Les méthodes courantes utilisées en clinique et dans la recherche, comme la densitométrie osseuse pour investiguer la masse minérale osseuse, sont limitées pour saisir les risques de fractures et la réponse aux thérapies, car la résistance aux fractures est aussi dépendante de la microstructure de l'os.

La connaissance de la microarchitecture osseuse est un indice clé pour comprendre la physiopathologie des maladies de l'os et pour améliorer leur diagnostic et leur traitement. Le suivi des paramètres de microarchitecture pendant le traitement doit permettre l'évaluation de l'efficacité réelle du traitement de maladies comme l'ostéoporose. Pour cela, la mise en place de méthodes rapides et quantitative d'imagerie 3D, non-invasive et non-destructrice, accompagnée en parallèle par l'analyse de marqueurs sanguin du métabolisme osseux est primordiale.

Les objectifs de ce projet sont :

- évaluer, valider et comparer les résultats de l'analyse in vivo et ex vivo par scanner μ CT avec les résultats publiés dans la littérature

- valider l'analyse sérologique de marqueurs métaboliques osseux

Remplacement: Nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle in vitro ou de culture cellulaire ne nous permet d'étudier la qualité de l'os.

Réduction: Ainsi, pour ce projet, 42 souris seront utilisées. Le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats exploitables pour une analyse statistique. Les analyses réalisées ont comme but d'optimiser l'analyse non-invasive et d'éviter toute redondance dans les études suivantes.

Raffinement: Le modèle utilisé ici n'engendre pas de douleur particulière. En cas d'observation de douleur, les souris recevront un traitement analgésique, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient mis à mort pour éviter toute souffrance. Enfin, le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, de la nourriture et de l'état des animaux.

3980. Chez l'homme, un infarctus conduit à une mort massive des cardiomyocytes (celles constituant le cœur), qui sont alors remplacées par une cicatrice fibrotique irréversible, ce qui peut conduire à un remodelage et finalement entraîner une insuffisance cardiaque. En revanche, le cœur du poisson zèbre peut se régénérer après une blessure. Le but de ce projet est de fournir une meilleure compréhension de la régénération cardiaque chez le poisson zèbre et de la régression de la fibrose dans ce modèle animal après une blessure.

Le poisson zèbre (*Danio rerio* - Cyprinidés) est un modèle populaire en biologie du développement, grâce à la transparence des embryons et larves qui permet une observation non invasive des organes et cellules in vivo et aussi pour les possibilités d'études génétiques. L'observation de cellules peut être facilitée par des marqueurs fluorescents. Le poisson zèbre permet d'établir des lignées génétiquement modifiées. Ainsi nous pourrions étudier l'effet de certains gènes sur la régénération cardiaque.

Les expériences seront réalisées sur des poissons âgés de 5 jours post-fécondation à 30 mois.

Pour étudier le développement du cœur, les embryons seront anesthésiés et observés au microscope.

Pour étudier la régénération cardiaque, nous allons effectuer des cryolésions du cœur (lésions par le froid) et utiliser des lignées génétiquement modifiées ainsi que des techniques d'imagerie qui nous permettront de suivre l'évolution de la régénération chez les animaux.

Remplacement: L'étude de l'interaction des différents types cellulaires au cours de la régénération d'un organe nécessite des expériences in vivo. Même si des organoïdes peuvent être générés in vitro, l'effet de l'interaction des tissus dans d'organismes, tel que infiltration des cellules inflammatoires ou le rôle des forces hémodynamique lors de la régénération d'organes, ne peut pas être imitée in vitro. Ceci est la raison pour laquelle nous proposons d'étudier la régénération cardiaque chez le poisson zèbre vivant.

Réduction: Pour empêcher la réplication des expériences, des bases de données telles que PubMed sont révisées sur une base hebdomadaire, afin d'assurer que l'information n'a pu être obtenue dans l'étude n'a pas été faite. En outre, la fréquentation régulière de conférences permet également d'obtenir des informations sur le résultat non publiés.

De plus, plusieurs variables sont analysés dans chaque poisson, afin d'optimiser le nombre d'animaux requis pour le projet.

Par ailleurs, l'utilisation de l'imagerie en direct permettra d'évaluer l'évolution de la réponse régénérative chez un seul animal. Cela signifie qu'au lieu d'avoir à euthanasier plusieurs animaux à différentes étapes, un seul poisson sera suffisant. Même si les expériences devront être répétées, cela va réduire considérablement la quantité d'animaux nécessaires.

Ainsi, nous utiliserons un maximum de 1376 poissons zèbres pour ce projet.

Raffinement: Les protocoles ont été optimisés afin d'éviter tout dommage. Et afin d'éviter tout stress, ils seront faits sous anesthésie.

3981. Ce projet a pour objectif d'assurer la fourniture de sérums polyclonaux de souris nécessaires à la réalisation des tests de contrôle qualité assurant la mise sur le marché de lots de vaccins conformes aux normes de sécurité et d'activité.

Les produits biologiques (sérums) sont nécessaires pour la mise en œuvre de tests in vitro. A ce jour, ils ne peuvent toujours pas être produits sans le recours à l'animal. Les tests de contrôle qualité sont des tests réglementaires pour les vaccins commercialisés et pour les produits en développement.

Ce projet pourra engendrer l'utilisation d'au maximum 60 souris sur une période de 2 ans.

Les protocoles encadrant la collecte de sang ou l'immunisation d'animaux avec des antigènes n'entraînent généralement pas de réactions locales ou générales. Dans le cas contraire où les animaux présenteraient des lésions cutanées, des soins appropriés seront réalisés. Tout animal qui présenterait une dégradation de l'état général sera euthanasié selon une méthode recommandée. Ces interventions sont réalisées sous la responsabilité d'un vétérinaire.

L'ensemble des animaux est euthanasié selon des méthodes recommandées par la réglementation et approuvées par le Comité d'éthique et la Structure de Bien-être Animal.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Les produits d'origines animales sont utilisés uniquement lorsque des produits fabriqués in vitro (anticorps polyclonaux) ne sont pas disponibles ou adaptés à l'utilisation visée.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés au total est calculé au plus juste de façon à répondre aux exigences réglementaires et aux besoins quantitatifs de sérum pour les tests réalisés sur la période considérée.

Raffinement :

Les animaux sont hébergés dans des cages contenant des enrichissements, dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires (ETS 123), et suivis par un personnel spécifiquement formé.

En cas de signes cliniques, dans les meilleurs délais, les animaux bénéficient des soins vétérinaires ou sont euthanasiés selon les méthodes recommandées.

3982. Dans le cadre de travaux de recherche visant à mettre au point des solutions thérapeutiques permettant de lutter contre les infections ostéo-articulaires, le laboratoire de recherche doit disposer de liquide synovial qui se trouve dans les articulations (liquide se trouvant au niveau des articulations et permettant d'assurer la lubrification de celle-ci).

Le but des études qui seront menées in vitro grâce au liquide synovial est de comprendre les mécanismes entraînant l'inefficacité des traitements antibiotiques suite à la formation de biofilms dans le liquide synovial.

Des molécules expérimentales seront également testées et leur efficacité évaluée.

Le bénéfice attendu de ces travaux de recherche est de mettre au point des traitements efficaces qui à ce jour n'existent pas.

Le liquide synovial sera prélevé chez des chevaux au niveau des articulations des membres.

40 chevaux seront prélevés sur la durée de 5 ans du projet. La classe de sévérité est légère, on ne s'attend à aucun signe clinique suite au prélèvement.

A l'issue de leur participation au projet, les chevaux seront alors réformés et replacés dans le respect des conditions définies par la Directive Européenne 2010/63 (article n°19).

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

L'obtention de liquide articulaire nécessite le recours à l'animal. Ce liquide biologique a des propriétés très particulières qu'il est difficile de mimer par des produits de synthèse. Dans le cadre de ces recherches, le laboratoire évaluera la possibilité de réaliser des essais avec des produits de substitution, en les comparant avec le liquide synovial obtenu. Si les produits s'avèrent comparables, le laboratoire pourra se passer du liquide prélevé sur animaux.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés sera limité au mieux. Les prélèvements seront réalisés en fonction des besoins du laboratoire.

Raffinement :

Les chevaux sont hébergés en groupe et observés quotidiennement. Les prélèvements sont réalisés sur des animaux en parfaite santé.

En cas de problème de santé, un vétérinaire effectue le suivi clinique et prescrit un traitement. Il peut décider de la réforme d'un cheval s'il le juge nécessaire. Dans ce cas, le cheval reçoit les soins prescrits, avant d'intégrer le circuit d'adoption mis en place.

3983. La radiothérapie est un outil thérapeutique incontournable de la lutte contre le cancer. Son efficacité est néanmoins limitée par les dommages qu'elle provoque sur les tissus sains situés dans le champ d'irradiation. Une irradiation du poumon ne pourra alors pas dépasser une certaine dose sans risquer de voir apparaître de graves complications comme la fibrose pulmonaire. Or, grâce à l'expérimentation animale, le laboratoire a récemment développé une nouvelle technique d'irradiation qui permet de réduire les effets secondaires (e.g. fibrose pulmonaire) sans affecter l'efficacité anti-tumorale.

Cette découverte représente peut-être une étape majeure pour la radiothérapie de demain et le travail doit se poursuivre en vue de comprendre par quels mécanismes cette nouvelle technologie limite l'apparition des complications. Nous espérons que les résultats faciliteront la mise en place d'essais cliniques et, à terme, permettront de proposer aux patients des traitements anticancéreux plus efficaces et mieux tolérés.

Dans le cadre de ce projet, nous sommes contraints d'avoir recours à l'utilisation de souris afin de pouvoir étudier les conséquences des différentes modalités d'irradiation dans un tissu. Les caractéristiques génétiques de la souris, les différentes lignées génétiquement modifiées disponibles ainsi que la facilité d'élevage en font le modèle de choix pour notre étude. Pour l'ensemble de ce projet, nous prévoyons d'utiliser 1708 souris, nombre d'animaux requis pour pouvoir explorer les mécanismes sous-jacents, encore incompris, et produire des preuves statistiquement significatives sur les questions qui se posent à nous. Les souris seront placées dans des cages enrichies leur assurant des conditions d'élevage et de bien-être optimum. Lors des procédures d'irradiation, les souris seront anesthésiées puis suivies régulièrement afin de surveiller leur état général et leur tolérance à l'irradiation. Dans le cas d'une altération de l'état général (perte de poids, prostration, plaies), la souris sera isolée, soignée si possible et euthanasiée si l'un des points limites est atteint.

3984. Les lipoprotéines de haute densité (High Density Lipoproteins (HDL)) sont un complexe lipoprotéique responsable du transport du cholestérol vers le foie. Ce complexe est connu pour ces propriétés anti-thrombotique avec un effet protecteur vasculaire. Les HDL-cholestérol ont également des propriétés anti-inflammatoires. Au-delà de son rôle dans les pathologies cardiaques, la baisse de HDL-cholestérol a également été retrouvée dans d'autres pathologies comme les accidents vasculaires cérébraux, le diabète, l'asthme...

Les HDL-cholestérol pourraient représenter une cible thérapeutique très intéressante dans bon nombre de pathologies chez l'homme.

Le but de ce projet est d'étudier l'administration par voie intranasale de HDL-cholestérol, voie d'administration non invasive, afin d'obtenir un dépôt pulmonaire. La voie pulmonaire est largement utilisée en clinique pour l'administration de médicaments. L'administration de HDL-cholestérol par voie nasale pourrait représenter une voie thérapeutique intéressante dans les pathologies inflammatoires pulmonaires ou bronchiques (telles que l'asthme, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)...).

Dans une 1ère procédure, nous étudierons l'innocuité de l'administration par voie intra-nasale de HDL-cholestérol ; dans une 2e procédure nous analyserons le devenir et la pharmacocinétique des HDL-cholestérol administrées par voie intra-nasale.

L'étude in vivo de l'administration par voie pulmonaire de HDL-cholestérol est une étape obligatoire avant d'étudier cette méthode d'administration chez l'homme. Le modèle murin ne pourra pas être remplacé par un modèle autre qu'animalier pour analyser l'innocuité et le devenir de cette macromolécule avant un éventuel passage chez l'homme. L'avantage de ce projet est d'obtenir des informations in vivo sur l'administration par voie intra-nasale de HDL-cholestérol, ce qui n'a jamais été fait jusqu'à présent. Les dommages escomptés pour la souris représentent l'administration par voie nasale de HDL-cholestérol, geste réalisé sous anesthésie générale. Dans l'optique de l'application de la règle des 3R, il est impossible de remplacer ici le modèle animal par un autre modèle compte-tenu de la nécessité d'avoir des données in vivo avant d'éventuelles applications humaines. Afin de raffiner la méthodologie (éviter des souffrances répétées) et de réduire au maximum le nombre de souris, l'étude de l'innocuité sera réalisée souris par souris sous surveillance étroite. L'étude du devenir des HDL-cholestérol sera également réalisée sur un nombre très faible mais suffisant de souris pour obtenir des résultats interprétables. Dans le but de raffiner, l'administration de HDL-cholestérol sera réalisée sur des souris anesthésiées avec surveillance étroite après l'administration. Au total, 14 souris C57BL/6 (C57Black/6) seront utilisées dans ce projet.

3985. Le prolapsus de la Valve cardiaque Mitrale (PVM) affecte 1 personne sur 40 après 60 ans. Il peut se manifester par une régurgitation du sang du ventricule vers l'oreillette gauche lors de la systole ventriculaire et se traduire par une insuffisance cardiaque qui nécessitera in fine une intervention chirurgicale qui reste la seule voie thérapeutique. Malgré les progrès réalisés dans la chirurgie valvulaire, les risques chez les sujets âgés restent importants et il est donc impératif de trouver d'autres voies thérapeutiques et donc d'identifier les mécanismes physiopathologiques à l'œuvre qui restent à ce jour largement méconnus. Le PVM a longtemps été considéré comme une pathologie dégénérative du sujet âgé cependant des bases génétiques héréditaires sont maintenant clairement établies. Les patients porteurs de mutation du gène ARHGAP24 ne présentent aucun autre symptôme que les affections valvulaires.

Malgré l'avancée des connaissances les mécanismes physiopathologiques impliqués restent méconnus faute de modèle animal récapitulant le phénotype des patients. C'est pourquoi nous avons proposé de créer une lignée de souris transgénique Knock-out sur le gène ARHGAP24. Cette souris a fait l'objet d'une évaluation cardiaque dans le cadre d'un projet international de phénotypage de la souris. Cette première analyse étant faite chez des souris jeunes adultes, nous souhaitons poursuivre le suivi cardiaque des animaux au cours de leur vieillissement afin de valider cette lignée de souris comme un modèle de cette pathologie cardiaque chez l'Homme.

Remplacement: Il n'existe pas de méthode alternative pour étudier les fonctions et l'anatomie cardiaque. L'approche animale se justifie par l'existence de plusieurs souris invalidées des gènes d'intérêt impliqués dans plusieurs cardiopathies humaines et réaliser une étude sur l'animal nous permettra de se rapprocher de la physiopathologie humaine.

Réduction: nous allons réutiliser 12 souris ayant déjà eu une première échographie cardiaque et étudier le développement de cette pathologie dans le temps. Nous utilisons ici un nombre d'animaux réduit à son minimum nous permettant d'avoir des résultats interprétables.

Raffinement: les animaux feront l'objet d'un suivi rapproché afin d'éviter toute souffrance liée au développement de la pathologie cardiaque. De plus, afin d'éviter tout stress, les échographies cardiaques seront réalisées sous anesthésie générale, avec un agent anesthésique non contre-indiqué chez les individus insuffisants cardiaques.

3986. Les allergies alimentaires constituent un problème majeur de santé publique du fait de leur prévalence et de la gravité des symptômes qu'elles engendrent. Les maladies allergiques respiratoires se sont considérablement répandues au sein de la population ces dernières décennies, au point d'atteindre des niveaux record dans les pays occidentaux où l'on estime qu'environ une personne sur quatre présente des symptômes cliniques d'allergie. Plus généralement, les allergies figurent au quatrième rang des maladies selon l'OMS. Il n'existe aujourd'hui aucun traitement validé contre les allergies alimentaires. Concernant, les allergies respiratoires des traitements par voie sublinguale existent mais ne permettent pas d'être employés chez des jeunes enfants. Or, une immunothérapie doit être commencée au plus tôt afin d'enrayer le développement de la marche allergique.

Aucun test *in vitro* ne permet d'évaluer complètement la réaction allergique à un allergène. Ce projet vise donc à développer des modèles murins d'allergie puis d'évaluer de nouveaux traitements contre cette maladie.

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 1390 souris femelles maximum, âgées de 4 semaines. 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. Le bien-être des animaux (raffinement) est également planifié, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées permettant ainsi leur bien être et avec un enrichissement du milieu d'hébergement.

3987. Dans le cadre de notre activité, nous sommes amenés à utiliser fréquemment un test visant à déterminer la sensibilité des animaux à l'amphétamine.

Ce test permet de mettre en évidence une éventuelle susceptibilité accrue à manifester des symptômes de type psychotique (augmentation des déplacements, comportements stéréotypés).

Ce modèle a été développé par analogie aux effets observés chez l'humain, et validé par sa capacité à être sensible aux antipsychotiques classiquement utilisés en clinique.

Dans le cadre de la recherche préclinique, il est couramment utilisé pour mettre en évidence une altération de la sensibilité d'animaux génétiquement modifiés, permettant une détection de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Afin de réaliser ce test, nous avons besoin de renouveler notre lot d'amphétamine et devons réaliser une expérience permettant d'étalonner la dose utilisée de manière routinière.

En effet, le composé utilisé actuellement n'est plus disponible chez notre fournisseur habituel et nous devons tester le composé provenant d'une autre source.

Nous souhaitons donc utiliser 5 groupes de souris contrôles. Un groupe témoin recevant le véhicule, 3 groupes utilisant le nouveau composé à 3 doses, et un groupe traité avec l'ancien lot à la dose classiquement utilisée.

Le protocole consiste en une observation du comportement des animaux avant injection, suivi d'une injection unique par voie intra-péritonéale et un suivi durant 2 heures de l'activité locomotrice horizontale et verticale.

S'agissant d'un modèle animal intégré et lié à une réponse de type pharmacologique, aucun protocole de remplacement n'est actuellement disponible.

Les effectifs utilisés dans ce test correspondent à ceux classiquement utilisés dans notre protocole de test et permettent d'obtenir une puissance statistique adéquate.

La procédure prévoit l'isolement des animaux uniquement durant la phase expérimentale et une mise à mort des animaux en fin de protocole.

L'expérience pourra être répétée avec moins de groupes lors du renouvellement de lot, à raison d'une expérience par an au maximum.

Ainsi, nous pourrions envisager l'utilisation de 3 groupes expérimentaux lors de changement de lots (Véhicule, ancien lot à sa dose habituelle, nouveau lot à sa dose habituelle), soit 36 animaux. Si nous sommes amenés à changer de nouveau de fournisseur sur la durée de cette autorisation, nous effectuerons le protocole complet avec 60 animaux.

60 animaux sont utilisés par le protocole initial, nous pourrions dans un maximum théorique utiliser 300 animaux sur la durée de validité de cette autorisation, en supposant que nous ayons à changer de fournisseur chaque année, ce qui semble peu vraisemblable.

3988. L'alpha-synucléine est une protéine qui est présente sous une forme agrégée dans les lésions cérébrales des patients atteints de la maladie de Parkinson/démence à corps de Lewy/atrophie multisystématisée (« synucléinopathies »). Dans ce projet, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées qui expriment l'alpha-synucléine humaine sous une forme responsable de cas familiaux de maladie de Parkinson chez l'homme. Ces souris (M83) développent au cours du vieillissement des troubles locomoteurs, menant à une mort précoce de l'animal. Cette maladie apparaît beaucoup plus tôt si l'on injecte dans le cerveau de celles-ci un extrait cérébral contenant de l'alpha-synucléine agrégée (cerveau de souris ou de patients humains atteints de synucléinopathie) ou même de l'alpha-synucléine produite par génie génétique présentée sous une forme fibrillaire. La maladie s'accompagne de l'agrégation de la protéine alpha-synucléine de ces souris, dans les régions postérieures du cerveau et la moelle épinière. Nous avons récemment mis en évidence qu'un traitement *in vitro* d'un homogénat de cerveau de souris amplifie considérablement la formation d'agrégats d'alpha-synucléine et l'objectif de notre projet est maintenant d'évaluer dans quelle mesure ces agrégats ainsi produits peuvent eux-mêmes accélérer la maladie par inoculation dans le cerveau de souris. Cette importante amplification *in vitro* d'espèces moléculaires importantes dans la progression de la maladie ouvrirait alors directement la voie à une méthode de diagnostic beaucoup plus sensible. Les souris sont hébergées dans des cages enrichies. Ces expériences nécessitent au total 240 souris M83 adultes, nombre réduit au

maximum et permettant d'obtenir des résultats statistiquement fiables. Ces souris feront l'objet d'un suivi clinique individuel afin de détecter la moindre apparition de symptômes propres à la lignée et éviter toute souffrance chez l'animal. A l'apparition des premiers signes, l'animal déclaré malade est euthanasié. Les résultats de l'étude sont fondés sur l'analyse de la durée de survie de ces animaux accompagnée d'analyses biochimiques et immunohistochimiques du cerveau permettant d'évaluer la distribution et les caractéristiques de l'alpha-synucléine dans le cerveau des souris malades.

3989. Ce projet de recherche fondamentale a pour but de faire avancer la compréhension d'une question de santé, la douleur. La douleur chronique est un problème de santé majeur qui touche un européen sur cinq. La douleur chronique, et en particulier la douleur inflammatoire affecte la qualité de vie des patients, et entraîne souvent des incapacités motrices. Le projet vise à développer chez la souris des essais non réflexes de réponse à la douleur, pour (1) se rapprocher des évaluations de la douleur chez l'homme et (2) pour déterminer le rôle de l'un récepteur impliqué dans le contrôle de la douleur dans ces essais. Deux nouveaux tests seront évalués, celui du 'nesting' et celui des roues d'activité. Des souris mutantes pour ce récepteur seront comparées aux souris contrôles non mutées.

Ces expériences ne peuvent pas être remplacées par des expériences in vitro car la douleur est un processus complexe dans un organisme intégré dont l'étude nécessite des tests comportementaux au niveau d'un organisme entier. Les nouveaux modèles chez la souris sont nécessaires dans le présent projet pour comprendre les relations entre l'un des composant des systèmes de contrôle de la douleur et les réponses comportementales au niveau de l'organisme entier.

Le nombre d'animaux est réduit à 736. En effet, afin de garantir des résultats significatifs au niveau statistique et en tenant compte de la variabilité interindividuelle inhérente aux différents tests utilisés, le nombre de 4 à 12 souris par groupe (contrôle et mutés) et par sexe, soit 736 souris au total pour l'ensemble des 4 procédures, sera utilisé.

Raffinement : Les tests nociceptifs appropriés seront utilisés pour minimiser la douleur potentielle et augmenter le bien-être animal, en particulier l'utilisation de durées limites d'exposition aux stimuli nociceptifs.

Procédures et dommages attendus : les animaux seront analysés pour leur sensibilité de base aux stimuli douloureux. Une partie des souris sera étudiée pour la sensibilité réflexe à la douleur inflammatoire et pour leur réponse à ces nouveaux tests non réflexes. Il n'y a pas de dommage attendu pour ce protocole, utilisé dans la littérature sans dommage rapporté.

De plus, la définition des points limites éthiques permettra d'éviter toute douleur ou détresse inutile.

3990. Ce projet se propose de tester l'implantation d'un dispositif de pancréas artificiel et d'évaluer les modalités techniques chirurgicales et sa fonctionnalité.

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

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

Dans cette première phase de l'évaluation thérapeutique, notre étude aura pour but de réaliser l'implantation du MAILPAN et d'évaluer l'intégration fonctionnelle et histologique du prototype. Le protocole chirurgical consistera à définir : (1) chez le cochon (24 animaux), les voies d'abord (détermination de l'emplacement au niveau rétropéritonéal ou intrapéritonéal en rapport avec la taille de l'implant) et les différents types d'ancrage-fixation (suture et/ou agrafes selon sollicitation, rigidité et maintien du dispositif) ainsi que le suivi de cette implantation pendant 4 mois, et (2) chez le rat diabétique (22 animaux), la fonctionnalité du dispositif chez le modèle de petit animal et ceci, en analysant la captation du sucre rendu radioactif avec un suivi sur 2 mois.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum garantissant un nombre suffisant d'individus pour une exploitation statistique des résultats (réduction). Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu : balle de jeu, enfouissement de la nourriture, briquettes de bois), de soins et les méthodes utilisées (anesthésie générale, analgésie contrôlée, soins post-opératoires) sont les plus appropriées pour réduire la douleur, le stress ou tout autre dommage intercurrent (raffinement).

Nous avons établi des points limites (tremblements, , trouble de l'équilibre, démarche vacillante, incoordination des membres, chute, perte de poids, hypoglycémie) qui désignent un moment auquel la douleur ou la détresse de l'animal d'expérimentation seront diminuée grâce à des médications spécifiques ou dans les cas extrêmes, l'expérimentation sera arrêtée.

3991. Le diabète de type I (T1D) est une maladie auto-immune qui a pour cause la destruction des îlots de Langerhans, cellules essentielles à la production d'insuline, localisées dans le pancréas. Cette maladie a vu son incidence dans les pays développés augmenter, devenant ainsi un réel problème de santé publique. Cette maladie ne possède aucun traitement thérapeutique curatif (excepté les injections d'insuline quotidiennes). De plus, les causes, origines et mécanismes cellulaires de la prévalence de cette maladie restent encore mal élucidés.

Le but de cette étude est d'évaluer le potentiel d'un nouveau traitement et de caractériser le rôle et le potentiel des cellules T régulatrices (Tregs) induits par ce traitement sur la prophylaxie et le traitement du diabète de type I chez la souris.

Le nombre d'animaux prévu pour toute la durée du projet s'élève à 520 souris. Chaque groupe expérimental sera constitué de 10 individus. Cette évaluation du nombre d'animaux par groupe sera suffisante pour générer des mesures nous permettant de réaliser des analyses statistiques cohérentes et robustes (tests non paramétriques Kruskal Wallis / Mann-Whitney) nous permettant ainsi de mettre en évidence l'efficacité ou non du traitement. Les points limites pris en considération pour cette étude sont le bien-être et l'état physique de l'animal avec un score attribué selon les degrés de sévérité et la fixation d'une dose limite pour le dosage glycémique (fixée à 250 mg /dL de glucose dans le sang) caractérisant l'état diabétique de l'animal.

Cette évaluation du nombre de souris prend en compte la possibilité de dupliquer et confirmer les résultats obtenus. Dans le cadre de ce projet, nous appliquerons la règle des 3R (Réduction, Raffinement et Remplacement). La stratégie pour réduire le nombre d'animaux reposera sur une expérience préliminaire permettant, d'une part, de valider le modèle expérimental et d'autre part, de définir les meilleures conditions de traitement. Les souris seront hébergées par groupes sociaux (5 animaux par cage) et disposeront d'eau de boisson et de nourriture à volonté. Afin d'enrichir le milieu et de maximiser le bien-être animal, les animaux auront à leur disposition une maisonnette ainsi que des rouleaux en carton. De la musique sera également diffusée au sein de l'animalerie. De plus, une gestion précise de l'anesthésie/analgésie est étudiée pour chaque procédure expérimentale en vue d'optimiser le bien-être animal. Des points limites quantitatifs, spécifiques aux procédures, ont également été établis pour l'ensemble des procédures expérimentales (= raffinement). Le remplacement n'est pas envisageable car :

- Il n'existe à ce jour aucun autre modèle alternatif (méthode in vitro / autre modèle animal) mimant aussi bien les signes cliniques du diabète de type I présents chez l'Homme.
- De plus, l'efficacité et la validité d'un traitement se mesure au terme d'un suivi d'incidence jusqu'à 30 semaines d'âge
- Favorise l'étude de l'évolution des différents stades de la maladie et des différents organes et sous populations cellulaires.

3992. La rétinite pigmentaire (RP) est une maladie héréditaire caractérisée par une dégénérescence des photorécepteurs. Chez l'homme la cécité est due à une perte du segment externe du photorécepteur à cône, la partie photoréceptrice de la cellule, tandis que les corps cellulaires des cônes ainsi que les cellules bipolaires et ganglionnaires peuvent rester en vie longtemps après la perte de la vision. Il a été récemment démontré que ces cônes au repos peuvent être réactivés par la lumière, avec un vecteur viral AAV (Adénovirus Associated Virus) exprimant l'halorhodopsine, pompe à chlorure sensible à la lumière et d'origine bactérienne. Après injection sous-rétinienne du vecteur AAV-Halorhodopsine, chez un rongeur, modèle présentant une dégénérescence des photorécepteurs, nous avons mis en évidence une réponse des cellules ganglionnaires de la rétine ainsi qu'une acuité visuelle améliorée. Tous ces résultats suggèrent qu'il est possible de restaurer une fonction normale de la rétine, en infectant les cellules rétinienne par des opsines bactériennes.

Le projet présenté vise à restaurer l'activité des cônes mais aussi des neurones de 2ème et 3ème ordre, en vue d'une application thérapeutique chez l'homme.

Il ne peut être réalisé que dans un modèle de primate non humain présentant une organisation de l'œil semblable à celle de l'homme, contrairement à celui du rongeur.

Il mettra en œuvre au total un maximum de 166 primates non humain de sexe indifférent, répartis en 33 séries suivant un plan expérimental au cours duquel seront évaluées l'innocuité des voies d'administration, l'efficacité de différentes suspensions virales et surtout la capacité de différentes opsines bactériennes à réactiver les cellules ciblées. Les procédures sont construites de manière à optimiser le nombre d'animaux dans chaque série, en utilisant à chaque fois le controlatéral d'un œil comme témoin expérimental ou comme receveur d'un autre type de vecteur. L'effectif est réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ces animaux sont nés et élevés dans des élevages reconnus. Toutes les interventions se feront sous anesthésie générale pour réduire la contrainte imposée aux animaux. Ce projet s'appuie sur des études préalables in vitro et in vivo chez des modèles rongeurs. La mise en œuvre d'un suivi longitudinal non invasif par imagerie in vivo permet de diminuer le nombre d'animaux. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement s'il y a signe de souffrance et de veiller au bien-être des animaux. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

3993. Des troubles neurocognitifs affectent fortement la qualité de vie de nombreuses personnes âgées, des patients traités pour un cancer ou des individus ayant subi un traumatisme cérébral...

La production moindre de nouveaux neurones, dans certaines conditions physiopathologiques comme le vieillissement, le stress post-traumatique, l'exposition à une radio/chimiothérapie anticancéreuse, etc., est responsable, au moins en partie, de cette perturbation des fonctions neurocognitives.

Notre projet a pour objectif d'établir des conditions optimales pour stimuler la production de nouveaux neurones, ou neurogenèse, par l'administration de substances pharmacologiques provoquant la prolifération des cellules souches neurales endogènes. Nous avons identifié différentes voies de signalisation qui permettraient de stimuler la prolifération des cellules souches neurales. Différentes substances actives sur ces voies de signalisation sont déjà connues et ont été validées sur des cellules souches neurales ou sur d'autres systèmes cellulaires.

Les protocoles mis en jeu ici requièrent un modèle préclinique chez l'animal car aucune méthode alternative (modèle in vitro ou simulation informatique) n'existe à ce jour pour modéliser la complexité du cerveau et le microenvironnement des cellules souches neurales. L'espèce retenue pour ce projet est le rongeur dont la neurogenèse présente de nombreuses similarités avec l'ensemble des mammifères et offre un nombre très important d'outils moléculaires.

Nous utiliserons deux modèles dans lesquels la neurogenèse est altérée : le vieillissement physiologique (animaux âgés de 12-24 mois) et l'irradiation du cerveau pour mimer les effets de la radiothérapie. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages agréés. Leur nombre (910 pour 5 ans) déterminé par un test statistique, a été réduit au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences.

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

Cette étude devrait permettre de découvrir de nouvelles approches thérapeutiques pour contrecarrer la perte neuronale et rétablir les fonctions normales du cerveau. Enfin, nous espérons que cette approche expérimentale pourra être transférée à la clinique et contribuer ainsi à l'amélioration des conditions de vie des nombreux patients souffrants de troubles cognitifs.

3994. L'infection chronique à *Pseudomonas aeruginosa* est un facteur pronostic majeur chez les patients atteints de bronchopathies chroniques, mais les mécanismes conduisant à la chronicisation de l'infection à *P. aeruginosa* sont mal connus. La découverte récente du microbiote dans le poumon humain à l'état sain et de ses modifications lors des pathologies respiratoires chroniques pourrait changer notre compréhension des relations hôte-pathogène dans ces pathologies. L'objectif de ce projet est d'étudier les interactions entre les communautés microbiennes pulmonaires, antibiotiques et l'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* chez la souris.

La première partie du projet consistera en l'étude du microbiote pulmonaire chez la souris saine puis après administration de différents antibiotiques. Ensuite, nous étudierons l'impact de ces traitements préalables sur la persistance d'une infection aiguë pulmonaire secondaire réalisée par administration intranasale de *P. aeruginosa*, que nous corrèlerons aux modifications du microbiote. Dans un troisième temps, nous utiliserons des modèles animaux d'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* et *S. aureus* pour étudier l'effet longitudinal d'une infection bactérienne chronique sur le microbiote pulmonaire de souris. Nous travaillerons sur des souris issues de la lignée C57BL/6 de phénotype sauvage, lignée que nous utilisons depuis de nombreuses années et à partir de laquelle nous avons mis au point un modèle expérimental original d'infection pulmonaire chronique reconnu par la communauté scientifique et pertinent dans l'étude de la physiopathologie des dilatations des bronches. Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement élaborées afin d'épargner le plus d'animaux possible tout en obtenant des résultats statistiquement significatifs. D'après les études réalisées en amont dans notre laboratoire, nous estimons qu'il faudra inclure environ 8 animaux par temps d'étude et par condition. Nous prévoyons d'utiliser environ 400 animaux. Afin de limiter la quantité de souris utilisées, plusieurs types de prélèvements seront effectués à partir d'un seul animal. Toutes les expérimentations invasives ou douloureuses seront effectuées sur des animaux préalablement anesthésiés et nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. Leur état général sera régulièrement évalué (poids, comportement). En cas de nécessité, des antalgiques seront administrés aux animaux et en cas de niveau de douleur trop élevé, nous procéderons à une euthanasie anticipée de l'animal.

La thématique de recherche de notre projet, le microbiome respiratoire, implique par essence l'étude d'organismes vivants complexes (cellules immunitaires, cellules épithéliales, bactéries multiples) et les renseignements apportés par ces études animales ne peuvent être obtenus par des techniques alternatives. Ces données devraient contribuer à une meilleure compréhension de l'impact des antibiotiques et de l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* sur le microbiote pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose ou de dilatation des bronches non mucoviscidiques.

3995. la chirurgie bariatrique est de plus en plus fréquemment utilisée chez l'homme pour assurer un contrôle du poids et des co-morbidités associées. Il est remarquable de constater que certaines techniques de chirurgie bariatrique ont des effets spectaculaires sur le diabète de type 2 permettant une disparition rapide (en terme de quelques jours après la chirurgie) et indépendante de la perte de poids sans que les mécanismes exacts en soit connus. Mieux connaître les mécanismes d'amélioration post-chirurgicale du diabète indépendants de la régulation pondérale est important afin de a) mieux connaître la physiopathologie du diabète de type 2 et b) trouver de nouvelles cibles thérapeutiques futures qui bien individualisées pourraient bénéficier d'une stratégie pharmacologique et alors être mises en oeuvre sans avoir recours à la chirurgie.

Nous avons publié et validé une technique de chirurgie d'anneau gastrique et de bypass-gastrique (les deux interventions les plus pratiquées chez l'homme) chez la souris C57BL6 et reproduit les effets bénéfiques du bypass gastrique sur le diabète en confirmant leur caractère indépendant de la perte de poids. Dans cette publication nous avons démontré un certain nombre de mécanismes novateurs mis en jeu [stimulation de la néoglucogénèse intestinale, effets particuliers du GLP-1 sur la prise alimentaire, sur la sensibilité à l'insuline et sur la sécrétion d'insuline, étude des effets du bypass sur des souris vagotomisées et sur les souris KO GLUT2] puis dans des publications complémentaires nous avons discuté d'autres mécanismes en jeu et ré-évaluer des mécanismes proposés dans la littérature en particulier chez l'homme. Des études complémentaires menées actuellement suggèrent que d'autres mécanismes sont en jeu et qui nécessitent leur caractérisation.

Objectifs : Poursuivre le travail initial et caractériser les mécanismes mis en oeuvre dans la disparition du diabète après chirurgie (axe 1) avec quatre objectifs de recherche que nous souhaitons développer plus particulièrement : la flore intestinale, l'inflammation tissulaire, la restauration de la sécrétion d'insuline par le remodelage du pancréas endocrine et l'étude des facteurs sécrétés vers la circulation générale par les différents segments d'intestin. Cette recherche complète un axe de recherche translationnel en coordination avec les recherches menées sur l'homme avant et après chirurgie bariatrique. L'étude des mécanismes d'action de la chirurgie bariatrique chez les modèles murins permettra de poursuivre les études sur cette thématique. Ensuite, une étude particulière de prévention du diabète de type 2 lié au vieillissement ou au régime hypercalorique par la chirurgie bariatrique sera également un objectif important de cette recherche (axe 2). Enfin, des rechutes de diabète sont actuellement observées chez l'homme quelques années après une chirurgie bariatrique. Elles posent des problèmes de compréhension mécanistique et de prise en charge justifiant une étude à long terme sur un modèle de rongeur (axe 3).

Perspectives : Ce projet rentre dans une étude pré-clinique qui a pour but de déterminer par quels mécanismes biologiques, la chirurgie bariatrique corrige considérablement ou prévient le diabète de type 2 ou évite sa récurrence, en poursuivant le travail initialement réalisé d'une part et d'autre part en caractérisant les mécanismes mis en œuvre dans la disparition du diabète après chirurgie en se concentrant sur les quatre axes de recherche définis ci-dessus. Dans cette étude, nous avons besoin d'intégrer les paramètres physiologiques dans leur ensemble et il est donc nécessaire de travailler sur un modèle vivant tel que la souris comme nous l'avons fait précédemment pour nos publications.

Nombre d'animaux utilisés : 320 souris au total sur une période de 4 ans qui se répartissent en 220 souris Ob/Ob et 100 souris C57Bl6. Le nombre des souris des groupes bypass (ob/ob et C57Bl6) est systématiquement supérieur au nombre de souris dans les autres groupes (sham ob/ob, et C57Bl6 sham) du fait des risques qu'impliquent cette opération. En effet, le modèle d'étude choisi est celui de la souris Ob/Ob qui est hyperobèse et diabétique. Ce modèle présente une fragilité concernant l'anesthésie que nous maîtrisons actuellement suite à la mise au point des paramètres opératoires dans ce modèle. Le nombre de souris a été calculé également en mettant en commun les prélèvements sanguins et tissulaires à travers les axes de recherche du fait de leur interdépendance : par exemple, l'étude de la flore caecale pourra être menée au sein des 3 axes augmentant ainsi le nombre de souris de manière conséquente sans avoir besoin de souris uniquement réservée à l'étude de la flore. Le modèle de la souris ob/ob est essentiel pour l'étude du diabète de type 2 du fait de la présence d'anomalies anatomiques et fonctionnelles du pancréas endocrinien, d'une insulino-résistance et d'une obésité observées également dans le diabète de type 2 humain. Ces anomalies ne peuvent être reproduites complètement dans le modèle de souris C57Bl6 nourries au régime gras. D'autre part, des souris C57Bl6 non diabétiques et de poids normal seront également étudiées sur le plan métabolique dans cette recherche en tant que groupe contrôle non obèse. La stratégie des 3R sera respectée. Avant la chirurgie, les animaux sont acclimatés à l'animalerie 7 jours et sont habitués à être manipulés dans les jours précédents. Les animaux sont euthanasiés en post-opératoire chaque fois qu'une souffrance est évoquée (animal prostré, marchant avec difficultés, alité, ne s'alimentant plus). Enrichissement du milieu envisagé : les animaux restent groupés par 4 à 5 (comme à leur arrivée dans l'animalerie) et l'enrichissement de leur milieu s'effectuera avec du coton.

3996. Le système nerveux (SN) est un organe qui peut subir différents types de lésions. Celles-ci peuvent entraîner une détérioration brutale, comme les traumatismes physiques et les accidents vasculaires cérébraux (AVC), ou bien progressive, comme la sclérose en plaques ou les maladies neurodégénératives tels les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Malheureusement en raison de sa complexité, la régénération spontanée du SN est peu efficace et les lésions sont donc souvent de nature permanente et invalidante. La thérapie cellulaire par greffe de cellules souches est une piste très prometteuse pour réparer le système nerveux, celles-ci pouvant fournir l'ensemble des types cellulaires manquant suite à la lésion. Ce projet vise à étudier le potentiel d'une nouvelle population de cellules souches neurogéniques de la peau (dCF-CSN) pour la régénération du SN chez la souris. Nous avons récemment caractérisé ces cellules au cours du développement de la souris grâce à un nouveau traceur génétique (lignée de souris Prss56Cre). En plus d'être facilement accessibles, nous avons établi qu'elles possèdent un large potentiel de différenciation en neurones et en cellules gliales faisant des dCF-CSN un candidat prometteur pour la médecine régénérative.

Dans cette étude nous proposons d'investiguer le potentiel régénératif des dCF-CSN en les transplantant dans trois modèles murins de lésion du SN à savoir : (i) la démyélinisation focale de moelle épinière, (ii) la section des racines sensitives et (iii) l'infarctus cérébral (IC). Dans chacun de ces modèles nous analyserons à la fois la survie et le comportement des cellules greffées et leur impact sur la régénération endogène de l'hôte. Ce projet fera appel à des techniques innovantes (biomatériaux, imagerie). La réalisation de ce projet requiert l'utilisation de 166 souris. L'utilisation des souris comme modèle expérimental est requise d'une part car les trois procédures de lésion du système nerveux ont été mises au point chez la souris, et d'autre part car les dCF-CSN ne peuvent être isolées et amplifiées que chez la souris grâce au marqueur Prss56. La possibilité d'utiliser les mêmes souris pour la préparation des cellules souches de peau et des cellules de la glie olfactive permettra de réduire le nombre total d'animaux nécessaires à la réalisation de cette étude. Dans ce projet nous avons pris toutes les précautions pour contrôler et réduire la douleur des animaux pendant l'acte chirurgical, puis lors de la phase de récupération. Nous possédons déjà une bonne expertise dans la réalisation de lésions démyélinisantes de la moelle épinière et de section des racines et nous avons suivi une formation à la réalisation des IC au sein du laboratoire qui est à l'origine de cette technique. Les retombées attendues sont nombreuses, aussi bien sur le plan technique que scientifique. Cette étude fait appel à des approches innovantes, qui nous semblent d'importance capitale afin d'avoir une vision globale et dynamique de l'impact de nos cellules sur le processus de régénération. Enfin, la disponibilité d'une source facilement accessible des cellules souches au potentiel neurogénique pourrait s'avérer prometteuse pour le traitement futur de certaines pathologies neurologiques.

3997. Les patients âgés, dont le recours à la chirurgie est 4 fois supérieur aux sujets jeunes, présentent une plus grande morbi-mortalité périopératoire. L'instabilité tensionnelle périopératoire, événement extrêmement délétère, est plus fréquente alors que le système β -adrénergique, habituellement sollicité pour compenser et rétablir un débit cardiaque et une pression artérielle normale, est déficient chez le sujet âgé. Le transporteur transmembranaire cellulaire MRP4 et le récepteur β -adrénergique, dont les proportions sont très augmentées dans le cœur sénescant, sont impliqués dans cette dysfonction. Dans la cardiopathie liée au diabète, un traitement par l'atorvastatine, médicament hypolipémiant, a montré sa capacité à corriger cette dysfonction. Le but de cette étude est d'évaluer si le traitement par atorvastatine permet de diminuer la dysfonction β -adrénergique du cœur sénescant.

Matériel et méthodes-

Des rats jeunes ou sénescents (24 mois) sont prétraités ou non par atorvastatine. Dans chaque groupe il y aura 25 rats soit 100 au total (4 groupes: jeunes contrôles vs jeunes traités; sénescence contrôle vs sénescence traité)

L'augmentation de la contractilité du myocarde par la stimulation β -adrénergique induite par l'isoprotérénol est étudiée in vivo par échocardiographie.

L'autre partie de l'étude est effectuée sur des cellules musculaires cardiaques isolées avec ou sans prétraitement par atorvastatine. L'augmentation du raccourcissement des cellules musculaires cardiaques est étudiée sous microscope avec ou sans stimulation β -adrénergique par l'isoprotérénol.

Enfin, les quantités de MRP4 et de récepteurs β_1 , β_2 , β_3 -adrénergiques seront quantifiées par Western blot.

Conclusion-

Ce travail devrait déterminer le bénéfice de l'atorvastatine pour restaurer au moins partiellement dans la fonction β -adrénergique du cœur sénescence. L'impact thérapeutique pourrait être considérable pour les patients âgés en période périopératoire.

Les mesures pour appliquer la règle des trois R :

1-Le nombre d'animaux sera réduit au maximum par la planification de plusieurs expérimentations séquentielles.

2-La contractilité musculaire ex vivo sera évaluée sur les 2 muscles papillaires du cœur.

3-il y aura des analyses sur cellules isolées ce qui permettra des tests pharmacologiques préliminaires avec plusieurs concentrations et agents à partir d'un même animal.

4-Les tissus seront prélevés et congelés en vue d'études futures.

Les animaux seront élevés en animalerie, ils bénéficieront d'une attention quotidienne et d'un enrichissement du milieu à l'aide de tunnels de carton, des briquettes à ronger et des refuges.

Des points limites sont définis régulièrement pour interrompre l'expérimentation en cas de signe de détresse de l'animal : poils hérissés, agressivité, immobilité, prostration dans un coin de la cage, absence de défécation, perte de poids, fréquence respiratoire accélérée, essoufflement, atrophie musculaire, et yeux larmoyants

3998. Les vecteurs viraux dérivés de l'adeno-associated virus (AAV) sont des vecteurs de choix pour le transfert de gène à long terme dans différents tissus après une seule administration in vivo.

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

Le contrôle de cette immunotoxicité est un défi majeur pour le succès clinique de la thérapie génique. Notre projet a pour but d'acquiescer les connaissances manquantes, plus approfondies sur les interactions entre le vecteur AAV et le système immunitaire. En particulier, il repose sur le développement de stratégies innovantes visant à limiter la réponse immunitaire cellulaire pour permettre un transfert de gène plus sûr et une meilleure efficacité à court et long terme.

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

Pour ce faire, nous devons utiliser des souris pour plusieurs raisons : elles développent une immunité contre le vecteur viral, et les manipulations de cette immunité apportent des réponses applicables chez l'Homme, mais aussi les outils d'études ont été optimisés chez la souris; ce qui permet d'avoir une base solide de travail tout en réduisant le nombre d'animaux à ce qui est nécessaire au projet. De plus, dans le respect de la règle des 3R, des études in vitro précéderont les études in vivo, le nombre d'animaux sera optimisé et réduit au minimum statistiquement relevant et les expériences optimisées au mieux pour exploiter le maximum de paramètres. Ainsi, nous prévoyons d'utiliser 2453 animaux dans cette étude au lieu des 4393 qui auraient été nécessaires sans ces mesures de réduction, remplacement et raffinement, d'où une baisse de plus de 33%.

Ces chiffres ainsi que la démarche scientifique a été établie afin de respecter la règle des 3R (Réduire, Raffiner, et Remplacer) et d'obtenir des résultats statistiques relevant avec le moins de souris possible. Le Raffinage des expériences est assuré par la mise en place des points limites pour éviter l'inconfort et la douleur des souris.

3999. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de cécité dans la population de plus de 60 ans. La forme humide de la maladie résulte de la croissance anormale de vaisseaux choroïdiens et entraîne des exsudations et hémorragies. La forme sèche résulte d'une atrophie progressive des cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine, de la choroïde et des photorécepteurs. Les stress oxydants et l'inflammation locale sont des facteurs reconnus favorisant la maladie, la « para inflammation » étant une composante des maladies liées à l'âge.

La principale cible des traitements actuels est le VEGF, un facteur de croissance dont la neutralisation est utilisée contre la forme néovasculaire, dite « humide » de la DMLA. Ce traitement a un effet démontré sur l'exsudation, mais peu d'effets sur les néo-vaisseaux et avec comme principaux inconvénients la nécessité de réinjection intraoculaire mensuelle et une résistance à ce traitement à long terme. Le facteur H du complément (CFH), un régulateur de la voie alterne « para inflammatoire » a été identifié comme impliqué dans la pathogénie de la maladie depuis la description d'un polymorphisme (Y402H) dans le gène codant. Ce projet a pour objectif de concevoir des solutions protéiques innovantes contre la DMLA.

Le projet soumis fait suite à l'étude « évaluation du CFH dans le traitement de la néovascularisation choroïdienne (CNV) ». Les résultats obtenus au cours des études in vitro et in vivo ont montré que la protéine recombinante est stable et au moins aussi active que la protéine naturelle plasmatique. L'effet thérapeutique du CFH recombinant administré en préventif a été observé à la fois à une forte dose de 45 µg et à une faible dose de 0,45 µg. La suite de cette étude vise :

- (i) à évaluer les effets du traitement curatif dans le modèle de CNV chez le rat Long Evans,
- (ii) à valider les effets anti-angiogéniques du CFH dans deux autres modèles : un modèle murin de souris ko CFH -/- et un modèle de néovascularisation cornéenne chez le rat Lewis,
- (iii) à évaluer l'efficacité de la délivrance soutenue du CFH induite par un système de délivrance ciblé - l'électrotransfert (ET) du muscle ciliaire de plasmide codant la protéine thérapeutique - dans le modèle CNV chez le rat Long Evans.

Les conditions de manipulation des animaux décrites ont été définies pour respecter les protocoles validés et pour minimiser la douleur. Les cages des animaux seront agrémentées de nids végétaux et de "petits maisons", la douleur des animaux sera évaluée et surveillée dans les jours suivants les expérimentations. Les effets toxiques du CFH sera testé in vitro sur des lignées cellulaires de rétine. Chaque impact Laser sera étudié comme une entité limitant ainsi le nombre d'animaux utilisé estimé pour ce projet à 400 (100 souris et 300 rats). L'utilisation de tests statistiques non paramétriques permettra de réduire le nombre d'animaux par groupe (4 à 6).

4000. Notre laboratoire est leader dans le développement de nouveaux médicaments anti-cancéreux afin de comprendre comment ils agissent et quelle efficacité ils ont sur les cancers colorectaux. Les patients atteints de cancers colorectaux sont généralement traités par chimiothérapie, utilisant le 5-FU comme principal agent anti-cancéreux. Malheureusement une certaine proportion de patients peut acquérir une résistance à ce médicament. Il est donc nécessaire de trouver une autre approche thérapeutique pour ces personnes.

Au laboratoire, nous avons choisi deux modèles cellulaires de cancers colorectaux provenant de patients atteints de cancer, la lignée HCT-116 et la lignée mucineuse LS174T.

Ce modèle cellulaire sera injecté à des souris ayant perdu leur système immunitaire. Ces cellules ainsi greffées, vont développer une tumeur à l'emplacement de l'injection.

Nous avons choisi le modèle des souris nude car c'est le modèle le plus adapté pour ce genre d'étude, ces souris étant immunodéficiente, elles ne rejettent pas les cellules humaines qui leur seront injectées. Dans ce cas la réaction du « non-soi » ne peut avoir lieu. Ces souris recevront quelques jours après l'injection des cellules tumorales, des traitements de médicament (Aflibercept ou Bevacizumab) et nous suivrons l'inhibition de la pousse tumorale au cours du temps et ainsi évaluer l'efficacité de ces médicaments.

Nous mettons tout en œuvre pour respecter la règle des 3R : Réduction, Raffinement, Remplacement, en n'utilisant que la quantité minimale de souris pour avoir en final des résultats statistiquement satisfaisants, les règles éthiques sont toujours respectées au cours de notre protocole et veillons à surveiller les points limites que nous nous sommes fixés, le remplacement est facile à mettre en place, car ces études déjà faites in vitro doivent également être étudiées in vivo, l'environnement d'une tumeur est ici pris en compte. Ce qui n'est pas envisageable dans une boîte de culture cellulaire.

A la fin de l'étude expérimentale, les animaux seront sacrifiés, les tumeurs prélevées pour poursuivre nos recherches sur l'action de nos médicaments au niveau des voies de signalisation au sein des tumeurs prélevées.

Au total, ce protocole nécessitera un effectif de 90 souris.

Type d'animaux : souris NMRI-Nude Foxn1

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 90 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de projet. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Une étude pilote a déjà été effectuée afin de déterminer le nombre de cellules à injecter afin de réduire le nombre d'animaux.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo.