



**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 (40)

4001. Au niveau mondial, près de 300 millions de personnes souffrent de rétinopathie diabétique (source OMS). C'est la première cause de cécité et de malvoyance dans la population active (avant 60 ans). La baisse de vision est liée le plus souvent à un œdème maculaire. De plus, la plupart des maladies de la rétine peuvent se compliquer comme dans le diabète d'œdème maculaire responsable d'une baisse de la vision.

Actuellement, les traitements disponibles permettent dans un grand nombre de cas de faire régresser cet œdème sans toutefois restaurer de façon constante une bonne vision.

Notre travail a pour but de mieux comprendre les phénomènes qui sous-tendent la rupture de la barrière hémato-rétinienne et la formation de l'œdème et ses conséquences sur les cellules neuronales rétiniennes afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de traiter l'œdème mais aussi de récupérer une bonne vision après traitement.

4002. La complexité des phénomènes de rétinopathie diabétique observés chez le patient, nous oblige à utiliser le modèle animal (souris) pour nos études. Dans ce projet, nous utiliserons 720 souris mâles adultes chez lesquelles nous créerons un modèle de rupture de barrière hémato-rétinienne sans phénomène ischémique ou injection de facteurs de croissance (VEGF) et nous tenterons de déterminer les biomarqueurs impliqués dans ces phénomènes.

En respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R », 1) Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Tous les animaux auront à leur disposition des carrés de cellulose, une maisonnette, des bâtons à ronger ainsi que de la nourriture et boisson à volonté. 2) Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet. 3) Les études *in vitro* ne nous permettront malheureusement pas de reproduire les mécanismes de rupture de la barrière hémato-rétinienne que nous étudions dans ce projet.

4003. La cécité nocturne congénitale stationnaire (CNCS) est un groupe de pathologies rétiniennes cliniquement et génétiquement hétérogène. La plupart des personnes atteintes ont une acuité visuelle basse, associée à des difficultés d'orientation en condition de faible luminosité. De nombreux patients présentent également d'autres anomalies oculaires telles qu'une forte myopie (< -6 dioptries), un strabisme ou un nystagmus. Parmi les différentes formes de CNCS, la forme complète, CNCS_c, se caractérise par un dysfonctionnement de la transmission du signal entre les photorécepteurs et une classe de cellules bipolaires. Ce mécanisme n'est actuellement toujours pas bien compris.

Dans ses études, l'équipe a identifié que des mutations dans différents gènes étaient associées à la CNCS_c dont des mutations du gène GRP179 qui nous intéresse plus particulièrement. Dans ce projet, nous proposons d'élucider le rôle de cette protéine dont certaines mutations sont associées à la CNCS_c. Nous voulons dans ce projet caractériser le phénotype de souris invalidées pour Gpr179 afin de déterminer si ce modèle mime bien la pathologie humaine. Il nous permettrait alors de mener des études permettant la compréhension des mécanismes aboutissant à la CNCS_c et de déterminer de futures cibles thérapeutiques. Pour cette caractérisation, nous analyserons la morphologie et la fonction rétinienne ainsi que l'acuité visuelle de ces animaux. Au total, 36 animaux seront nécessaires à cette étude.

En respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R », 1) remplacement : Etant donné qu'il n'est possible de reproduire un modèle de cécité nocturne *in vitro*, nos études nécessitent l'utilisation d'un modèle animal.

2) réduction : le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet. 3) raffinement : Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Tous les animaux auront à leur disposition des carrés de cellulose, une maisonnette, des bâtons à ronger ainsi que de la nourriture et boisson à volonté.

4004. L'efficacité de la majorité des traitements anti-tumoraux réside dans l'élimination de la totalité des cellules tumorales par des effets cytotoxiques directs. Cependant, les thérapies conventionnelles ne remplissent pas toujours cet objectif et sont

associées à une lourde morbidité. Récemment a été démontrée que la mort cellulaire induite par certains médicaments anti-tumoraux conventionnels (anthracyclines ou oxaliplatine) pouvait générer une réponse immunitaire anti-tumorale participant de façon synergique à l'efficacité thérapeutique. L'utilisation de méthodes de génotypage à haut débit nous a permis d'identifier un polymorphisme du gène, FPR1 (Formyl Peptide Receptor 1), impliqués dans l'efficacité de la chimiothérapie. La présence de ce polymorphisme a été corrélée à une plus faible survie chez des patients atteints de cancer du sein ou colorectaux, recevant respectivement des anthracyclines ou de l'oxaliplatine. Le but de ce projet est de compenser les effets provoqués par l'absence des gènes FPR1. Cette question ne peut être abordée qu'in vivo car il n'est pas possible d'étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale dans des systèmes in vitro. Pour se faire, nous projetons d'utiliser des souris C57Bl/6 (n. 870) et aussi des souris transgéniques C57Bl/6 Fpr1-/- (n.750), accessible dans le commerce et qui sont viables, fertiles, de taille normale et ne présentent pas d'anomalies physiques ou comportementales. Ce projet se dessine sur 5 ans et implique des études de croissance tumorale. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Le nombre d'animaux par groupe sera de 5 et les expériences seront effectuées au maximum 3 fois pour permettre une analyse statistique robuste des effets observés. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Ce projet vise à une compensation des défauts associés à la perte de fonction de FPR1, un facteur pronostique négatif pour la réponse aux traitements anti-carcéaux à base d'anthracyclines et oxaliplatine, afin d'orienter la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques chez les patients atteints de cancer du sein ou colorectal. Nous préconisons que l'accomplissement de ce projet fournira des connaissances sur la régulation de la réponse immunitaire aux cancers pour la mise en place de stratégies thérapeutiques ciblées.

4005. Dans le cerveau, des cellules spécialisées, les astrocytes, favorisent le bon fonctionnement des neurones. Les astrocytes ont aussi la propriété de réagir aux lésions du système nerveux central en changeant leur structure et leur métabolisme. Ce phénomène largement décrit mais encore mal compris est appelé la réactivité astrocytaire. Il survient notamment au cours de la maladie d'Alzheimer (MA), une maladie neurodégénérative incurable qui touche 900 000 personnes en France.

Le but du projet est de déterminer si la réactivité des astrocytes altère leurs fonctions de soutien envers les neurones au cours de la MA et, donc, si les astrocytes constituent potentiellement une cible thérapeutique pour la MA.

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

Le modèle choisi pour cette étude est le rongeur. Nous avons développé une méthode pour bloquer la réactivité astrocytaire dans deux modèles rongeurs de la MA et nous allons en évaluer les conséquences sur des symptômes de la MA au niveau comportemental, histologique et fonctionnel. Par exemple, son effet sur le métabolisme neuronal sera suivi par imagerie intracérébrale, une technique non invasive.

Les méthodes expérimentales ont été choisies en accord avec le vétérinaire de l'installation, pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux.

Le projet prévoit au maximum 300 rongeurs nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Notre plan expérimental permet de réduire le nombre total d'animaux impliqués grâce à l'utilisation de méthodes de suivi longitudinal par imagerie cérébrale et par l'analyse de plusieurs paramètres sur les mêmes animaux.

Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule de l'établissement chargée du bien-être animal.

4006. Le retard de cicatrisation cutanée est un problème de santé publique, survenant fréquemment chez les sujets traités par les glucocorticoïdes GC (ou ayant un syndrome d'hypercorticisme comme la maladie de Cushing), et au cours de maladies chroniques comme le diabète. Etant donné que les GC peuvent activer non seulement leur propre récepteur (récepteur glucocorticoïde, GR) mais aussi le récepteur minéralocorticoïde (MR), nous avons proposé que certains des effets cutanés indésirables des GC (atrophie cutanée, retard de cicatrisation) seraient liés à leur activation excessive et anormale du MR cutané. Appliquer localement, sur la peau, un antagoniste du MR (MRA) serait alors bénéfique.

Nous avons déjà montré que l'adjonction d'un MRA limite l'atrophie cutanée cortico-induite, chez des souris, sur des explants de peau humaine en culture, et sur des volontaires sains, lors d'un essai clinique. Nous voulons maintenant tester des MRA sur le défaut de cicatrisation induit par les GC ou survenant au cours du diabète.

Notre projet consiste à utiliser des modèles murins de cicatrisation retardée, pour:

(1) comprendre les causes de cette complication et de son maintien dans le temps et (2) tester des moyens thérapeutiques permettant d'améliorer cette complication.

L'utilisation de souris comme modèle de cicatrisation humaine a été validée, permettant d'avoir une vision intégrative des phases de la cicatrisation (intégrant des mécanismes à l'échelle de l'organisme entier, ce qui est impossible avec des cellules de peau en culture), de façon à proposer de nouvelles approches thérapeutiques chez l'homme. Pour la mise en œuvre des 3R, nous avons limité au maximum le nombre de souris par groupe (modèle de retard de cicatrisation induit par les GC, cicatrisation retardée du diabète), tout en préservant les effectifs nécessaires pour une évaluation statistiquement significative des résultats malgré la dispersion biologique. Un total de 848 souris sera nécessaire pour l'ensemble du projet qui va durer 4 ans : 608 souris traitées par le GC, 120 souris avec diabète de type I (induit par la streptozotocine), 120 souris avec diabète de type II (souris db db). Les lignées transgéniques utilisées dans nos protocoles seront des femelles, les mâles étant utilisés par notre équipe pour d'autres protocoles.

Les mesures de raffinement incluent une anesthésie générale pour la biopsie cutanée, une analgésie pré et post opératoire et un suivi quotidien de l'état de la souris, qui sont euthanasiées en cas de signe de souffrance.

4007. Les malformations cardiaques congénitales représentent une des causes majeures de morbidité infantile. Cependant, peu de gènes responsables de ces malformations ont été identifiés à ce jour. Le développement cardiaque du poisson-zèbre étant très proche de celui observé chez l'homme, cet animal se présente comme un modèle de choix pour identifier rapidement les gènes potentiellement responsables de malformations cardiaques congénitales.

A l'âge adulte, alors que les mammifères adultes sont incapables de régénérer leur cœur, un certain nombre d'espèces vertébrées possèdent quant à elles cette propriété. En particulier, le poisson zèbre est capable, suite à une amputation d'un maximum de 20% du ventricule, de totalement régénérer son cœur.

Notre projet consiste à créer des modèles de poissons zèbres transgéniques et mutants afin d'étudier ces phénomènes de développement et régénération cardiaques.

Nous prévoyons l'établissement de 30 lignées transgéniques ainsi que 5 lignées mutantes soit 9000 poissons.

Cette démarche s'inscrit en conformité de la règle des "3R" pour maximiser l'utilisation des animaux des lignées en élevage et ne pas sacrifier inutilement des animaux générés dans l'animalerie. De plus, nous prêterons une attention toute particulière aux comportements suivants : comportement de nage, taux de ventilation et prise d'aliments qui peuvent refléter un comportement anormal pouvant témoigner d'une réponse à la douleur. Si le poisson nage à la surface de l'eau (recherche d'oxygène), ce comportement doit être interprété comme un signal de détresse / d'inconfort. L'expérience sera alors immédiatement arrêtée et le poisson sera euthanasié.

4008. Malgré de grandes avancées dans le domaine médicale, l'insuffisance cardiaque représente l'une des causes majeures de mortalité dans les pays développés. L'utilisation des cellules souches et des biomatériaux est devenue incontournable dans le domaine cardiovasculaire pour développer des produits thérapeutiques.

Dans ce cadre, l'objectif principal de ce projet est de développer un produit de thérapie cellulaire constitué d'un biomatériau associé à des cellules cardiaques, que l'on appelle « patch cardiaque », pour un traitement de différentes formes d'insuffisance cardiaque. Le produit thérapeutique sera implanté sur le cœur malade pour induire sa régénération. L'utilisation de ce produit permettrait une amélioration de la survie des cellules greffées tout en permettant un traitement de l'ensemble du cœur. Le concept sous-jacent est que les biomatériaux permettent de créer un environnement imitant la morphologie et les propriétés du tissu cardiaque tandis que les cellules cardiaques constituent le « principe actif » du traitement. L'évaluation de l'efficacité des patchs cardiaques se fera par implantation de différents types de biomatériaux, avec et sans cellules, dans différents modèles murins (souris et rats) d'insuffisance cardiaque.

Les objectifs du projet sont donc d'évaluer différents patchs (ou biomatériaux) dans deux modèles animaux d'insuffisance cardiaque (fréquemment rencontré chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque) afin de déterminer le meilleur biomatériau pour induire une régénération cardiaque. La réalisation de ce projet constitue une des étapes pré-cliniques indispensables avant l'application chez l'homme de cette approche thérapeutique et permettrait de palier au manque de greffon pour les patients nécessitant une transplantation cardiaque.

Remplacement: L'utilisation de modèles animaux, pour cette étude, est indispensable pour prévenir d'éventuelles réponses hormonales ou immunitaires faisant suite à l'implantation des biomatériaux. Actuellement la recherche médicale ne permet pas d'évaluer ces réponses autrement que par l'utilisation d'animaux de laboratoire. Notre équipe a préalablement testé les biomatériaux in vitro (en cultivant des cardiomyocytes directement sur les patchs).

Réduction: Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux, une étude statistique préalable a été réalisée et a permis de définir le nombre final de 420 animaux.

Raffinement: L'ensemble des expériences sur l'animal qui seront réalisées pour cette étude, seront effectuées par des personnes habilitées à le faire tout en respectant le bien-être animal en veillant à supprimer toute forme de douleur.

4009. Le sepsis est un syndrome grave secondaire à une infection. Ce syndrome se caractérise par une phase inflammatoire aiguë qui va conduire au dysfonctionnement de nombreux organes et une phase tardive d'immunodépression qui entraîne une susceptibilité et des complications graves aux infections secondaires. Le nombre de cas de sepsis ne cesse de croître d'année en année. Le développement de nouveaux traitements de cette pathologie est un réel enjeu de santé publique.

L'inflammation, et donc les lésions aux organes, est médiée par les leucocytes (globules blancs) en particuliers les « monocytes » et les « polynucléaires neutrophiles ». Bien que la recherche dans les mécanismes et traitements du sepsis ait énormément

progressés ces dernières années, il n'existe pas de traitement spécifique et efficace de l'inflammation et les mécanismes aboutissant à l'immunodépression sont mal connus.

Notre projet consiste à étudier le rôle des monocytes au cours du sepsis dans des modèles de souris normales ou mutées pour des gènes importants dans l'homéostasie des monocytes, d'étudier l'effet des principaux traitements sur ces molécules.

Les modèles de sepsis que nous utiliserons chez la souris sont : 1. Un modèle de péritonite chirurgicale (fréquente chez l'homme) suivi d'une infection secondaire par inhalation de la bactérie *Escherichia coli*. Ce programme de recherche est développé dans le respect de la règle des 3R. Il est tiré profit de chaque animal pour nous apporter le maximum d'information. Si possible, nous utilisons les données de manière transversale entre les protocoles afin de réduire le nombre d'animaux. Les groupes d'études sont fait le plus souvent en même temps afin de réduire le nombre de groupe contrôles. Très souvent nous utilisons des lignées cellulaires transformées et de l'expérimentation *in vitro* pour remplacer les études sur cellules primaires. Et enfin nous améliorons au maximum nos protocoles pour maîtriser la souffrance animale ainsi que les variations individuelles qui peuvent en découler. Considérant l'ensemble de ces procédures appliquées sur la diversité des protocoles expérimentaux et la nécessité de mise en accouplement, le nombre d'animaux utilisés représente autour de 740 souris sur 5 ans.

4010. La cécité nocturne congénitale stationnaire (CNCS) est un groupe de pathologies rétinienne cliniquement et génétiquement hétérogène. La plupart des personnes atteintes ont une acuité visuelle basse, associée à des difficultés d'orientation en condition de faible luminosité. De nombreux patients présentent également d'autres anomalies oculaires telles qu'une forte myopie (< -6 dioptries), un strabisme ou un nystagmus. Parmi les différentes formes de CNCS, la forme complète, CNCS_c, se caractérise par un dysfonctionnement de la transmission du signal entre les photorécepteurs et une classe de cellules bipolaires. L'électrorétinogramme (ERG) de ces patients montre que la réponse des photorécepteurs à bâtonnet (onde b) est significativement diminuée. Aucun traitement n'est actuellement disponible.

Dans des études antérieures, il a été identifié que différents gènes étaient impliqués dans ce défaut de transmission dont les gènes GRM6 et LRIT3, qui nous intéressent plus particulièrement dans cette étude.

Dans ce projet, nous tenterons d'apporter une solution thérapeutique à cette pathologie grâce à l'apport d'un gène sain afin de remplacer le gène défectueux. Nous injecterons le gène *Grm6* ou *Lrit3* à l'aide d'outils viraux à des animaux qui en sont déficients [*Grm6*^{-/-} et *Lrit3*^{-/-}] ainsi qu'à leurs apparentés contrôles [*Grm6*^{+/+} et *Lrit3*^{+/+}]. Deux constructions différentes par gène seront testées et à 3 âges différents (P2, P15 et P30). Au total 240 animaux seront impliqués dans ce projet (y compris les témoins).

La restauration d'un phénotype normal sera évaluée par des ERGs (restauration de l'onde b) et des tests optocinétiques (évaluation de l'acuité visuelle). Les animaux seront ensuite euthanasiés et les yeux récupérés pour études histologiques complémentaires.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des lambeaux de papier kraft et des bâtons à ronger. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

4011. De nombreuses pathologies neuropsychiatriques, comme la dépression, la schizophrénie ou encore les addictions sont associées à des dysfonctionnements de la communication neuronale impliquant la dopamine. Malheureusement, ces dysfonctionnements restent encore mal compris alors qu'une bonne connaissance de ces troubles de la neurotransmission dopaminergique permettrait le développement de nouvelles approches pour traiter ces pathologies de l'humeur et de la motivation. Une nouvelle technique combinant chimie et génétique (dites "chemogénétique") appelé DREADDs pour Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs pourrait permettre une meilleure étude des systèmes neuronaux impliquant la dopamine car c'est une méthode très sélective qui permettrait de reproduire fidèlement les modifications de cette neurotransmission observée dans les maladies neuropsychiatriques. En effet, cette technique consiste à faire exprimer un récepteur qui a été modifié afin de réagir uniquement à une molécule synthétique qui ne se fixe à aucun récepteur endogène du cerveau. Ainsi, si ce récepteur est exprimé de façon sélective sur un type cellulaire particulier, l'administration de la molécule associée (Designer Drug) agira uniquement sur la population cellulaire ciblée, pouvant l'inactiver ou l'activer en fonction du récepteur utilisé.

Nous proposons dans ce projet d'exprimer les DREADDs spécifiquement dans les neurones dopaminergiques chez le rat, en utilisant une souche transgénique qui permettra l'expression des DREADDs après transfection virale uniquement dans ces neurones. Afin de tester l'impact fonctionnel de cette manipulation chemogénétique, nous nous proposons d'étudier l'effet de la molécule associée dans des tâches comportementales parfaitement maîtrisées au laboratoire et permettant d'évaluer les comportements associés à l'humeur et à la motivation.

Le rat apparaît comme le modèle de choix pour ce projet compte-tenu de la similarité de l'organisation anatomo-fonctionnelle de son cerveau avec celle de l'homme et de l'existence chez cette espèce de l'outil de transgénèse nécessaire pour les DREADDs. Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude (4 procédures expérimentales) est de 232. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Notamment, dès que possible, l'animal sera utilisé comme son propre contrôle afin de diminuer le nombre de groupes expérimentaux nécessaires. Ce projet implique de la neurochirurgie et certaines tâches comportementales correspondant à un niveau de douleur de classe modérée. La chirurgie sera effectuée sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique adéquate. L'état de santé

des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de bien-être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance apparaissent. Le projet traitant de problèmes psychiatriques et nécessitant des approches comportementales, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

4012. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent à la Réunion un problème de santé publique majeur. La mortalité y est deux fois plus importante qu'en métropole. Ces AVC sont des complications cliniques de l'athérosclérose. Une cause essentielle de l'athérosclérose est un excès de cholestérol correspondant à une élévation permanente (dyslipidémie) ou transitoire (aliments riches en graisse) des LDL. Ces lipides s'accumulent localement sous forme de plaques appelées athéromes. Outre une meilleure hygiène de vie, les principaux traitements médicaux reposent sur la prise d'antiagrégants plaquettaires et de statines permettant de normaliser le taux de LDL cholestérol et des lipides. Des molécules hypocholestérolémiantes issues de végétaux sont aujourd'hui utilisées, il s'agit d'analogues végétaux du cholestérol (stérols et stanols).

Nous proposons dans cette expérience d'utiliser des polyphénols extraits de *Doratoxylon apetalum* et de *Antirhea borbonica* deux plantes endémiques des Mascareignes en prévention des risques cardiovasculaires. Les extraits riches en polyphénols de ces deux plantes ont montré des propriétés anti oxydantes et anti inflammatoire sur des modèles cellulaires et animaux. Les polyphénols sont des molécules naturelles d'origine végétale connues en particulier pour leurs propriétés anti oxydantes participant à la diminution des risques cardiovasculaires. Outre cette activité anti oxydantes, certains composés polyphénoliques ont montré des effets hypocholestérolémiantes dans des modèles animaux. L'utilisation de ces composés phénoliques constitue une thérapie innovante dans le traitement et la prévention des risques cardiovasculaires. Nous souhaitons également tester sur les souris l'effet hypocholestérolémiant de molécules extraites de la matière cireuse de canna à sucre. Le Policosanol, riche en alcools gras, est prescrit contre l'hypercholestérolémie et pour la prévention des troubles cardiovasculaires. A travers cette expérience, nous souhaitons mettre en évidence cet effet dans le cas de la pathologie de l'athérosclérose.

Un modèle de souris n'exprimant pas le gène ApoE (souris ApoE^{-/-}) sera utilisé. Ce modèle présente l'avantage de développer spontanément des plaques d'athérome et un régime riche en graisse permet d'accélérer la progression des lésions artérielles. Pendant 5 semaines, 40 souris seront soumises à un régime riche en graisse et des molécules provenant de la biodiversité végétale terrestre leur seront administrés quotidiennement par gavage. Le profil lipidique ainsi que la taille des lésions seront évalués.

Cette étude répond entièrement à la règle des 3R :

Remplacement : la culture cellulaire est pratique pour répondre aux hypothèses mécanistiques mais ne permet pas de reproduire la complexité physiologique des maladies limitant l'étendue des hypothèses testables. Il est nécessaire de passer à un modèle animal qui permet de mieux comprendre les effets de molécules bioactives sur des paramètres physiologiques à l'échelle de l'organisme.

Réduction : les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant de réaliser des études statistiques.

Raffinement : les souris sont placées dans des conditions optimales (température, hygrométrie, cycle jour nuit 12h/12h, enrichissement des cages) au sein d'une animalerie agréée. Les animaux sont nourris ad libitum et toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale.

4013. La thérapie photodynamique est un traitement employé en cancérologie pour éradiquer les tumeurs de petite taille accessibles à la lumière. Le principe repose sur l'activation d'une molécule activable par la lumière appelée photosensibilisateur qui se localise préférentiellement dans la tumeur. Cependant, le photosensibilisateur peut s'accumuler également dans les tissus sains comme la peau ce qui peut entraîner des brûlures lors de l'exposition à la lumière. Une amélioration de la distribution dans l'organisme des photosensibilisateurs pour permettre une meilleure accumulation dans la tumeur tout en préservant les tissus sains est donc essentielle. Les photosensibilisateurs étant pour la plupart fluorescents, il est possible de suivre leur devenir dans l'organisme par des techniques basées sur la détection de la fluorescence émise par ces molécules (imagerie optique de fluorescence).

Le projet a pour objectif d'évaluer, par imagerie optique de fluorescence (appareil dédié au petit animal), la distribution dans l'organisme de la souris, en fonction du temps de nouvelles formulations à base d'acide 5-aminolevulinique (5-ALA). Dans les cellules, en particulier cancéreuses, le 5-ALA donne naissance à la molécule qui, activée par la lumière, est fluorescente. Le 5-ALA est utilisé en clinique, en particulier en dermatologie sous la forme de crème à appliquer sur la peau. En effet la voie intraveineuse n'est pas requise pour le 5-ALA très instable dans le plasma. Ces nouvelles formulations de 5-ALA pourraient améliorer sa stabilité dans le plasma tout en conservant une bonne efficacité dans la tumeur et une toxicité sur les tissus sains diminuée.

Les avantages de la technique d'imagerie employée reposent sur le fait qu'elle est non invasive. On peut ainsi utiliser le même animal tout au long de la procédure qui dure au maximum 48 h et implique un maximum de 7 séances d'imagerie. A la fin de la procédure les souris sont mises à mort et la fluorescence des organes est mesurée

Les dommages causés à l'animal proviennent de la nécessité de greffer des tumeurs humaines et d'injecter les composés par voie intraveineuse chez l'animal. Deux types de tumeur seront implantés en sous cutané.

- Le nombre total d'animaux sera de 104 souris maximum. Il est basé sur le nombre de composés à tester (6 composés prévus), sur le nombre de types de tumeur à greffer chez la souris (2 types prévus) et sur l'analyse statistique qui sera de type

séquentiel. Les nouveaux composés seront comparés au contrôle 5-ALA. De ce fait, le groupe contrôle sera composé de 4 souris et les groupes expérimentaux de 4 souris minimum (s'il n'y a pas de différence avec le groupe contrôle) ou de 8 souris maximum pour établir si la différence est statistiquement significative.

- Conformément aux exigences de réduction, le choix de l'analyse statistique séquentielle permet d'ajuster le nombre d'animaux. L'animal avant injection est son propre témoin pour l'imagerie (niveau de fluorescence avant l'injection des produits) et les composés sont testés à une seule concentration.

- Conformément aux exigences de remplacement, la toxicité des produits et leur pertinence (production de fluorescence dans des cellules en culture) sont évaluées sur des cellules en culture.

- Conformément aux exigences de raffinement, les techniques non invasives sont privilégiées et l'ensemble des procédures est réalisé sur animal anesthésié. Les procédures ne sont pas réalisées si les souris présentent une dermatose cutanée. En cas d'atteinte d'un point limite, en particulier une perte de poids de 10 à 15% sur 3 jours et supérieure à 20% au delà, des signes de détresse ou de douleur, la présence d'ulcérations cutanées ou de traumatisme auto-induit, et l'atteinte du volume éthique tumoral (1cm³), les souris sont mises à mort.

4014. Nous analyserons les effets protecteurs du mélange dextromethorphan + quinidine, commercialisé sous la dénomination de Nuedexta, dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer. La pathologie sera induite par injection cérébrale d'oligomères de protéine amyloïde. Après une semaine, les capacités cognitives des animaux seront analysées par un test d'apprentissage spatial en piscine et par un test de reconnaissance d'objet. Les animaux (108 souris pour l'ensemble de l'étude) seront ensuite sacrifiés et la perte cellulaire mesurée dans une structure importante pour la mémoire, l'hippocampe, et le niveau d'inflammation du cerveau sera mesuré par un dosage des cytokines pro-inflammatoires présentes dans la structure. Sur quelques animaux, ces cytokines seront également mesurées 3 jours après l'injection du peptide, à un temps où on s'attend à priori à ce que leur niveau soit très important. Cette étude vise à démontrer l'efficacité neuroprotectrice des composés à leur dose efficace sur un modèle in vivo de la maladie. Le nombre d'animaux par groupe est limité à ce qui doit permettre d'obtenir des analyses statistiques fiables (12 en analyses comportementales, 6 en analyses biochimiques). Les tests comportementaux peuvent reposer sur des stimuli aversifs destinés à provoquer le comportement d'apprentissage mais ils restent très ponctuels et ne génèrent ni angoisse ni douleur insupportables pour l'animal.

4015. Les nouveaux traitements ciblés tels que les anti-angiogéniques sont devenus un des traitements majeur du cancer. Leur chef de file, le Bevacizumab, correspond à des anticorps monoclonaux anti-VEGF. LE VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) est une protéine dont le rôle est d'induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) permettant d'alimenter la tumeur en oxygène et nutriments nécessaires à son développement.

Le Bevacizumab est actuellement indiqué en 1ère ligne pour des patients atteints de cancer colorectal métastatique (CCRM) en association avec une chimiothérapie. L'association du Bevacizumab avec une chimiothérapie constitue depuis quelques années un nouvel outil thérapeutique qui a permis d'allonger significativement la survie des patients atteints de CCRM. Suite à ces résultats cette association a été testée en situation adjuvante c'est-à-dire après ablation complète de la tumeur mais les résultats escomptés n'ont pas été observés avec au contraire un effet délétère sur la survie globale pour les patients traités avec l'association Bevacizumab/FOLFOX (FOLFOX est une association de chimiothérapies contenant du fluorouracil (5-FU), de l'oxalipatine et de la leucovorine (acide folinique)).

Le but de notre projet est de reproduire cette situation en préclinique afin de déterminer les causes de cet échec. Nous avons donc pour cela besoin de réaliser cette expérience dans un système intégré ; c'est pourquoi nous utilisons un modèle animal et que nous ne pouvons réaliser cette étude en in vitro.

Pour chaque xénogreffe, nous utiliserons un groupe contrôle pour 3 groupes testés, cela permettra de diminuer le nombre d'animaux. Les points limites sont les suivants: perte de poids >20%, isolement, yeux fermés, dos voûté, déshydratation, automutilation. Ces points seront surveillés deux fois par semaine par l'expérimentateur et quotidiennement par l'animalier pour permettre de limiter au maximum la douleur de l'animal. Pendant la durée du projet, nous envisageons d'utiliser 255 souris.

Dans un premier temps nous créerons un modèle animal mimant au mieux la maladie humaine (modèle orthotopique : greffe intra-caecale et résection de la tumeur 14 jours plus tard).

L'effet de ces différents traitements sera évalué en adjuvant, distribué dans 4 « bras » : FOLFOX seul, Bevacizumab seul, Bevacizumab/FOLFOX et contrôle.

Afin de représenter l'hétérogénéité tumorale nous allons tester les différents « bras » de traitements sur 3 xénogreffes tumorales humaines ayant des chimio-sensibilités différentes.

Notre projet a donc un intérêt clinique puisqu'il permettra de déterminer les causes de l'échec d'une association FOLFOX/anti-angiogénique en adjuvant d'une chirurgie colique, sachant que d'autres études cliniques testant le Bevacizumab ou d'autres anti-angiogéniques sont en cours en adjuvant dans d'autres cancers.

4016. 30% des Français auraient un taux de cholestérol total trop élevé, ce qui en fait l'une des anomalies la plus fréquente dans la population générale. L'augmentation du taux de cholestérol est fortement associée au développement de l'athérosclérose et aux maladies cardio-vasculaires (MCV) en général. Ainsi, la régulation du taux de cholestérol circulant dans le sang est une priorité pour la prévention de ces MCV.

Dans ce contexte, la conversion du cholestérol en coprostanol, molécule non absorbée par l'intestin, par des bactéries intestinales pourrait contribuer à l'élimination du cholestérol de l'organisme, et ainsi limiter la cholestérolémie et le développement de l'athérosclérose.

Seule une fraction de la population humaine héberge des bactéries porteuses de cette activité qui semble bénéfique.

Les bactéries responsables de ce métabolisme ne sont pas identifiées et les gènes ainsi que les enzymes impliqués sont encore totalement inconnus.

Dans un premier temps nous avons isolé des bactéries intestinales ayant la capacité de transformer le cholestérol en coprostanol à partir de selles humaines de donneurs ayant une cholestérolémie faible. Ainsi nous avons sélectionné 10 souches bactériennes à fort potentiel.

Notre objectif sera dans un premier temps de vérifier si ces bactéries sont capables de s'implanter dans un tractus digestif. Pour cela nous testerons chaque bactérie sur 2 souris axéniques (dépourvu de microbiote). Dans un deuxième temps, nous testerons de façon plus approfondies les souches qui s'implantent. Pour cette partie, 10 souris associées à chacune de ces souches recevront un régime riche en lipides et en cholestérol. Ainsi nous pourrions nous assurer que ces souches possèdent bien in vivo la capacité à convertir le cholestérol en coprostanol et à réduire la cholestérolémie.

Nous utiliserons pour notre étude au maximum 120 souris C57Bl6/J. Pour le test d'implantation nous utiliserons 2 souris par groupe ce qui est un minimum d'une part d'un point de vue éthique car la souris est un animal vivant en groupe et d'autre part d'un point de vue scientifique afin de ne pas mettre en péril l'expérimentation si un problème survient sur une souris.

Ensuite nous utiliserons des groupes de 10 souris pour tester la capacité à réduire la cholestérolémie, 10 étant un nombre minimal pour obtenir des résultats statistiquement pertinents.

Toutes ces souris seront pesées de façon hebdomadaire, le seul traitement étant constitué par le régime alimentaire riche en lipides et en cholestérol. L'implantation des bactéries sera réalisée par gavage orogastrique par une personne compétente.

Durant l'expérience nous ferons sur toutes les souris des prélèvements de fèces de façon naturelle (le simple fait de prendre la souris la fait déféquer naturellement). Pour la deuxième partie de l'étude nous ferons sur toutes les souris un prélèvement de sang au niveau de la joue, en respect avec la réglementation, en début et en fin d'étude afin de mesurer la cholestérolémie.

Compte tenu de la faible invasivité du protocole, aucune souffrance animale n'est attendue dans cette étude. Toutes les souris auront dans chaque cage un enrichissement du milieu par l'ajout de sopalin (pour faire un nid) et d'un bâton de bois à ronger. Les animaux seront toujours par 2 pour éviter l'isolement. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

4017. La prévalence de l'obésité s'est accrue de manière épidémique dans les pays développés. Compte tenu du lien étroit entre obésité et maladies métaboliques, cela pose un grave problème de santé publique. Résultant d'un déséquilibre entre calories ingérées et dépensées, l'excès de poids a souvent pour origine une perturbation du comportement alimentaire et/ou du métabolisme énergétique. Bien que les parts environnementale et génétique jouent un rôle indéniable dans ces perturbations, on sait maintenant que comportement alimentaire et métabolisme énergétique nous sont, en partie, dictés par notre héritage épigénétique. Ainsi l'alimentation d'un individu influencerait non seulement l'expression de ses propres gènes mais également celle des gènes de sa descendance. Pourquoi dans un environnement similaire, des individus deviennent-ils obèses et développent des maladies métaboliques alors que d'autres restent sains ? La réponse à cette question devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hérédité des maladies métaboliques, véritable problème de santé publique. De récentes données indiquent que les molécules d'ARNs présentes dans les spermatozoïdes de souris obèses et diabétiques seraient impliquées dans ce processus. Identifier les molécules d'ARNs responsable de ces pathologies est l'objectif du projet. A ce jour, la seule méthode permettant de répondre à cette question consiste à microinjecter dans des œufs fécondés les molécules d'ARNs identifiées préalablement comme étant potentiellement responsable du phénotype. La première étape du projet consiste donc à créer des animaux qui auront hérité via la microinjection d'ARNs à un stade très précoce de l'embryogenèse une population définie d'ARN. La deuxième étape consistera à analyser les caractères métaboliques de ces souris. Trois tests seront utilisés : le test de Résistance à l'insuline (ITT), celui de tolérance au glucose (GTT) et un prélèvement sanguin.

Notre travail porte sur la transmission paternelle de caractères nouvellement acquis sur un mammifère. Etant donné que les mécanismes moléculaires de ce type d'hérédité ne peuvent être analysés in vitro, nous utilisons parallèlement à notre modèle murin et en collaboration un modèle non-vertébré, *C. elegans*. Ce modèle nous permettra d'étudier certains aspects des mécanismes moléculaires de cette hérédité (Remplacement). Cependant, ce modèle a des limites. Il n'est, notamment, pas possible d'analyser les effets métaboliques d'une alimentation riche en graisse.

Afin de calculer la taille de l'échantillon nécessaire, nous avons réalisé un calcul de puissance, test qui permet de minimiser le nombre d'échantillons et donc d'animaux nécessaires pour valider ou non notre hypothèse de départ (Réduction).

Dans un souci de Raffinement, nous mettons en place toutes les dispositions permettant de minimiser les souffrances éventuelles qui pourraient être associées à nos expériences : recours à l'anesthésie et à l'analgésie, suivi post-opératoire des animaux avec évaluation de la souffrance grâce à des fiches de score permettant la mise en place de point limites précoces et adaptés. Afin de réduire la contrainte imposée à chaque animal, les différents tests seront réalisés en respectant un intervalle d'au moins une semaine entre chaque test. Des analyses moléculaires et histologiques seront ensuite réalisées sur chaque souris. Nous prévoyons utiliser au plus 1424 souris pour l'ensemble de ces travaux.

4018. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la troisième cause de mortalité par cancer dans le monde. Le traitement du CHC est indispensable sous peine d'une évolution fatale. Depuis 2007, de nouvelles molécules ont fait leur apparition dans

l'arsenal thérapeutique contre le CHC, et seul le Sorafenib dispose actuellement d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement du CHC. Bien qu'efficace dans le traitement du CHC avancé, le bénéfice en termes de survie reste modeste. De plus, 100% des patients développent plus ou moins tardivement une résistance à ce médicament. L'évaluation de nouvelles molécules reste donc un enjeu important.

Plusieurs pistes sont actuellement explorées afin d'améliorer les options thérapeutiques proposées aux patients, et notamment les effets anti-tumoraux des antidiabétiques. La metformine est actuellement le traitement le plus utilisé en première intention du diabète de type II. Des études récentes ont montré une diminution de l'incidence du CHC chez les patients diabétiques traités à la metformine comparée à des patients traités avec d'autres antidiabétiques, ainsi des propriétés anti-tumorales innées de la metformine. Dans ce contexte, il apparaît très intéressant de tester une nouvelle molécule anti-diabète, l'Y2266, qui pourrait démontrer des effets anti-tumoraux comparables voir plus important que la metformine.

In vitro, la molécule d'intérêt à montrer des effets anti-prolifératifs prometteurs sur des lignées de cellules de CHC humaines. Ce projet propose d'utiliser deux lignées cellulaires issues de CHC humains. L'objectif est de créer deux modèles de tumeurs humaines (une peu proliférante, une agressive) et de comparer les effets de l'Y2266 avec le sorafenib (médicament de référence) et la metformine (molécule de même type à laquelle nous souhaitons nous comparer). Le prélèvement des tumeurs pourra par la suite nous permettre de mieux comprendre la manière dont agit la molécule sur les différents types de cellules au sein de la tumeur, par des analyses immunohistochimiques.

L'utilisation d'animaux est nécessaire pour mettre en évidence les effets anti-tumoraux d'une molécule destinée à être utilisée dans le traitement contre le cancer chez l'Homme. Pour ce projet, nous utiliserons 100 souris nudes (immunodéprimées). Ce nombre a été déterminé de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux tout en conservant la validité statistique de l'étude, tant sur la croissance tumorale que les analyses immunohistochimiques qui suivront.

Les médicaments seront administrés par la même voie d'administration que chez l'homme, soit par voie orale. Le sorafenib sera administré une fois par jour par gavage. La metformine et l'Y2266 seront dissouts dans l'eau de boisson à la concentration voulue. Les biberons seront changés deux fois par semaine (le lundi et jeudi), et les biberons seront pesés pour évaluer le volume bu.

Les points limites sont les suivants : gêne pour se déplacer, comportement et apparence physique anormaux, perte de poids >20%, nécrose tumorale, volume de la tumeur >2000mm³. Si un des points limites est atteint, les animaux seront mis à mort dans les 24h. Ces points seront surveillés trois fois par semaine pour permettre de limiter la douleur de l'animal à son minimum. Aucune procédure douloureuse n'est à envisager.

4019. La capacité à encoder, maintenir en mémoire pendant quelques secondes et utiliser de manière flexible des informations qui ne sont plus présentes dans l'environnement constitue une forme de mémoire appelée mémoire de travail. La mémoire de travail contribue à de nombreuses fonctions ou processus cognitifs comme la mémoire à long terme ou la prise de décision et son déclin contribue de manière significative à l'altération de la vie quotidienne du sujet âgé. Plusieurs études longitudinales ont cependant montré que la mémoire de travail ne déclinait de manière marquée que chez certains sujets et l'identification des corrélats neurobiologique à cette variabilité constitue une facette importante des travaux actuels dans le domaine des neurosciences cognitives. Ce projet a pour objectifs 1) de tester, chez le Rat, l'hypothèse selon laquelle le vieillissement s'accompagnerait d'un déclin progressif en mémoire de travail, 2) d'évaluer si les déficits en mémoire de travail contribuent à l'altération de la mémoire à long terme de l'animal âgé, et 3) d'étudier certains des systèmes neuronaux dont l'altération, chez l'animal âgé, pourrait contribuer à ces déficits. Pour ce faire, la mémoire de travail d'un premier groupe de rats âgés de 3 mois (rats jeunes adultes) sera réévaluée aux âges de 9, 15 et 21 mois (rats âgés). Un second groupe de rat, maintenu dans les mêmes conditions mais dont la mémoire de travail ne sera testée qu'à l'âge de 21 mois, sera nécessaire afin d'évaluer l'impact de l'entraînement cognitif intermittent sur les performances des rats âgés du premier groupe. Avant de tester la mémoire de travail des rats âgés, nous évaluerons leur mémoire à long terme. A l'issue des tests comportementaux, les animaux seront mis à mort par injection d'une dose létale d'anesthésique et leur cerveau traité en vue des analyses immunohistologiques. Dans la mesure où ce projet a pour objectif d'évaluer des performances cognitives, nous ne pouvons appliquer l'une des recommandations de la règle des 3 Rs, à savoir celle de Remplacer, et recourir à un modèle autre que celui de l'animal. En ce qui concerne la recommandation de Réduire, le nombre d'animaux nécessaires à ce projet (48 au total) a été établi compte-tenu de la mortalité anticipée au cours du vieillissement, des pathologies cérébrales ne pouvant être déterminées qu'après la mise à mort (p.e. tumeur hypophysaire) et de l'approche statistique (notamment des analyses de corrélations) qui sera utilisée pour répondre aux questions auxquelles vise à répondre ce projet. Les effectifs terminaux escomptés dans chacun des deux groupes garantiront la validité des conclusions qui pourront être tirées de ce projet par un traitement statistique. La recommandation de Réduire se retrouve également dans notre plan expérimental ; en effet, les données acquises dans ce projet contribueront également à documenter un autre axe de recherche, celui de l'entraînement cognitif comme outil thérapeutique permettant de promouvoir le maintien / limiter la dégradation des performances de l'animal âgé dans le même domaine cognitif (mémoire de travail) ou dans un autre domaine (transfert de la mémoire de travail à la mémoire à long terme). En ce qui concerne la recommandation de Raffiner, les animaux de ce projet seront hébergés au laboratoire en binôme pendant toute la durée du projet et ne seront exposés à aucune procédure douloureuse. L'évaluation de la mémoire de travail des animaux nécessitera cependant de limiter leur accès à la nourriture à plusieurs périodes de leur vie, la tâche utilisée étant motivée par la délivrance d'un renforçateur alimentaire. Aucune limitation du bien-être des animaux n'est nécessaire à l'évaluation de leur mémoire à long terme.

4020. L'objectif de ce projet est de tester l'effet protecteur d'une molécule sur les conséquences d'un infarctus du myocarde. Cette molécule possède in vitro des propriétés anti-radicaux libres qui en font un candidat potentiel pour limiter les dommages cellulaires induits à la suite d'un infarctus, c'est à dire d'une séquence comprenant une ischémie (arrêt de la circulation sanguine) suivie d'une reperfusion. Nous nous proposons d'étudier les effets de la molécule sur un modèle d'infarctus myocardique induit chez la Brebis par obstruction temporaire d'une artère coronaire, mimant les conditions d'un infarctus créé par un caillot sanguin chez l'homme. Ce modèle sera utilisé pour évaluer l'effet protecteur de la molécule sur les tissus cardiaques et leur fonction contractile, en ajoutant le médicament avant ou pendant l'ischémie (en intraveineuse) ou au moment de la reperfusion en utilisant le cathéter utilisé pour l'occlusion (pour l'angioplastie en clinique). Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation du modèle par d'autres techniques étant donné la complexité physiologique environnante.

Dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés, cette étude sera complétée par une étude des conséquences de l'infarctus sur le déclenchement d'anomalies de rythme cardiaque en collaboration avec une équipe d'électrophysiologie. Le nombre total d'animaux utilisé pour cette étude est de 80 animaux (Contrôle : 20 animaux ; Effet de la molécule avant ischémie : 20 animaux; Effet de la molécule en cours d'ischémie : 20 animaux ; Effet de la molécule à la reperfusion: 20 animaux). De plus, les résultats obtenus avec les animaux SHAM (contrôles opérés mais sans ischémie) au cours d'une étude précédente seront réutilisés pour cette étude.

De par son analogie avec la physiologie cardiaque humaine, ce modèle devrait permettre de définir les modalités d'utilisation de la molécule (concentration, mode d'administration, ...) en vue d'essais cliniques. Les mesures de raffinement sont mises en place tout au long du projet, particulièrement dans le suivi des animaux, qui seront pris en charge par des personnes compétentes ayant l'habitude de cette espèce, au sein de locaux adaptés.

4021. Chaque année en France, 60 000 bébés viennent au monde prématurément, soit environ 7% des naissances. Et ce nombre est en perpétuelle augmentation, ce qui place notre pays au dixième rang en Europe. Une part importante de ces enfants est atteinte d'encéphalopathies périnatales touchant le développement de leur cerveau dont les signes cliniques peuvent apparaître tardivement. Ces encéphalopathies se manifestent en effet par l'apparition ultérieure de déficits cognitifs, comportementaux ou de déficits de socialisation qui à long terme peuvent conduire à la schizophrénie ou l'autisme.

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

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

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

4022. Chez le poulet, les souches d'*Escherichia coli* pathogènes aviaires (APEC) sont responsables d'une infection connue comme colibacillose aviaire. Cette infection est la première cause de pertes économiques d'origine bactérienne dans les élevages. Le traitement de la colibacillose aviaire repose essentiellement sur l'antibiothérapie, favorisant l'émergence de souches multi résistantes aux antibiotiques. Ces résistances sont devenues préoccupantes et conduisent à la mise en place de diverses stratégies pour éviter les situations d'impasses thérapeutiques. La production de médiateurs lipidiques est une étape importante pour la mise-en-place de la réponse inflammatoire lors des infections. Quelques médicaments ciblant la production des lipides sont disponibles sur le marché et de nouvelles molécules sont en cours d'études précliniques chez les mammifères. Ce type de médicament pourrait donc représenter soit une alternative, soit un support à l'antibiothérapie dans le cas des infections bactériennes. Néanmoins, la possibilité d'utilisation des anti-inflammatoires comme alternative thérapeutique lors d'infections bactériennes chez la volaille reste très sous-explorée. Le facteur d'activation plaquettaire (PAF) est un lipide qui exerce diverses fonctions lors de la défense de l'hôte contre les infections bactériennes. Son activité biologique est médiée par sa liaison à son récepteur, le PAFR. Certaines études chez les mammifères montrent que le PAF aiderait l'animal à combattre l'infection en facilitant l'élimination de la bactérie, mais dans d'autres cas il peut entraîner des dommages aux tissus pulmonaires et aggraver la maladie si la réponse est incontrôlée. Des données préliminaires de notre

laboratoire montrent qu'in vitro le PAF est capable d'induire une réponse pro-inflammatoire favorisant l'élimination des APEC par les cellules aviaires infectées. Cette réponse pro-inflammatoire et antibactérienne est inhibée par des molécules (antagonistes) qui bloquent la liaison du PAF à son récepteur PAFR. In vivo, nous ne savons pas si le PAF favorisera l'élimination de la bactérie ou si au contraire il contribuera plutôt à l'inflammation et aux dommages tissulaires. Pour cela, il nous faut identifier les types de réponses qu'un traitement avec des antagonistes du PAFR causerait sur des poulets infectés par des APEC. Un test de létalité permettrait de vérifier rapidement les effets de cette stratégie thérapeutique sur des poulets infectés par des APEC et se montrerait expérimentalement adapté pour répondre à ce type de question. Les informations obtenues apporteront donc, à moyen-terme, du rationnel pour le développement de nouvelles manipulations plus raffinées. Puisque ces antagonistes coûtent chers et ne sont disponibles qu'en petites quantités, le poussin sera utilisé dans les tests de létalité à la place du poulet adulte. Dans les élevages, les poussins peuvent aussi développer une colibacillose. Dans ce projet, des poussins âgés de 1 jour seront traités par voie orale avec un antagoniste du PAFR (10 mg/kg) puis infectés par voie sous cutanée avec 2 doses différentes d'une souche APEC (faible et forte dose). Un deuxième traitement par voie orale aura lieu 24h après le premier traitement. Deux groupes de poussins ayant reçu 1) seulement les bactéries (infectés et non traités) ou 2) seulement l'antagoniste (non infectés et traités) seront utilisés comme témoins. Les animaux seront suivis pendant 6 jours. Ceux qui présenteront des signes cliniques importants seront euthanasiés avant la fin de l'expérience. Nous avons prévu de tester 3 molécules antagonistes du récepteur du PAF, chacune contre 2 doses de 2 souches APEC différentes, ce qui fera un total de 1020 animaux sur 5 ans. Ces expérimentations répondent aux exigences de la règle des 3 R : Remplacement: Le développement d'une maladie infectieuse telle que la colibacillose résulte d'un ensemble complexe de paramètres qu'il est impossible de remplacer par des approches in vitro. De plus, l'effet d'une molécule ou d'un médicament sur le développement d'une infection ne peut être évalué que sur un animal vivant. Réduction : Le nombre d'animaux par lot est adapté aux buts de l'expérimentation et permet l'exploitation statistique des résultats afin de visualiser un effet potentiel de nos molécules d'intérêt. Raffinement : Les animaux sont maintenus dans des isolateurs adaptés en nombre et en taille, dans des conditions environnementales contrôlées, avec nourriture et boisson à volonté. Ils bénéficient d'un enrichissement social et comportemental.

4023. Le cortex cérébral ou néocortex est impliqué dans des fonctions cognitives comme la perception sensorielle, la motricité volontaire et le langage. Comprendre les interactions entre neurones et cellules oligodendrogiales ainsi que la dynamique de ces dernières dans le néocortex normal et malade est la clef pour répondre à des questions sur la plasticité neuronale et la myélinisation. De plus, le dysfonctionnement de ces interactions cellulaires peut entraîner des maladies mentales graves. Dans ce projet, nous étudierons ces interactions ainsi que la dynamique de recrutement, de la prolifération et de la différenciation des cellules oligodendrogiales au niveau du néocortex de la souris en conditions normales et pathologiques. Nous éluciderons les mécanismes dépendants de l'activité neuronale qui contrôlent l'oligodendrogenèse. Nos expériences seront menées au cours du développement embryonnaire et postnatal du cortex en utilisant une chirurgie stéréotaxique et plusieurs types de protocoles expérimentaux. Ces protocoles ne peuvent malheureusement pas être substitués par des procédures in vitro car il s'agit de reproduire l'environnement naturel des cellules et d'étudier leur dynamique. Un total de 1268 souris transgéniques sur cinq années sera utilisé pour des stimulations optogénétiques, des expériences d'imagerie biphotonique et d'immunohistochimie. Le calcul du nombre d'animaux a été fait afin d'obtenir un nombre suffisant de données pour chaque protocole expérimental, tout en appliquant strictement les grands principes éthiques de l'expérimentation animale. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

Cette étude est importante pour comprendre la dynamique des cellules oligodendrogiales chez l'animal vivant au cours du développement normal et anormal du cortex. Cette étude est importante car cette région est impliquée dans de nombreux troubles psychiatriques et mentales. Nous espérons que les résultats de notre projet ouvrent donc la voie pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques de ces maladies.

4024. L'efficacité de la chimiothérapie anticancéreuse repose sur sa capacité à induire la mort des cellules tumorales selon 2 modes d'actions: 1) directement, par toxicité de l'agent chimiothérapeutique au sein de la cellule tumorale et 2) indirectement, par induction d'une réponse immunitaire antitumorale. Notre équipe a récemment montré chez la souris que l'efficacité de la chimiothérapie anticancéreuse pouvait être améliorée en réduisant l'apport calorique des animaux avant d'initier le traitement. Cette restriction calorique consistait soit en une période de jeûne, soit à administrer des composés mimant la restriction calorique.

Notre laboratoire a pu identifier différentes molécules capables de mimer le jeûne et appelées CRMs pour "caloric restriction mimetics". Le but de ce projet est d'étudier le rôle des lymphocytes T régulateurs (ou Tregs) dans l'apport bénéfique des CRMs aux chimiothérapies anticancéreuses. Les Tregs sont des cellules impliquées dans la tolérance immunitaire et immunosuppressives au sein des tumeurs. Cette question ne peut être abordée qu'in vivo car il n'est pas possible d'étudier l'impact du système immunitaire sur la croissance tumorale dans des systèmes in vitro. Pour ce faire, nous projetons d'utiliser, des souris génétiquement modifiées ou non (nombre maximum de 720) dans lesquelles on peut induire la mort spécifique des Tregs. Ce projet implique des études de croissance tumorale et des analyses immunologiques ex vivo.

Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal.

Cette étude est effectuée in vivo car plusieurs niveaux de complexité sont nécessaires afin d'activer les cellules T régulatrices et d'observer leur rôle dans le développement cellulaire et la régulation de la croissance tumorale. Aucun modèle expérimental in vitro ni aucune modélisation informatique n'est à même de remplacer l'animal pour étudier l'efficacité de molécules thérapeutiques et les interactions entre les différents acteurs cellulaires et moléculaires des réponses immunitaires.

Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Nous pourrions être amenés à utiliser moins de souris si l'effet observé s'avère significatif au cours des premières expériences. L'étude sera arrêtée si l'expérience initiale invalide l'hypothèse de travail. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation et donc de chaque animal utilisé. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Dans le but d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au moment de l'expérimentation, plusieurs stratégies seront établies telles qu'une anesthésie des animaux et la mise en place d'une grille de suivi strict des points limites. De plus, le personnel impliqué dans ce projet assure une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

4025. La cécité est un problème de santé publique qui handicape gravement les personnes atteintes et qui concerne un français sur 1000. La thérapie cellulaire, consiste à remplacer des cellules « malades » dans le cadre d'une maladie causée par la déficience ou le mal fonctionnement d'une protéine essentielle où les médicaments conventionnels ne sont que de peu d'utilité.

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) ont la capacité de se différencier in vitro en tout type de cellules formant l'organisme adulte. Dans les dernières années des protocoles de différenciation efficaces ont mis en évidence la possibilité d'obtenir des photorécepteurs. La prochaine étape logique sera donc de tester la fonctionnalité de ces photorécepteurs in vivo pour tester leur capacité à intégrer et réanimer des rétines aveugles.

Dans ce projet, nous testons des nouveaux traitements applicables à une grande variété de maladies oculaires, plus particulièrement des dégénérescences rétinienne héréditaires. Nos traitements consistent en la transplantation intraoculaire des photorécepteurs dérivée à partir de organoïdes rétinienne modifié génétiquement pour exprimer un opsine microbienne qui les rend sensible à la lumière de la même manière photorécepteurs normaux.

L'objectif est d'étudier l'efficacité des photorécepteurs transplantés et les effets thérapeutiques de ceux ci dans des animaux traités. Pour ces études, un total de 450 souris sera utilisé (100 rd1, 200 rd10, 100 rd12 and 50 Souris sauvages C57BL6/J).

En tenant compte de la règle des 3R, les animaux sont stabulés dans les conditions conformes à la réglementation (portoirs ventilés dans des cages avec enrichissement, alimentation et abreuvement à volonté) et le nombre d'animaux utilisés a été réduit au minimum. En effet, l'utilisation in vivo de l'imagerie rétinienne et d'une approche d'analyse de la fonction rétinienne (électrorétinogramme) permettra de suivre, par différentes mesures répétées, l'évolution de la dégénérescence rétinienne au cours du temps sur un même animal (réduisant ainsi le nombre total d'animaux). De même, chaque animal n'est greffé que sur un œil, l'autre servant de contrôle, ce qui réduit d'autant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. L'administration d'analgésiques opioïdes en pré et postopératoire permet de prévenir la douleur éventuelle due aux actes chirurgicaux. Une observation régulière des animaux est effectuée pour détecter tout mal-être de l'animal avant le sacrifice en fin d'étude pour un suivi histologique.

4026. Les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC) ont un risque élevé de développer des maladies cardiovasculaires. En effet, l'IRC conduit à l'athérosclérose accélérée et par conséquent à une augmentation spectaculaire de la morbi-mortalité cardiovasculaire. Le taux élevé de mortalité ne peut pas être expliquée simplement par les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels. Les patients IRC ont des taux élevés de différents facteurs de la coagulation dont le facteur tissulaire (FT) qui est le principal initiateur de la coagulation in vivo. Ces anomalies biologiques conduisent à une augmentation des événements thrombotiques (thrombose veineuse profonde, thrombose d'accès vasculaire) en hémodialyse et peuvent jouer un rôle dans les événements cardiovasculaires (infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux...) chez les patients IRC.

L'IRC conduit à la rétention de toxines urémiques qui s'accumulent dans le sang et les tissus au lieu d'être excrétés par les reins. Deux d'entre elles, l'indoxyl sulfate (IS) et l'indole acétique acide (IAA) sont associées à la mortalité cardiovasculaire et globale. Ces toxines agissent grâce à un récepteur nommé AhR qui a un rôle sur l'activation de la cyclooxygénase 2 (COX2), une enzyme impliquée dans l'hémostase. De plus des liens ont été démontrés entre l'insuffisance rénale chronique et des augmentations des taux de CD146 soluble. CD146 est une molécule impliquée dans divers processus pathologiques dont l'athérosclérose, l'inflammation et la thrombose.

Ce projet apportera de nouvelles données dans la compréhension du rôle d'AhR dans les processus d'hémostase au cours de l'insuffisance rénale chronique. Il pourrait avoir des conséquences dans la prise en charge des patients afin d'améliorer leur pronostic cardiovasculaire.

Ce projet nécessite donc l'utilisation d'un modèle de souris invalidée pour le gènes AhR, COX-2 et CD146, chez lesquelles une insuffisance rénale chronique sera induite afin de valider nos hypothèses.

Afin de respecter les règles d'éthique, la règle des 3R («Réduction/Raffinement/Remplacement») sera appliquée. Seules les expériences considérées comme absolument indispensables seront réalisées afin d'utiliser le moins d'animaux possibles

(réduction) : rédaction d'un protocole expérimental avant toute expérimentation, utilisation des statistiques lors de la conception du protocole expérimental pour une estimation préalable du nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'anxiété subie par les animaux afin d'obtenir plus d'informations pertinentes à moindre coût en terme de "mal être" animal (raffinement). Par exemple, les animaux seront élevés dans des cages avec enrichissement du milieu. L'enrichissement mis en place consistera en l'ajout de matériaux de nidification de type « Nestlets » dans les cages, ce qui réduira l'ennui. Des analgésiques et des antibiotiques seront utilisés avant et après chirurgie. A chaque fois que cela sera possible, des modèles in vitro seront développés à la place des modèles in vivo (remplacement).

Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux pour chaque groupe, nécessaire à la réalisation d'un test statistique non paramétrique, soit un total de 288 souris.

Le protocole sera arrêté si l'animal présente des difficultés à respirer (visualisées par une augmentation des rythmes cardiaque et respiratoire répercutée au niveau des flancs de l'animal), si l'animal est prostré ou en retrait, si ses poils sont hérissés. Une grille d'évaluation de la douleur par score sera mise en place pour évaluer une souffrance animale éventuelle.

4027. Ce projet permet de vérifier l'efficacité de candidats médicaments en utilisant des modèles de pharmacologie chez le rongeur, sur les acouphènes et la perte d'audition.

La perte d'audition et les acouphènes sont deux indications pour lesquelles aucune solution thérapeutique satisfaisante n'existe à ce jour. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les déficiences auditives toucheraient aujourd'hui 15% de la population mondiale. L'impact sociétal est majeur, pouvant entraîner chez les malades, isolement social et dépression. La recherche de thérapies pour le traitement des troubles auditifs est très active, mais les expertises en matière de développement de médicaments incluant les modèles animaux et la mise en œuvre d'une recherche dite « translationnelle » font sévèrement défaut. C'est le contexte dans lequel s'inscrit ce projet qui consiste à générer chez le rongeur, au travers des mêmes causes que celles observées chez l'homme, des acouphènes et/ou une perte d'audition pour vérifier l'efficacité de principes actifs et permettre leur passage en phase clinique.

Le nombre d'animaux à utiliser dans ce projet est dépendant du nombre de candidats médicaments à tester par an. On l'estime à un maximum sur 5 ans de 5730 rats/cobayes et 480 souris.

Le projet s'établit selon la règle des 3 R :

Réduire : Le choix des procédures expérimentales à mettre en œuvre dans le projet tient compte de l'état de l'art et des conseils de scientifiques, experts internationalement reconnus dans le domaine de l'audition. Le nombre de procédures expérimentales est limité aux seules expériences considérées comme indispensables pour démontrer l'efficacité d'un principe actif sur les acouphènes ou la perte d'audition. Toute expérimentation fait l'objet d'un calcul de N permettant de définir un nombre minimum d'animaux pour mesurer de manière statistiquement représentative une efficacité.

Raffiner : Les animaux sont pris en charge par des personnes ayant toutes les qualifications pour exercer dans le domaine de l'expérimentation animale. Ils font l'objet d'un suivi quotidien et bénéficient de mesures d'enrichissement social et de leur milieu. Toutes les mesures fonctionnelles, sont réalisées sous anesthésie pour réduire au maximum l'inconfort, la douleur et l'anxiété des animaux. La priorité est donnée aux procédures non invasives. Dans tous les cas, des points limites ont été définis pour aider à la décision face à une situation « critique ».

Remplacer : L'analyse de l'état de l'art de la Recherche préclinique dans l'audition montre que l'utilisation des modèles rongeurs est la seule alternative pour tester l'efficacité des principes actifs avant leur administration chez l'homme. Une veille technologique continue permet de rester vigilant sur l'arrivée de nouvelles techniques qui viendraient se substituer à l'expérimentation animale.

4028. Les cancers sont un enjeu capital de santé publique avec plus de 12 millions de nouveaux cas dans le monde en 2008 (et une incidence prévisionnelle de 15 millions de cas en 2020) et bien que des progrès majeurs aient été réalisés durant cette dernière décennie, ils demeurent la 1^{ère} cause de mortalité chez l'homme et la 2^{ème} chez la femme. Il existe donc un vrai besoin médical chez ces patients réfractaires aux traitements usuels et sans alternative thérapeutique.

Les premières indications envisagées pour ce nouveau traitement seront des maladies orphelines : les cancers du sang tels que les lymphomes non hodgkiniens et les leucémies aiguës. Il s'agit de maladies hautement prolifératives et graves, dont le pronostic vital est souvent engagé.

Les traitements proposés aujourd'hui pour ces pathologies ont grandement amélioré le pronostic de ces patients : ils associent des poly chimiothérapies et de l'immunothérapie ainsi que des thérapies ciblées. Des traitements plus lourds comme les autogreffes ou des allogreffes de cellules souches hématopoïétiques peuvent être proposés mais ceux ci sont en général réservés aux patients de moins de 65 ans compte tenu de leur toxicité.

Malheureusement, ces stratégies ne sont pas toujours curatrices, en particulier chez les sujets âgés qui ne peuvent bénéficier des traitements intensifs.

Les phases de rémissions sont le plus souvent suivies de rechutes successives dans un délai variable en raison des résistances aux différents traitements proposés aboutissant à terme à une impasse thérapeutique et le décès en quelques semaines.

Ce projet a pour objectif d'obtenir des informations sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamie d'un anticorps monoclonal, potentiel nouveau traitement contre les leucémies et lymphomes, et de tester sa toxicité. Le modèle animal de choix est le primate non-humain compte tenu de sa grande proximité phylogénique avec l'homme et en particulier du fait des similitudes immunologiques.

Un nombre réduit de 8 ouistitis (*Callithrix jacchus*) sera utilisé pour tester ce traitement afin d'obtenir des résultats statistiquement interprétables (réduction) Le remplacement du recours au modèle primate est impossible ici car le ouistiti est la seule espèce animale dont l'épitope de fixation de l'anticorps utilisé est une homologie de séquence avec celui de l'Homme. La maladie n'a pas besoin d'être induite chez ces animaux puisqu'on ne cherche pas encore à connaître l'efficacité du traitement mais la toxicité potentielle. Afin de limiter les contraintes pour les animaux (raffinement), toutes Les interventions se feront sous anesthésie générale. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux avec des programmes d'enrichissement et de socialisation.

4029. La plupart des maladies causant la cécité prennent leur origine au niveau de la rétine. Les recherches conduites ces dernières années ont permis d'identifier certaines causes liées à des pathologies de la rétine ou à des défaut de communication entre la rétine et le cerveau, et d'identifier les cellules et les gènes impliqués.

L'objectif est de fournir la preuve de concept du mécanisme pour restaurer la vision par thérapie génique chez des patients humains. Pour cela, le modèle animal utilisé est le primate non-humain (macaque *Cynomolgus*) du fait de la proximité structurelle de l'œil avec l'Homme (présence d'une macula contrairement aux autres mammifères).

Afin de remplacer le modèle primate non humain par une espèce inférieure, des études antérieures ont déjà pu démontrer chez des modèles murins de cécité, que la fonction visuelle pouvait être restaurée par thérapie génique ciblée au niveau de la rétine. Néanmoins la rétine humaine ou de primates non-humains est très différente de la rétine de rongeurs. De plus les vecteurs utilisés pour la thérapie génique n'ont pas les mêmes effets en fonction du modèle utilisé. Il est donc très important de pouvoir confirmer les résultats obtenus précédemment dans des espèces inférieures chez le primate non-humain avant de pouvoir envisager les tester dans les phases cliniques. A ce stade, le recours au modèle primate non humain est donc essentiel. Dans ce projet, 20 macaques seront utilisés pour tester 16 vecteurs et vérifier que ces vecteurs ciblent bien les types cellulaires d'intérêt. Dans un but de réduction du nombre d'animaux utilisés, plusieurs vecteurs seront testés sur chaque animal. En termes de raffinement, les animaux sont hébergés en groupes sociaux avec des programmes d'enrichissement et de socialisation. Les interventions se feront sous anesthésie et sous couverture antalgique.

4030. Ce projet vise à étudier les effets de stress embryonnaires naturels, artificiels et maternels sur le comportement, le système endocrinien et la plasticité cérébrale de truites juvéniles à des stades précoces. Le stress prénatal a été le sujet d'un intérêt scientifique spectaculairement grandissant ces vingt dernières années et, de nos jours, il interpelle avec force des domaines aussi différents que la recherche fondamentale, le bien-être animal et la préservation des espèces ou la santé humaine. La truite étant une espèce aquacole ovipare, les oeufs se développent en incubateurs. Cette particularité permet un accès direct aux embryons et un contrôle rigoureux de leur environnement sensoriel. Par ailleurs, les alevins sont autonomes après l'éclosion ce qui rend une analyse des réponses comportementales possible à des jeunes stades, en évitant d'éventuels biais induits par des interventions de la mère. Ce projet s'intéresse à deux questions fondamentales qui ne sont pas encore abordées dans la littérature ou sont sujettes à de vifs débats :

1- Le stress prénatal de l'embryon a-t-il des effets bénéfiques ou délétères sur les comportements adaptatifs des juvéniles ?

2- La nature du facteur de stress (naturel ou artificiel) appliqué à l'embryon modifie-t-elle ces effets du SP?

Une question supplémentaire, mais cruciale sera abordée dans ce projet :

3- Le stress maternel induit-il chez les embryons l'émergence de phénotypes similaires à ceux observés lors de l'application d'un facteur de stress directement sur l'embryon ? Le cas échéant, par quels mécanismes ?

Le facteur de stress « naturel » correspond à un stimulus que les embryons sont susceptibles de percevoir en conditions naturelles (phéromone d'alarme émise par des congénères). Le facteur de stress artificiel correspond à une situation potentiellement rencontrée en conditions d'élevage mais ne durera qu'une minute (manipulation et exposition au froid lors du transport). Un stress sera appliqué dans un lot chez les mères pendant les 2 semaines précédant l'ovulation (chasse à l'épuisette dans le bassin 2 fois par jour).

Des études endocrinienne permettront de mettre en évidence les réponses physiologiques de l'embryon, ou, le cas échéant de la mère, à ces facteurs de stress. Pour évaluer les capacités d'adaptation comportementale des jeunes alevins, nous proposons une batterie de tests évaluant les comportements exploratoires, défensifs, de témérité et de réactivité. Ces études seront complétées par l'évaluation des performances cognitives au cours d'apprentissages embryonnaires. En parallèle, les conséquences de stress prénatals sur le développement cérébral seront évaluées.

Le nombre d'animaux nécessaires au projet est de 602 poissons. Le projet prend en compte la règle éthique des 3Rs :

- Remplacer : Il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car nous recherchons précisément les réponses comportementales adaptatives des poissons

- Réduire : Le nombre d'animaux est adapté au plus juste pour permettre des analyses statistiques fiables malgré les fortes variabilités du comportement entre les individus

- Raffiner : Les prélèvements ne seront réalisés que sur des animaux euthanasiés et ce, dans les conditions réglementaires. Il n'y aura aucune procédure douloureuse.

4031. Nous avons développé des nanoparticules de diamant (ND) pour transporter des siRNA visant à inhiber l'expression d'un oncogène impliqué dans le Sarcome d'Ewing. C'est un cancer de l'os de l'enfant avec une médiane d'apparition à 15 ans. Une translocation chromosomique a été décrite comme responsable de l'apparition de la maladie. Nous avons montré que de petits ARN interférents (siRNA), dirigés contre l'ARN messenger de cet oncogène, sont capables de bloquer spécifiquement son expression. Toutefois, ces siARN sont dégradés dans les milieux biologiques et n'entrent pas dans les cellules. Nous avons

développé des ND capables de les transporter dans les cellules où ils pourront agir. Les ND sont bien tolérés, ils sont aisément synthétisables et à faible coût et peuvent être rendus fluorescents ce qui permet de les détecter. Ces centres fluorescents sont brillants et sont sensibles au photo-blanchiment permettant de les étudier sur une longue période. De telles molécules pourraient avoir des applications dans le domaine de la théranostique (association du diagnostic et de la thérapie). Toutefois, ces vecteurs ne sont pas biodégradables et rien n'est connu sur leur bio-distribution et leurs voies d'élimination. Nous avons montré que des ND cationiques de très petite taille (5 nm) sont capables de transporter efficacement les siRNA dans les cellules où ils bloquent spécifiquement l'expression de l'oncogène cible. Leur association à des agents pharmacologiques potentialise leur effet *in vitro*

Notre projet est d'étudier la bio-distribution et la pharmacocinétique de ces ND cationiques et de rechercher leurs voies d'élimination en vue d'applications chez l'Homme. Nous souhaitons d'une part valider cet effet *in vivo* afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de ce nouveau traitement et d'autre part étudier l'innocuité d'un tel traitement. En effet, les nanodiamants, de par leur structure chimique, ne sont pas biodégradables. En effet, c'est également le cas des nanoparticules d'or ou de silice ayant déjà été étudiées *in vivo*. Nous souhaitons dans ce contexte étudier en priorité la bio-distribution, la pharmacocinétique et les voies d'éliminations potentielles de ces nanovecteurs en prenant comme particularité l'utilisation de nanoparticules de 5 nm compatibles avec une élimination rénale. Nous utiliserons leurs propriétés de fluorescence ainsi qu'un marquage radioactif en cours de développement dans lesquels les radioéléments seront intégrés dans la maille cristalline des ND donnant une implantation stable. Ces études préliminaires sont nécessaires pour une utilisation thérapeutique des ND. L'étude de leur efficacité à vectoriser des siRNA sera mesurée par leur capacité à inhiber la croissance de tumeurs implantées chez la souris. L'inhibition de l'expression du gène cible dans les tumeurs tant au niveau de l'ARNm et que la protéine EWS-Fli1 sera recherchée *in vivo*. L'association de ce traitement avec des composés pharmacologiques utilisés dans le traitement du sarcome d'Ewing (doxorubicine, vincristine, ifosfamide, ...) sera effectuée afin de rechercher une amélioration de l'efficacité du traitement.

Cette étude se déroulera en trois phases (toxicologique et biodistribution ; efficacité chez l'animal ; association avec des agents pharmacologiques). Il est nécessaire d'entreprendre cette étude chez la souris car les données cellulaires déjà obtenues ne permettent pas de connaître l'effet de ces ND sur la physiologie animale. Il est prévu que cette étude nécessite un nombre estimé de 2650 souris. Certaines expériences seront menées en utilisant des témoins communs, afin d'en diminuer le nombre. Des analgésiques seront utilisés dès que le traitement induit une souffrance aux animaux. Les expériences seront arrêtées en cas de perte de poids importante ou si les expériences préliminaires n'ont pas d'efficacité.

4032. Ce protocole d'étude vise à étudier le rôle d'une lectine de type C, CLEC-1. Nous avons préalablement identifiée la molécule CLEC-1 dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat, et ce afin d'identifier de nouvelles molécules qui permettraient d'induire la tolérance notamment en transplantation pour éviter les effets néfastes des immunosuppresseurs et les rejets de greffe. L'étude des mécanismes associés à la tolérance représente donc des enjeux médicaux et économiques cruciaux. Nous avons préalablement montré chez le rat que CLEC-1 présente des propriétés immuno-régulatrices dans les cellules dendritiques. CLEC-1 réduit la capacité des cellules dendritiques à stimuler la réponse effectrice des LT CD4+ notamment les Th17. Ces résultats suggèrent que CLEC-1 pourrait agir comme récepteur inhibiteur dans les cellules dendritiques en inhibant la réponse T effectrices et la polarisation Th17. Ceci est d'un enjeu crucial car les réponses Th17 sont impliquées dans le rejet de greffe mais aussi dans les maladies auto-immunes et de nombreuses maladies inflammatoires anti-pathogéniques. La molécule CLEC-1 pourrait donc servir d'outil thérapeutique pour inhiber cette réponse Th17 et il s'avère donc important d'étudier de façon plus approfondie la fonction de cette molécule dans des modèles *in vivo* chez le rongeur, c'est pourquoi nous proposons d'étudier le rôle de CLEC-1 dans des réponses immunes *in vivo* par l'utilisation de rats et souris déficients (KO) pour cette molécule.

Une meilleure compréhension de la régulation et des actions du CLEC-1 dans un modèle préclinique *in vivo* chez le rongeur de réponse effectrice T face à un antigène est un préalable nécessaire avant d'envisager une transposition chez l'homme. En effet, il est nécessaire d'avoir recours à un modèle animal ressemblant à ce qui se passe chez l'Homme suite à des immunisations ou des réponses inflammatoires pour tester l'implication d'une molécule. Il est nécessaire notamment d'avoir accès aux organes lymphoïdes secondaires pour étudier les mécanismes liés à la déficience de cette molécule CLEC-1; et non de se limiter au sang comme chez l'Homme. Notre modèle d'étude sera donc des souris (au nombre de 40 au total) et des rats déficients (KO) (au nombre de 40 au total) en la molécule CLEC-1 chez lesquels nous projetons de réaliser une immunisation *in vivo*.

Nous respecterons dans le plus de cas possibles la règle des 3R, afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés par groupe étudié. Les animaux seront hébergés dans l'animalerie selon les normes qui leur sont propres afin de ne pas ajouter un stress supplémentaire au protocole utilisé. Les animaux sont suivis tous les jours, afin de détecter le plus précocement une douleur et d'y mettre un terme, soit par traitement antalgique, soit par sacrifice de l'animal si la souffrance ne peut pas être contrôlée et afin de ne pas biaiser les résultats.

4033. Le lymphome est un cancer qui se développe à partir d'un type de globules blancs présents dans le système lymphatique, les lymphocytes. Il existe deux types principaux de lymphocytes : les lymphocytes B et les lymphocytes T. Les lymphocytes sont impliqués dans les réactions de défense de l'organisme. Ils sont localisés dans les organes lymphoïdes notamment les ganglions lymphatiques ainsi que les vaisseaux lymphatiques qui transportent ces cellules. Un lymphome apparaît le plus souvent dans un ganglion lymphatique et peut se propager à d'autres organes par le système lymphatique ou le sang. Nous nous intéressons à un type particulier de lymphome T : le lymphome anaplasique à grandes cellules qui surexprime une enzyme, appelée la tyrosine kinase. La présence de cette enzyme dans les cellules de lymphome résulte d'une

anomalie génétique et favorise le développement de la tumeur. Ces lymphomes sont tout d'abord traités par chimiothérapie. En cas d'échec de cette chimiothérapie, dans plus de 30% des cas, les médecins utilisent une nouvelle thérapie ciblée, un médicament qui inhibe l'action néfaste de la tyrosine kinase. Afin de proposer de nouvelles thérapies, il est donc indispensable de mieux comprendre le développement de ce cancer et des mécanismes à l'origine de ces rechutes. Pour cela il faut pouvoir modéliser l'histoire de la maladie. Cela nécessite donc de connaître la cellule normale à l'origine de ce cancer, cellule qui reste inconnue à ce jour. Au moins trois types cellulaires différents sont actuellement évoqués. C'est dans ce contexte que nous souhaitons étudier le développement de ce cancer. Pour cela, nous souhaitons introduire cette enzyme dans les trois types cellulaires suggérés comme étant la contrepartie normale des cellules cancéreuses. Nous évaluerons ensuite chez la souris si ces cellules peuvent induire une tumeur. Pour réaliser ces expériences nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux utilisés en effectuant le plus de validation possible dans des modèles cellulaires in vitro. Nos expériences ont pour finalité l'amélioration de la santé humaine et l'expérimentation in vivo est non substituable à aucune autre méthode car nous avons besoin d'un organisme complet pour étudier le développement des tumeurs. L'utilisation de ces techniques non-invasives permet ainsi d'observer au cours du temps un seul animal simplement anesthésié permettant de réduire sensiblement le nombre d'animaux utilisés. Ainsi 900 souris seront utilisées pour l'ensemble des expériences. Durant toute la période d'expérimentation, afin de limiter la souffrance des animaux, l'état général des animaux sera observé au moins trois fois par semaine au cours des expérimentations et en cas de souffrance ils seront traités par analgésiques ou euthanasiés, si nécessaire. Le week-end le suivi des animaux sera assuré par les zootechniciens certifiés de l'animalerie. Un enrichissement de type carré de coton sera rajouté aux animaux leur permettant ainsi de faire une nidation. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3 R (remplacement, réduction et raffinement) et la directive européenne 2010/63/UE

4034. Le contexte médical est celui des traitements des tumeurs cérébrales. L'indication principale visée est le traitement des métastases cérébrales qui représentent la grande majorité des tumeurs cérébrales, avec une incidence 10 fois supérieures à celle des tumeurs cérébrales primitives. En cas de réussite du projet, la prise en charge traditionnelle chirurgicale «à corps ouvert» des tumeurs sera profondément modifiée. L'utilisation des sondes interstitielles ou endocavitaires haute intégration offrira une meilleure efficacité, un contrôle de l'efficacité et de la sécurité en temps réel, des procédures raccourcies en ambulatoire sans hospitalisation ni anesthésie générale, avec un confort patient inégalé. En développant de tels traitements mini-invasifs, le coût de traitement sera divisé d'un facteur 5 par rapport à la chirurgie classique, et la durée de convalescence des patients sera également réduite. La prise en charge médicale sera d'emblée multidisciplinaire effaçant tous les délais de communication entre les différents spécialistes intervenants. Le présent projet est une étude préclinique qui va être menée afin d'évaluer in vivo, la faisabilité, les performances et la tolérance d'un traitement interstitiel par ablation thermique intracérébral réalisé avec une nouvelle génération de sonde ultrasonore de haute précision basée sur une nouvelle technologie. Cette sonde est une innovation technologique brevetée. Elle permettra une prise en charge combinée de diagnostic et de traitement hyperthermique de tumeurs cérébrales sous anesthésie locale, sous contrôle IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) en temps réel, et en ambulatoire. Cette sonde HICU interstitielle a pour but de pallier les inconvénients de stratégies actuelles de traitements par ablations thermiques. Cette étape a été en soi un challenge technologique compte tenu de la miniaturisation nécessaire. En accord avec la règle de Remplacement, ces prototypes ont fait l'objet d'essais préalables in-silico, in-vitro en bain, et in-vitro sur gel et sur cerveaux frais de veau. Ces essais ont montré des résultats très positifs et prometteurs : parfaite compatibilité IRM, puissance d'émission suffisante, software de gestion fiable. Il est impératif maintenant de poursuivre l'expérimentation sur animal vivant. Compte tenu de la nécessité d'un volume cérébral maximal pour un encombrement corporel minimal sous IRM, de la très bonne accessibilité à ce modèle animal et d'études précédentes permettant de confirmer la compatibilité de ce modèle avec les essais sous IRM, le porc charcutier a été retenu. Une fois mise au point, cette sonde pourrait remplacer certains actes neurochirurgicaux réalisés sous anesthésie générale à crane ouvert (tumeur cérébrales, métastases, épilepsie...) par une procédure réalisée sous anesthésie locale à crane fermé sous IRM interventionnelle avec sonde électroniquement contrôlée. Ce projet est en conformité avec les principes de Réduction et de Raffinement. L'étude inclura un maximum de 50 porcs. Elle s'articule en effet en 5 phases successives (phases 1-3 en aigu; phases 4-5 en chronique avec suivi à 15 jours) impliquant chacune au maximum de 10 animaux (voir détails section 3.3.5) ; et dans le souci du bien-être animal, les animaux impliqués bénéficieront d'un milieu socialement et matériellement enrichi.

4035. La Coqueluche est une pathologie des voies respiratoires causée par la bactérie Bordetella pertussis. Chez certains patients, les symptômes coquelucheux (fièvre, toux) peuvent évoluer vers une détresse respiratoire sévère voire le décès (195 000 décès par an). Cette pathologie touche en majorité les nourrissons et les jeunes enfants dont le système immunitaire est encore immature. Néanmoins aujourd'hui, les cas de coqueluche chez des enfants plus âgés voire des adultes sont de plus en plus fréquents.

Depuis les années 1940-1950, des vaccins « ancienne génération » dit cellulaires (wP) ont été mis au point pour l'immunisation des populations. Cependant, depuis les années 1990 et la crainte d'effets indésirables, des vaccins « nouvelle génération » dit acellulaires (aP) sont aujourd'hui utilisés dans la plupart des pays développés. Depuis ce changement vaccinal, une résurgence de cas de coqueluche a été détectée. Des études épidémiologiques, cliniques et pré-cliniques ont montré que l'immunité diminue rapidement après vaccination contre la coqueluche et particulièrement avec les vaccins aP. Ces derniers protègent de la maladie mais pas de la colonisation bactérienne ou de la transmission.

Les objectifs principaux du projet sont, dans un premier temps, de développer un modèle animal d'infection par la bactérie B. pertussis, mimant le syndrome coquelucheux humain, et de caractériser finement cette infection par des méthodes d'imagerie in vivo. Dans un second temps, il s'agit de caractériser la réponse immunitaire suite à la vaccination par les deux générations

de vaccins de nouveau-nés et/ou de femelles gestantes pour mieux comprendre les changements observés dans l'épidémiologie de la coqueluche.

Le primate non humain (PNH) a été choisi afin d'avoir, d'une part, un modèle d'infection par la bactérie comparable à la maladie humaine et, d'autre part, une réponse vaccinale similaire à celle qui sera obtenue chez l'homme.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 215 animaux nés et élevés en captivité dans un établissement reconnu. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum nécessaire compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour permettre l'interprétation des résultats. Des protocoles d'anesthésie, d'analgésie sont mis en place lors des méthodes expérimentales, toutes conçues pour éviter les souffrances lors des interventions sur les animaux (prélèvements de sang, de fluides et de biopsies, immunisations, infection expérimentale, imagerie sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés). Une attention particulière est apportée à l'hébergement des animaux en groupe. Cependant, pour maîtriser les éventuelles surexpositions bactériennes et les contaminations croisées entre individus, l'hébergement individuel est nécessaire. Dans ce cas, les animaux sont en cage individuelle permettant des interactions sociales entre eux et seront remis en groupe dès que possible.

Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires de la vaccination). Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera sollicité afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure de « bien-être animal » afin d'élargir le gamme d'activités propres aux animaux.

4036. Le psoriasis est une maladie inflammatoire de la peau affectant 2-3% de la population mondiale, toutefois, les causes exactes de cette pathologie ne sont toujours pas identifiées. Une meilleure compréhension de sa pathogénie est venue d'études précliniques basées sur des modèles murins développant un syndrome mimant le psoriasis. De ces études ont découlées la mise au point de traitements permettant de réduire l'étendue de la maladie et donc d'améliorer la qualité de vie des personnes souffrant de cette affection. Néanmoins, malgré cela, identifier de nouvelle(s) protéine(s) impliquée(s) dans sa pathogénie est un enjeu majeur afin d'une part de mieux comprendre son développement et d'autre part pouvoir caractériser de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Nos travaux antérieurs ont permis de montrer qu'une forme particulière d'une protéine connue pour réguler la réponse inflammatoire induit une maladie inflammatoire mimant le psoriasis humain lorsqu'elle est exprimée chez la souris. De plus, grâce à une étude clinique utilisant un grand nombre de biopsies de patients souffrant de cette affection dermatologique, nous avons observé que l'expression et l'activité cette protéine, mais également d'enzymes impliquées dans la régulation de l'inflammation, est augmentée dans la peau lésionnelle de ces patients.

Notre projet vise à étudier le rôle de Lyn et des caspases inflammatoires dans l'apparition et le maintien de pathologies inflammatoires cutanées telles que le psoriasis.

Notre objectif est donc d'analyser l'expression et l'activation de nos protéines d'intérêt dans le psoriasis, et enfin de prouver leur implication grâce à l'utilisation de souris déficientes pour ces protéines. Nous évaluerons également si la complétion d'une telle réponse est basée sur l'expression de nos protéines d'intérêt par les kératinocytes (cellules constituant l'épiderme) et/ou les cellules immunitaires. Enfin, nous validerons ces protéines comme nouvelles cibles thérapeutiques du psoriasis par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques.

Comme l'inflammation cutanée est dépendante d'une coopération et d'un dialogue étroit entre le système immunitaire et les kératinocytes, il n'existe pas à ce jour d'autre alternative que l'utilisation des souris pour l'étude in vivo des mécanismes moléculaires impliqués dans le psoriasis.

Notre étude repose sur l'utilisation de plusieurs modèles expérimentaux chez la souris (souris génétiquement modifiées développant spontanément un syndrome de type psoriasis ; application/injection de molécules connues pour induire du psoriasis chez la souris normale ou déficientes pour nos protéines d'intérêt).

Bien qu'il n'existe à ce jour pas de méthode de remplacement pour réaliser ces études, il est évident que nous sommes très vigilants à minimiser et à optimiser le nombre d'animaux utilisés dans nos expériences. En terme de réduction, en plus d'utiliser indifféremment mâle et femelle, nous optimiserons chaque individu puisque soit les 2 oreilles, soit les oreilles et le dos d'une même souris seront utilisés pour l'expérimentation.

Une grande importance sera accordée au bien-être des animaux. En terme de raffinement, les animaux sont hébergés en groupe avec un milieu enrichi. Leur suivi permet de détecter tout signe de souffrance, de détresse et ainsi la prise immédiate des mesures adéquates grâce à l'application de points limites précis. De plus une anesthésie est réalisée chaque fois que cela est possible. La notion d'enrichissement du milieu des rongeurs utilisés est familière aux demandeurs.

Cette étude utilise 2016 souris sur 5 ans.

4037. La transmission hétérosexuelle du VIH par voie vaginale est l'un des principaux modes de contamination par ce virus. L'entrée du virus a alors lieu au niveau des muqueuses du tractus reproducteur féminin (TRF). A ce jour, il n'existe pas de vaccin empêchant l'infection par le VIH. Un vaccin efficace contre la transmission du VIH par voie vaginale devra donc induire une réponse immune anti-VIH au niveau de ces muqueuses. Lors des rapports sexuels contaminants, les muqueuses du TRF sont exposées au sperme infecté par le VIH. Il est connu que le sperme, en particulier la fraction liquidienne de celui-ci, appelée liquide séminal, modifie la réponse immune locale pour permettre la fertilité. Le liquide séminal infecté est donc également susceptible de modifier localement la réponse immunitaire anti-VIH induite par la vaccination.

Afin de faciliter le développement futur d'un vaccin anti-VIH efficace, l'objectif de ce projet est d'étudier l'effet du liquide séminal infecté par le VIH sur la réponse immune induite par un vaccin modèle au niveau des muqueuses du TRF. Aujourd'hui,

aucun dispositif in vitro ne permet de reproduire la complexité d'une réponse immunitaire au niveau d'un organisme entier, il est donc nécessaire de recourir à un modèle animal. Le primate non humain (PNH) est le seul modèle animal permettant l'étude de la réponse vaccinale anti-VIH dans un contexte physiologique proche du contexte humain (structure du TRF et cycles menstruels semblables chez la femme et le PNH) et dans un modèle reproduisant la physiopathologie de l'infection par le VIH.

Le projet utilisera donc au maximum 36 PNH femelles, nées et élevées dans des établissements agréés. Les animaux seront vaccinés ou non avec un vaccin modèle, le MVA-VIH que nous étudions depuis plusieurs années. Ce vaccin induit une réponse immunitaire systémique anti-VIH. Dans un premier temps, nous vérifierons que ce vaccin induit également une réponse immune locale au niveau des muqueuses du TRF. Pour cela, 2 femelles seront vaccinées par le MVA-VIH puis exposées par voie vaginale à un placebo (groupe 1). Si une réponse immune est bien induite par le vaccin au niveau des muqueuses du TRF, dans un second temps, le groupe 1 sera complété avec 4 femelles supplémentaires ; de plus, 6 femelles vaccinées par le MVA-VIH (groupe 2) et 6 femelles non vaccinées (groupe 3) seront exposées au liquide séminal infecté par le VIH. Six animaux par groupe est le minimum requis pour une puissance statistique suffisante, sur la base de résultats préliminaires et de la littérature. La réponse immunitaire sera analysée dans le sang et dans les fluides vaginaux de façon longitudinale, puis les animaux seront euthanasiés pour caractériser les modifications de la nature et des fonctions des cellules immunitaires dans le TRF (vagin/cervix/utérus/trompes/ovaires), ainsi que dans les ganglions proximaux et distaux.

En accord avec la règle des 3R, les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administration du vaccin, prélèvement de sang et de fluides vaginaux sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés). Des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Le cas échéant le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider une euthanasie. Les animaux seront hébergés par paires et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

4038. L'époinçage du bec des poules pondeuses est systématiquement pratiqué en France afin de limiter les conséquences négatives de comportements de picage agressif. Cependant compte tenu d'une demande sociale importante, cette pratique est en cours d'interdiction dans plusieurs pays européens.

Le volet expérimental de ce projet a pour objectif de comparer différentes méthodes d'élevage susceptibles d'éviter l'époinçage du bec des poules pour éviter le piquage souvent observé dans les groupes.

Les avantages attendus sont l'amélioration des conditions de vie, susceptible d'augmenter le bien-être des animaux. Il n'y a pas de dommages attendus puisque les situations envisagées ne peuvent qu'être bénéfiques.

L'utilisation des animaux pour ce projet est nécessaire et ne peut être remplacée par des expériences in-vitro.

192 poules sont concernées, 3 fois durant leur vie : au stade poulettes, en début et en fin de cycle de ponte. Elles seront élevées au sol parmi 4320 poules puis transférées dans des cages aménagées pour 60 animaux avec une densité similaire à celle utilisée en élevage commercial dans laquelle des problèmes de santé et de bien-être des poules surviennent parfois. Quatre situations d'élevage seront comparées : poules aux becs époinçés élevées en situation standard d'élevage, ou avec enrichissement sur milieu, ou avec alimentation variée, ou avec enrichissement et alimentation variée. Dans chacune des situations ; il y aura des poules aux becs époinçés ou non.

Le nombre d'animaux concernés est nécessaire pour obtenir des résultats significatifs.

La présente saisine comprend des mesures de réactivité émotionnelle (par un test comportemental d'émergence), et de stress oxydant, révélateur de l'état de résistance générale de l'animal et potentiellement toxique pour l'organisme (inactivation de protéines, endommagement de l'ADN...), mesuré par prise de sang.

D'autres mesures, non invasives, seront réalisées : l'état corporel : score d'emplumement, lésions, état du bec, l'état de santé (mortalité et morbidité liée au picage ou non), les comportements (picages, agressions/fuites, utilisation des aménagements et des enrichissements), les performances zootechniques (poids des œufs, des poules, taux de ponte, localisation de ponte).

Les animaux seront mis à mort en circuit classique pour commercialisation et consommation, sauf ceux présentant des signes de douleur, définis selon une grille préétablie, qui seront euthanasiés localement dès que nécessaire. Pour tous, un étourdissement par électroanesthésie avant la mise à mort sera effectué.

Les conditions permettront d'améliorer le bien-être de animaux tant au point de vue de l'époinçage que ce celui des conditions de vie.

4039. La prise en charge de certaines pathologies humaines comporte en particulier le développement d'anticorps recombinants car il constitue une voie sûre pour obtenir des molécules bien tolérées pour la prévention et le traitement de ces maladies. L'approche consistant à obtenir des anticorps (Ac) recombinants en construisant des bibliothèques immunes exposées à la surface de phages à partir de primates non humains (PNH) puis à humaniser ces Ac, permet de participer efficacement à cette prise en charge. La plateforme d'immunisation de macaque combine judicieusement différentes technologies (in-vivo et in-vitro) afin de générer des Ac thérapeutiques à forte valeur ajoutée. En particulier, les Ac développés présentent une très forte affinité pour leur cible, un faible risque de toxicité par réactivité croisée (off target recognition) et une très faible immunogénicité.

Contrairement aux méthodes de développement d'Ac à visée thérapeutique utilisant des souris génétiquement modifiées, l'immunisation de PNH permet d'éliminer les Ac cross-réagissant avec les protéines de PNH non ciblées.

A l'opposé, les Ac issus de banques naïves ou synthétiques sont généralement de faible affinité, car n'ayant pas subi le processus de maturation d'affinité in-vivo et nécessitant alors la mise en place d'une maturation d'affinité in-vitro, ils augmentent les risques de toxicité due aux interactions non désirées (off-target).

Il est possible de tirer parti de la proximité phylogénétique entre les Humains et le PNH pour humaniser de manière extensive (régions charpentes et régions hypervariables des Ac) les Ac de PNH obtenus par cette approche. Cette humanisation est également possible à partir d'Ac issus de rongeur immunisé mais ce processus est alors souvent incomplet, induisant régulièrement des réponses anticorps anti-anticorps humanisé (ADA) chez les patients (immunogénicité).

Il a été démontré que les PNH peuvent développer des réponses immunitaires efficaces contre des antigènes en dépit de la proximité avec leur « soi immunologique », comme le démontre également l'existence de certains Ac dirigés contre des cibles humaines et actuellement en essais cliniques (Phases 2/3) et bien tolérés par les patients.

Afin, d'obtenir des titres sériques élevés contre ces cibles particulières, l'adjuvant complet de Freund (ACF) en primo-injection, puis incomplet (AIF) pour les suivantes a été historiquement utilisé avec succès.

Pour limiter le risque d'effets secondaires (granulomes) liés à l'utilisation de l'ACF, la primo-injection en ACF sera réservée uniquement aux immunogènes présentant une identité (séquence protéique) supérieure ou égale à 95 % avec son homologue PNH. La montée de la réponse immunitaire de l'animal sera suivie par la réalisation de tests sériques (type ELISA) afin de vérifier et contrôler l'efficacité de l'immunisation.

Le traitement des granulomes sera effectué si besoin (plaie ouverte) par le nettoyage (et dans certains cas de la chirurgie) et la mise en place d'un traitement antibiotique (historiquement, dans seulement 5-10% des cas) afin de limiter la surinfection (délétère à la spécificité de la réponse immunitaire souhaitée).

Finalement, compte tenu des tests complémentaires nécessaires (efficacité, toxicité notamment) pour tout développement préclinique d'Ac, cette stratégie permettrait de diminuer le risque d'échec et ainsi le nombre final d'animaux utilisés avant la mise sur le marché de la molécule.

Ce projet prévoit d'utiliser un maximum de 20 macaques cynomolgus sur 5 ans, qui proviendront d'un élevage agréé. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions (grille d'évaluation du bien être animal, administrations/prélèvements sous anesthésie quand nécessaire, limitation des prélèvements et volumes). Le personnel est entièrement formé et complètement accrédité. Les animaux seront sous la responsabilité du vétérinaire de l'installation.

Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long de l'étude (suivi clinique, poids, température) afin de détecter tout signe de douleur et/ou de détresse. Des mesures préventives et correctives seront également définies en fonction de l'apparition de tout signe clinique de stress ou de douleur, qu'il soit lié au protocole ou non. Des points limites sont définis pour décider de sortir l'animal de l'étude si des effets inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

Les animaux seront hébergés par groupes sociaux dans des volières conformes aux recommandations et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du bien-être animal de l'installation, notamment la mise à disposition de jouets dans les hébergements (kong, ballon, tube PVC...). Une rotation du matériel d'enrichissement, incluant une désinfection, sera organisée une fois par semaine pour éviter la lassitude et renouveler l'intérêt des animaux. Des friandises seront également distribuées systématiquement en fin de journée aux 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.

4040. Ce projet concerne la Recherche Fondamentale avec comme objectif d'arriver à déterminer l'impact d'un blocage de la molécule CD39 en combinaison ou non avec des traitements anticancéreux de types anticorps thérapeutiques et/ou agents chimiothérapeutiques pour prévenir la croissance de cellules tumorales et pour démontrer un effet sur la mobilisation de la réponse immunitaire (anti-tumorale) dans le cancer du côlon, le mélanome et le fibrosarcome en utilisant une greffe de lignées cellulaires murines chez des souris dites « sauvages », des souris dont le gène CD39 a été supprimé ou des souris dont ce gène a été remplacé par le gène CD39 humain. Le blocage de CD39 ou de son activité enzymatique apparaît comme une stratégie thérapeutique porteuse.

Nous cherchons à évaluer la progression tumorale en comparant les valeurs de masse des tumeurs au cours du temps. Il s'agit donc de suivre la croissance tumorale, car il n'existe pas de méthode alternative à ces expériences de preuve de concept in Vivo.

Ce projet comprend l'utilisation d'au maximum 1680 souris.

Le nombre total de souris utilisées dans le projet devrait être inférieur au nombre total annoncé, car selon les résultats des premières études, l'utilisation de certaines lignées cellulaires ne sera pas poursuivie. Il est cependant difficile à ce stade de déterminer quelles lignées seront conservées.

Toutes les expériences sont réalisées par du personnel formé et compétent. De plus, le contenu de celles-ci intègre les impératifs éthiques, mise en place de points limites, modalités d'hébergement, d'enrichissement du milieu, prévention de toute douleur, détresse, et/ou inconfort chez l'animal.

Ces études découlent de premiers résultats in vitro et in vivo non publiés et réalisés au sein du laboratoire. Les effectifs communiqués dans ce projet ont été évalués par les biostatisticiens de notre laboratoire et les résultats de ce projet seront analysés par cette équipe afin de déterminer la significativité.

4041. Les plaquettes sanguines sont produites par le mégacaryocyte lors de la mégacaryopoïèse/thrombopoïèse, processus complexes encore assez mal connus. Elles sont les premiers éléments cellulaires à intervenir lors d'une blessure vasculaire pour arrêter le saignement. Au delà de leur rôle premier d'arrêt du saignement, elles représentent des cibles majeures en clinique dans la prévention de pathologies cardiovasculaires (première cause de mortalité dans les pays industrialisés). A ce jour, de nombreux anti-thrombotiques efficaces sont utilisés en clinique mais entraîne généralement des saignements. L'avancée des connaissances dans la biologie des mégacaryocytes et des plaquettes est indispensable pour la détermination de nouvelles cibles pharmacologiques et le développement de stratégies thérapeutiques visant à corriger des syndromes hémorragiques résultant d'un défaut de production plaquettaire et/ou à mieux contrôler l'activation plaquettaire sans risques de saignement.

Dans ce contexte, nous étudions le rôle d'enzymes présentes dans les mégacaryocytes et les plaquettes et de leur produits dans les mécanismes régulant la production et les fonctions plaquettaires dans des conditions physiopathologiques. Peu de choses sont connues à ce jour pour la plupart des ces enzymes mais des résultats récemment publiés par notre équipe et d'autres laboratoires suggèrent fortement un rôle important de ces enzymes dans les plaquettes. Pour cela, nous disposons de modèles de souris génétiquement modifiées ciblant toutes ces enzymes. Le nombre de souris estimé pour cette étude est de 1100 animaux maximum sur 5 ans avec 6 procédures expérimentales et 11 lignées de souris. Le nombre d'animaux sera réduit au maximum (i) en suivant des protocoles expérimentaux établis et en tenant compte d'expériences déjà réalisées qui nous ont montré que nous pouvons obtenir des résultats statistiquement correct en faisant des groupes de 6 à 20 souris selon la procédure réalisée, (ii) en limitant aux seules expériences considérées comme absolument indispensables en fonction des résultats obtenus au fur à mesure du développement du projet et (iii) en évitant la répétition d'études antérieures. Toutes les procédures expérimentales se feront sous anesthésie/analgésie. La douleur et souffrance des animaux sera évité par une surveillance des animaux pendant le protocole expérimental et une euthanasie rapide si l'animal est en souffrance.

Ce projet devrait donc aider à une meilleure compréhension des mécanismes qui sous-tendent la production et les fonctions plaquettaires et mettre à jour de potentielles cibles pharmacologiques dans un contexte d'hémostase et de thrombose à visée thérapeutique.

4042. Le cancer du sein est la deuxième cause de décès par cancer et est responsable de 15% de tous les décès par cancer chez la femme. Ces cancers sont classés en trois sous-types majeurs dont le sous-type « basal » appelé aussi « triple négatif » du fait de l'absence d'expression des récepteurs hormonaux (œstrogène et progestérone) et du récepteur HER2 (exprimé dans le sous-type HER2+). Le sous-type basal se retrouve chez approximativement 15-20% des patientes.

Ce sous-type est associé à une croissance tumorale agressive, à la présence de métastases et à un sombre pronostic. A la différence des autres sous-types, la prise en charge des patientes ayant un cancer du sein basal par des thérapeutiques ciblées (hormonothérapie, anticorps monoclonaux, inhibiteurs de tyrosine kinases) n'est pas possible actuellement du fait de l'absence d'expression des cibles retrouvées dans les autres sous-types (HER2, ER, PR). Les seules options restent les traditionnelles chimiothérapies cytotoxiques qui ne jugulent pas la rechute des patientes et la progression métastatique. Ce constat nécessite la découverte de cibles thérapeutiques exprimées dans ces cancers et la génération de médicaments capables de les cibler spécifiquement.

Le laboratoire a récemment identifié un récepteur membranaire appelé VANGL2 dont la forte expression dans les cancers du sein basal est corrélée à un mauvais pronostic. Nous avons également montré que l'activité de VANGL2 est dépendante de son interaction avec des protéines cytoplasmiques comme SCRIBBLE importantes pour son activité invasive. C'est pourquoi, nous développons actuellement des tests cellulaires in vitro permettant de cribler et d'identifier des peptides inhibiteurs de l'interaction VANGL2 / SCRIBBLE et de valider leur efficacité à réduire de façon sélective la viabilité et la migration des cellules tumorales. Ainsi, l'objectif majeur de cette demande sera d'apporter la preuve de concept que l'inhibition de l'interaction entre VANGL2 et SCRIBBLE, grâce au plus efficace in vitro de ces peptides inhibiteurs, peut diminuer la progression tumorale et la formation de métastases in vivo dans un modèle préclinique. Dans ce but, des cellules tumorales humaines mammaires de sous-type basal et sur-exprimant ou non VANGL2 seront transplantées de manière orthotopique chez des souris immunodéprimées (NSG) puis traitées par un peptide inhibiteur de VANGL2.

Lors de cette phase de greffe et dans le souci de la règle des 3R, outre l'anesthésie durant la chirurgie, nous réaliserons une analgésie péri-opératoire afin d'éviter douleur.

Dans un souci de raffinement et de réduction, le suivi du développement de la pathologie se fera dès que possible, par des mesures cinétiques utilisant l'imagerie optique in vivo par bioluminescence (non invasive) sous anesthésie gazeuse (vetflurane). Cette technologie très sensible permettra également de détecter d'éventuelles métastases et donc d'évaluer l'effet du peptide inhibiteur sur ce processus.

De même, ces études seront réalisées de manière séquentielle pour déterminer la dose optimale à injecter et l'action du composé sur la pousse tumorale. Pour cela, nous utiliserons un nombre minimum mais nécessaire de souris, évalué à un total de 255. Pour le bien-être des souris, les animaux seront toujours hébergés en groupe et nous disposerons en tant qu'enrichissement des copeaux de bois compactés et du coton pour la nidification dans les cages.

Le projet s'inscrit donc dans la recherche de nouvelles formes thérapeutiques. En effet, le développement de stratégies ciblées en cancérologie est devenu une option incontournable pour faire avancer la recherche médicale et améliorer les traitements des patients. L'objectif de ce projet est de développer une thérapie pour les patientes atteintes d'un cancer du sein de type basal. Le résultat attendu serait la validation in vivo de l'efficacité d'un peptide inhibiteur de l'interaction VANGL2-SCRIBBLE pour le traitement de cancers du sein exprimant VANGL2.

4043. La consommation des molécules psychoactives est très fréquente et s'est considérablement aggravée au cours de la dernière décennie. Ces molécules nuisent à la santé et induisent de dommages cérébraux dont certains sont irréversibles. La compréhension de mécanismes d'action et d'interaction de ces molécules permettra d'élaborer des techniques de prévention afin de réduire ces dommages.

La Tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle atraumatique apportant des informations capitales pour la compréhension de l'activité neurochimique du cerveau.

Les molécules psychoactives telles que la caféine, la nicotine, l'alcool ou l'ecstasy agissent principalement sur le système nerveux central dont elles modifient le fonctionnement. La co-intoxication par plusieurs molécules psychoactives est fréquente et les conséquences sur la santé sont d'autant plus difficiles à évaluer que les mécanismes d'action de certaines interactions sont méconnus. Il a été montré, par exemple, que l'alcool potentialise l'effet de l'ecstasy. Il en est de même de l'association caféine/nicotine.

Le but de ce projet est d'étudier en TEP, sur le modèle primate non humain, l'effet de de l'administration à court et long terme des molécules psychoactives notamment l'alcool et l'ecstasy sur le fonctionnement et l'intégrité cérébrale ainsi que les conséquences de la co-administration de ces molécules sur leur mode d'action et la potentialisation de leurs effets. Il a été signalé dans la littérature scientifique que l'alcool induit un ralentissement du métabolisme de l'ecstasy et augmente par conséquent sa concentration dans le sang et son effet toxique. L'utilisation simultanée d'ecstasy et d'alcool peut masquer les effets indésirables liés à l'alcool sans changer sa concentration sanguine. Bien que cette co-administration soit dangereuse, elle reste fréquente, d'où l'intérêt de mieux comprendre les mécanismes de ces interactions au niveau cérébral par l'imagerie. Des radiotraceurs permettant d'étudier l'intégrité et le fonctionnement cérébral peuvent être utilisés chez l'animal à l'état normal (contrôle) et après intoxication aiguë par une molécule psychoactive. Nous allons donc pouvoir étudier à la fois les mécanismes et les conséquences de la co-administration de ces deux molécules (ecstasy/alcool) sur l'intégrité cérébrale. Ces connaissances devraient permettre, à terme, d'élaborer des techniques de prévention, voire d'identifier des méthodes pour minimiser les effets des molécules psychoactives et de leur association.

La majorité des molécules psychoactives induisent des modifications au niveau de plusieurs systèmes de neurotransmission, l'ensemble de ces réactions ne peut être reproduit in vitro sur des cellules. Il est donc nécessaire de recourir à un modèle animal, dans des conditions comparable à celles de l'homme avec administration des molécules psychoactives à des doses acceptables (ne mettant pas sa vie en danger mais induisant toutefois un effet pharmacologique permettant d'étudier l'action de ces molécules).

Le modèle primate non humain (9 animaux nés et élevés dans un élevage agréé) se justifie en raison des similitudes anatomiques et fonctionnelles fortes permettant une extrapolation aux conditions d'utilisation en pratique clinique chez l'Homme : développement cortical, matériel enzymatique et protéines de transport très proches ainsi que la taille du cerveau compatible avec la résolution spatiale des imageurs utilisés (environ 5mm). Les expériences TEP seront réalisées dans des conditions expérimentales comparables à celles utilisées en routine chez l'homme (injection d'un radiotraceur permettant d'explorer l'activité cérébrale). L'animal sera anesthésié pendant l'examen. Le nombre d'animaux est réduit au nombre minimum nécessaire pour obtenir des données suffisantes pour interpréter les résultats et observer des effets significatifs.

Des traitements analgésiques seront utilisés si besoin pour préserver le bien-être de l'animal. Un monitoring de ses paramètres physiologiques (rythme respiratoire, fréquence cardiaque, etc..) permettra de s'assurer de la santé de l'animal pendant l'examen TEP. Tout signe de souffrance conduit immédiatement à l'arrêt de l'examen d'imagerie. Les animaux seront suivis régulièrement par un vétérinaire. 15 examens TEP seront réalisés au maximum sur chaque animal. Une période minimum de 2 semaines et pouvant aller jusqu'à 2 mois séparera deux examens TEP. Les animaux seront euthanasiés en fin de protocole (environ 2 ans pour chaque animal), afin d'analyser leurs cerveaux pour compléter les données issues de l'imagerie.

4044. L'activation des récepteurs membranaires P2X par l'ATP contribue à la neuromodulation et la communication neuronale dans la physiologie du système nerveux central. Ils sont également impliqués dans de nombreuses neuropathologies dans lesquelles l'expression de surface des récepteurs P2X4 est fortement augmentée. Notre objectif est de mieux comprendre le rôle du récepteur P2X4 par différentes approches d'électrophysiologie in vitro, de biologie cellulaire et de biochimie à partir de souris génétiquement modifiées. Ce projet concerne la création d'une souris dont le gène du récepteur P2X4 a été modifié par la technique de knock in inductible de manière à augmenter l'expression de P2X4 à la surface des certaines populations de cellules mimant ainsi la situation pathologique, après croisements avec des lignées Cre recombinase (CMV Cre, et CAMK2 cre) . Le nom de cette nouvelle lignée est P2X4mCherry. Nous vérifierons cette modification génique ne provoque pas de phénotype nocif, ni dans la lignée inductible, ni dans les croisements générés avec 2 lignées Cre . La création de ces lignées et croisements nécessitera environ 550 animaux (tous génotypes confondus). Pour le respect de la règle des 3R, l'élevage sera minimisé le plus possible pour ne produire que les animaux nécessaires. Si le constat d'un phénotype nocif est fait, les mesures spécifiques seront prises pour le bien être de ces animaux.

4045. La dengue est une maladie virale causée par un arbovirus et transmise par l'intermédiaire d'un vecteur, le moustique Aedes. L'OMS considère qu'environ 40 millions de personnes sont potentiellement exposées à ce virus dans le monde. Dans 2,5% des cas, cette infection conduit à une forme hémorragique potentiellement mortelle chez l'Homme. Il n'existe à ce jour aucun traitement spécifique et aucun vaccin efficace contre cette maladie.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de nouveaux candidats vaccins qui pourraient avoir des applications cliniques chez l'Homme à moyen terme. Il s'agira notamment

- 1) d'apprécier la qualité de la réponse anticorps et de la réponse immunitaire cellulaire, spécifiques du virus ;
- 2) d'évaluer l'efficacité de l'immunité vaccinale vis-à-vis d'une infection d'épreuve par des virus de la dengue de sérotypes différents.

Les essais de protection par des vaccins ne peuvent être réalisés que sur des organismes entiers : aucun dispositif in vitro ne peut reproduire la complexité de la réponse immunitaire. Le modèle animal est donc nécessaire pour apporter le maximum d'informations avant la réalisation d'essais chez l'Homme. Nous avons choisi un primate non humain (PNH) afin d'avoir, d'une part, une réponse vaccinale similaire à celle qui sera obtenue chez l'Homme et, d'autre part, une infection par le virus de la Dengue comparable à la maladie humaine. Il s'agit d'un modèle établi pour cette maladie.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 52 animaux nés et élevés dans des établissements agréés (12 à 20 animaux par candidat vaccin testé). Leur nombre dans chacun des groupes expérimentaux a été réduit au minimum nécessaire pour permettre l'interprétation des résultats par des tests statistiques non-paramétriques. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (prélèvements, administration des vaccins et épreuve expérimentale sous anesthésie). Les animaux seront hébergés en groupe avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement. Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets non prévus le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

4046. Les maladies auto-immunes résultent d'un dysfonctionnement du système immunitaire qui s'attaque à certains constituants de l'organisme (c'est le cas du diabète de type 1, de la sclérose en plaques ou encore de la polyarthrite rhumatoïde), alors qu'il est sensé les tolérer et défendre l'organisme vis-à-vis d'agressions extérieures. Ces maladies évoluent de façon chronique tout au long de la vie, avec des phases de poussées et de rémissions.

Un constituant ciblé par le système immunitaire dans une maladie auto-immune est appelé auto-antigène. L'induction d'une tolérance immunologique spécifique pour l'auto-antigène paraît être primordiale dans le traitement de ces maladies. A ce jour, il n'existe pas de thérapies basées sur une telle induction.

Une société de biotechnologie a développé un procédé pour rééduquer le système immunitaire à percevoir les auto-antigènes comme faisant bien partie de l'organisme. Le procédé, dit de « tolérisation », exploite un phénomène naturel qui consiste à accrocher les auto-antigènes aux globules rouges circulant dans l'organisme. Lorsque ces derniers sont détruits, les auto-antigènes sont « scannés » par des cellules de la rate et du foie qui indiquent au système immunitaire de les tolérer. Ce concept a été validé préalablement chez la souris. L'objectif de ce projet est donc maintenant de démontrer l'efficacité de ce procédé dans un modèle expérimental plus proche de l'homme. Le modèle choisi est le primate non humain (PNH), dont le système immunitaire, dans son fonctionnement physiologique et pathologique, est très proche de celui de l'homme.

Au maximum 28 animaux nés et élevés dans des élevages agréés seront inclus dans le projet. En accord avec la règle des 3R, le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour analyser les données. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (limitation des volumes prélevés, prélèvements et injections sous anesthésie générale). Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés au minimum par deux dans des modules individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront d'un programme défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement pour l'enrichissement de leur milieu de vie.

4047. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une maladie de la rétine affectant la vision des personnes de plus de 60 ans. C'est une des causes majeures de perte de vision irréversible et sévère dans les pays développés. La vision est assurée par la rétine, structure qui tapisse le fond de l'oeil, hautement organisée en plusieurs types de cellules contenant notamment les photorécepteurs, une zone essentielle à la bonne vision est appelée la macula, elle assure la vision centrale et la perception des détails. La DMLA correspond au vieillissement accéléré de la macula. La maladie débute par l'accumulation de petits dépôts sous la rétine, puis évolue vers deux formes: une forme dite "humide" avec une prolifération anormale de nouveaux petits vaisseaux dans la rétine qui vont entraîner des destructions des photorécepteurs. Cette forme peut être endiguée par des traitements qui stoppent la croissance de ces vaisseaux anormaux. Dans la deuxième forme dite "sèche", les nouveaux vaisseaux ne se forment pas, mais les photorécepteurs se détruisent progressivement et aucun traitement n'est disponible à ce jour. L'environnement et la prédisposition génétique sont des facteurs de risque de la maladie: le risque de développer une DMLA est quatre fois plus important si un parent ou un membre de la fratrie est atteint d'une susceptibilité génétique. Plusieurs gènes associés à la maladie ont été mis en évidence.

L'objectif de ce projet est d'utiliser dans l'établissement utilisateur, un modèle animal porteur d'un défaut d'un gène entraînant la maladie afin de tester des traitements qui vont permettre la survie de la rétine. Compte tenu des particularités physiologiques et anatomiques de l'œil et l'absence pour l'instant de modèle alternatif, nous devons avoir recours à ces animaux.

Les informations bibliographiques recueillies, les analyses statistiques ainsi que notre expérience nous permettront de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés. Pour ce projet, d'une durée de 5 ans, un nombre maximum de 1260 souris de 4 à 5 semaines à l'arrivée dans notre animalerie, est envisagé afin de valider les efficacités des traitements.

Afin de minimiser l'impact sur le bien-être des animaux, un suivi quotidien sera effectué et des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter une éventuelle douleur ou souffrance à son minimum, sans

remettre en cause les résultats du projet ainsi qu'un enrichissement des cages d'hébergement seront mis en place. Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages de taille adaptée.

4048. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) induit une inflammation chronique chez les patients séropositifs qui persiste même sous traitement antiviral efficace. Cette inflammation résiduelle, notamment lorsqu'elle est associée à une activation des monocytes dans le sang et des macrophages dans les tissus, est responsable de la morbidité et de la mortalité chez les patients sous traitement. Certains primates non humains (PNH) d'Afrique comme les singes verts, hôtes naturels des virus de l'immunodéficience simienne (SIV, équivalent du VIH chez l'homme), sont naturellement protégés contre l'évolution de la maladie et présentent une infection non pathogène. Cette protection est associée à une absence d'inflammation. En revanche, les PNH d'Asie comme les macaques, infectés par le SIV développent une inflammation persistante et un SIDA. L'étude de la relation hôte-pathogène chez les PNH permet donc de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de l'inflammation observée dans l'infection de l'homme par le VIH.

L'inflammasome est un régulateur important de l'inflammation. Il favorise la maturation de deux acteurs moléculaires de l'inflammation, l'interleukine-1 β et l'interleukine-18, notamment dans les macrophages, cellules présentes dans tous les tissus, dont l'intestin. Les macrophages sont capables de détecter des éléments étrangers, de les ingérer afin de les détruire et d'alerter le système immunitaire. Au niveau de l'intestin, l'inflammasome dans macrophages serait activé dans les infections pathogènes contrairement aux infections non pathogènes. Notre hypothèse est que chez les hôtes naturels, l'inflammasome est activé seulement à bas bruit et pas dans les macrophages. L'objectif de ce projet est de mettre en évidence l'activation différentielle de l'inflammasome dans les deux types d'infections et d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués. L'objectif, à terme, est de développer des stratégies contre l'inflammation résiduelle induite par le VIH chez l'homme.

Ce projet prévoit au maximum 17 PNH nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Leur nombre dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques et permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : inoculation virale et prélèvements de sang, de fluides muqueux et biopsies sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Des échantillons biologiques produits dans ce projet seront partagés avec d'autres laboratoires. Les animaux seront hébergés par paires avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule «bien-être animal» de l'établissement.

4049. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) induit une inflammation chronique chez les patients séropositifs qui persiste même sous traitement antiviral efficace. Cette inflammation résiduelle, notamment lorsqu'elle est associée à une activation des monocytes dans le sang et des macrophages dans les tissus, est responsable de la morbidité et de la mortalité chez les patients sous traitement. Certains primates non humains (PNH) d'Afrique comme les singes verts, hôtes naturels des virus de l'immunodéficience simienne (SIV, équivalent du VIH chez l'homme), sont naturellement protégés contre l'évolution de la maladie et présentent une infection non pathogène. Cette protection est associée à une absence d'inflammation. En revanche, les PNH d'Asie comme les macaques, infectés par le SIV développent une inflammation persistante et un SIDA. L'étude de la relation hôte-pathogène chez les PNH permet donc de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de l'inflammation observée dans l'infection de l'homme par le VIH.

L'inflammasome est un régulateur important de l'inflammation. Il favorise la maturation de deux acteurs moléculaires de l'inflammation, l'interleukine-1 β et l'interleukine-18, notamment dans les macrophages, cellules présentes dans tous les tissus, dont l'intestin. Les macrophages sont capables de détecter des éléments étrangers, de les ingérer afin de les détruire et d'alerter le système immunitaire. Au niveau de l'intestin, l'inflammasome dans macrophages serait activé dans les infections pathogènes contrairement aux infections non pathogènes. Notre hypothèse est que chez les hôtes naturels, l'inflammasome est activé seulement à bas bruit et pas dans les macrophages. L'objectif de ce projet est de mettre en évidence l'activation différentielle de l'inflammasome dans les deux types d'infections et d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués. L'objectif, à terme, est de développer des stratégies contre l'inflammation résiduelle induite par le VIH chez l'homme.

Ce projet prévoit au maximum 17 PNH nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Leur nombre dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques et permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : inoculation virale et prélèvements de sang, de fluides muqueux et biopsies sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Des échantillons biologiques produits dans ce projet seront partagés avec d'autres laboratoires. Les animaux seront hébergés par paires avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule «bien-être animal» de l'établissement.

4050. Les Polychloro-biphényles (PCBs) sont des composés organiques persistants s'accumulant tout au long de la chaîne alimentaire, mais également des perturbateurs endocriniens. Notre exposition au travers de l'alimentation (notamment les poissons) favoriserait le développement de pathologies liées à l'inflammation, dont le diabète de type 2 (inflammation du tissu

adipeux). Cependant, nous sommes exposés au travers de notre environnement à de nombreux composés chimiques, dont les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) qui se forment lors de la cuisson à feu vif des graisses. Lors de leur dégradation dans l'organisme, ils libèrent des espèces chimiquement réactives capables d'induire une inflammation. Il nous paraît important d'étudier les "effets cocktail" des PCBs et des HAPs sur le développement de l'insulino-résistance et du diabète de type 2. Pour ce faire nous avons choisi comme modèle expérimental la souris C57BL/6J adulte male qui est classiquement utilisée dans les études métaboliques, en effet il n'était pas envisageable de travailler au moyen d'un simple modèle in vitro, les phénomènes endocrines impliquant le dialogue entre différents tissus. Nous travaillerons sur un lot de 36 souris qui seront réparties aléatoirement en six groupes, un groupe contrôle, un groupe exposé à une faible dose de PCB118 (PCB dioxin-like diabéto-gène) et un à une dose moyenne, un groupe exposé au benzo(a)pyrène (HAP de référence), un groupe co-exposé au benzo(a)pyrène et à une faible dose de PCB118 et un groupe co-exposé à une dose moyenne de PCB118. L'utilisation de 6 animaux par groupe, permettra de réaliser un test statistique pour déterminer les différences inter lots. Chaque groupe sera hébergé dans sa propre cage pour éviter des contaminations croisées. Les animaux seront observés tous les jours lors du changement de leur eau de boisson, de leur alimentation et de leur litière. Ils seront pesés chaque semaine et lors de leur traitement. Les animaux seront traités pendant trois mois par gavage à J1, J15, J30, J45, J60, J75. Après le gavage (le volume de solution (en µL) administrée correspond à 5 fois la masse de l'animal (en g)), le comportement des animaux sera étroitement observé pendant les 2 premières heures pour mettre en évidence une souffrance due à des lésions du tube digestif (utilisation de l'échelle de douleur "mouse grimace scale") et éventuellement sacrifier l'animal. A J89, les animaux seront mis à jeun le soir, et seront sacrifiés à J90 en début de matinée. Les animaux seront tout d'abord anesthésiés par injection par voie intra-péritonéale d'une dose létale de penthotal. Dès leur endormissement, du sang sera prélevé par voie rétro-orbitale en vue du bilan biologique. Les animaux seront ensuite sacrifiés par rupture des vertèbres cervicales. Les organes d'intérêt seront alors prélevés (foie, tissu adipeux, muscles striés, hypothalamus) et conservés pour les expériences ultérieures visant à mettre en évidence les gènes dont l'expression a été perturbée par les traitements. La mise en évidence de ces gènes cible devrait permettre de définir à terme de nouvelles stratégies préventives vis à vis des effets toxiques de ces composés environnementaux.

4051. Des tests rapides de diagnostic et de détection doivent régulièrement être mis au point pour les maladies infectieuses, la biosécurité et la biosûreté. L'unique possibilité pour les chercheurs est de recourir aux anticorps monoclonaux. Ces protéines reconnaissent spécifiquement des antigènes, marqueurs d'agents étrangers à un organisme qui déclenchent la réponse immunitaire.

La fabrication de ces anticorps se déroule en 3 étapes principales :

② la génération de cellules immunitaires productrices d'anticorps par stimulation in vivo (splénocytes) de rongeurs immunisés avec des cibles antigéniques d'intérêt (protéines, virus, bactéries inactivées...), puis leur fusion in vitro avec des cellules de souris, afin de générer des cellules hybrides (hybridomes) sécrétrices d'anticorps monoclonaux ;

② la sélection des meilleurs hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux, Pour cela, il faut réussir à isoler les anticorps des hybridomes et de leurs contenus. Cette étape de purification est inenvisageable en culture cellulaire classique : les milieux de culture sont très riches d'autres anticorps (milieux avec sérum) qu'il est très difficile de séparer de l'anticorps d'intérêt. Il est possible d'adapter le milieu de culture (milieu sans sérum, culture en bioréacteur) pour faciliter la purification. Mais l'adaptation nécessite de nombreuses optimisations des conditions de culture. Outre qu'elles peuvent prendre plusieurs mois, elles sont techniquement difficiles à mettre en œuvre au-dessus d'un certain nombre d'hybridomes (en moyenne 20 hybridomes caractérisés pour une cible antigénique). A ce stade, l'induction d'ascites chez un nombre réduit et minimal de rongeurs est l'alternative la plus favorable pour obtenir de petites quantités de chaque anticorps avec une qualité de production comparable. L'induction d'ascites consiste à accumuler un anticorps d'intérêt dans la poche abdominale d'un animal.

② après sélection des meilleurs anticorps obtenus (2 à 4 hybridomes pour une cible antigénique), la culture in vitro en bioréacteur des hybridomes permet dans la plupart des cas de les produire en plus grande quantité. Cependant, il arrive parfois que cette méthode en bioréacteur ne soit pas possible, on se retrouve en échec de production. Dans ce cas, la multiplication sera effectuée in vivo par induction d'ascite.

Le recours à la production d'anticorps in vivo, lorsqu'il doit être utilisé, est toujours appliqué sur un nombre minimum d'animaux nécessaire à cette opération. C'est une méthode rapide à mettre en œuvre et particulièrement adaptée en cas d'urgence sanitaire : nous l'avons utilisée pour la production d'anticorps anti Ebola lors de la crise sanitaire de 2014 pour permettre la mise au point en urgence d'un test de détection du virus. Les animaux sont observés quotidiennement par une équipe soucieuse de leur état de santé qui interviendra dès le moindre signe d'inconfort.

Tous les animaux sont issus d'élevage autorisé et dédié à l'expérimentation. Le nombre de rongeurs (9070) correspond à un nombre maximum pour le développement et la production d'anticorps monoclonaux pendant 5 ans. Il sera bien évidemment revu à la baisse, à chaque fois qu'il sera possible de produire par des méthodes in vitro. Ces dernières années, nous avons diminué le nombre d'animaux d'un facteur 3,2 par la réduction du nombre d'anticorps produits in vivo et nous poursuivons nos efforts dans ce sens. Notamment, notre expérience de culture en bioréacteur augmente et devrait à plus ou moins long terme nous permettre de sélectionner les meilleurs anticorps in vitro.

Pendant toute l'expérimentation, une attention particulière sera portée aux animaux, et dans le cas de souffrance un recours à une analgésie systématique et suffisante sera mise en place. Les animaux sont hébergés dans une installation saine et réservée à cet effet, en groupe sociaux avec un enrichissement de milieu, de manière à respecter leur mode de vie. Des critères d'arrêt ont été définis et validés par un vétérinaire et seront mis en application lors d'éventuels effets inattendus.

4052. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de mal voyance chez les personnes de plus de 50 ans dans les pays industrialisés et la troisième cause dans le monde. Sa fréquence augmente avec l'âge et le nombre de patient augmentera compte tenu de l'allongement de l'espérance de vie.

Cette pathologie touche l'oeil dans une zone particulière la macula de la rétine impliquée dans la vision centrale et de précision. La maladie est silencieuse pendant plusieurs années, puis la vision et la perception des détails baissent, des tâches sombres apparaissent au centre du champ de la vision.

Dans la forme dite « humide » de la DMLA, plus grave qui évolue rapidement vers une perte importante de la vision centrale, de nouveaux vaisseaux sanguins poussent de façon anormale et endommagent la rétine. La stratégie des traitements est de stopper la progression anarchique de ces vaisseaux délétères.

L'objectif de ce projet est de mettre en place dans l'établissement utilisateur, un modèle expérimental de néovascularisation choroidienne chez les rongeurs et le lapin pour participer au développement de substances thérapeutiques limitant la formation de cette maladie de la rétine.

Compte tenu des particularités physiologiques et anatomiques de l'organe concerné, nous devrons avoir recours à des animaux pour établir notre modèle. La littérature scientifique décrit très précisément comment induire la pousse de ces nouveaux vaisseaux dans des zones de la rétine.

Lapins et rongeurs (rat souris) sont largement utilisés dans la recherche en ophtalmologie pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathologie et le test de nouveaux traitements, chaque espèce offrant des possibilités complémentaires d'évaluation de la pathologie, de possibilité de traitement (pose d'implant chez le lapin, spécificité d'espèce pour les traitements à base d'anticorps, outils pour évaluation de la pathologie...). Pour ce projet nous aurons besoin au maximum de 1850 rats, 1850 souris, 1850 lapins.

Les informations bibliographiques, les analyses statistiques et notre expérience, nous permettront de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les conditions d'hébergement, le bien être des animaux et leur amélioration, font l'objet d'une surveillance constante au sein de notre société. Ce projet a été soumis au comité d'éthique et sera suivi par la structure en charge du bien-être animal de l'établissement.

4053. En 2014 on recensait 36,9 millions de personnes infectées par le VIH dans le monde dont 22 millions n'ayant toujours pas accès aux traitements. En outre, le VIH induirait 5600 nouvelles infections et causerait 3288 morts chaque jour dans le monde (Source Onusida, décembre 2015). Il n'y a aucun vaccin efficace contre le VIH, principalement en raison d'un manque de connaissances des mécanismes utilisés par le virus pour échapper au système immunitaire. La reconnaissance d'un pathogène par les cellules dendritiques, cellules centrales de la réponse immunitaire, est une étape clé pour initier une réponse antivirale efficace. Or, l'infection par le VIH induit des dysfonctions des cellules dendritiques. Des expériences in vitro suggèrent que le virus utiliserait les propriétés d'une protéine localisée à la surface des cellules dendritiques, le récepteur LILRB2, pour déréguler les fonctions de ces cellules. Néanmoins, la démonstration du rôle de LILRB2 in vivo au cours de l'infection par le VIH n'a jamais été faite.

L'objectif de ce projet vise à caractériser, in vivo, le lien entre LILRB2 et les dysfonctions des cellules dendritiques induites par le VIH. Aucun dispositif cellulaire ne pouvant reproduire la complexité d'une réponse immunitaire in vivo, il est nécessaire de recourir à des modèles animaux. Le primate non humain (PNH) a été choisi pour ce projet. C'est le seul modèle animal permettant, en l'état actuel des connaissances, l'étude de la physiopathologie de l'infection par le VIH. L'évolution de l'infection chez le PNH infecté par le virus simien SIV est semblable à celle observée chez l'homme au cours de l'infection par le VIH. Ce modèle est le plus pertinent pour obtenir des résultats prédictifs et transposables à l'homme.

Le projet prévoit 6 animaux nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour l'interprétation des résultats, sur la base de résultats préliminaires et de la littérature. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (inoculation virale du SIV, prélèvement de sang, de biopsies et de fluides sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés). Des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Le cas échéant, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Des échantillons biologiques produits dans ce projet seront partagés avec d'autres laboratoires afin de limiter plus généralement le recours au modèle PNH. Les animaux seront hébergés par paires avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

4054. L'objectif de notre équipe est de trouver une combinaison de drogues thérapeutiques capables d'inhiber la résistance naturelle des cellules souches leucémiques aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK). Depuis maintenant 15 ans, il existe un traitement efficace de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) qui consiste à utiliser des ITK. Les cellules leucémiques sont éliminées lors du traitement par l'inhibition de leur oncogène. Cependant à l'arrêt du traitement, qui peut avoir duré plusieurs années, une rechute est enregistrée pour la moitié des patients du fait d'une persistance des cellules souches leucémiques. Ces cellules souches sont en effet résistantes aux traitements aux ITK.

Nous avons deux drogues candidates qui en combinaison avec les ITK, permettraient d'éliminer les cellules souches leucémiques.

Nous avons montré in vitro que ces drogues avaient un effet additif avec les ITK dans les lignées cellulaires de LMC mais également des cellules souches plus immatures de patients LMC. On observe une inhibition de la croissance cellulaire ainsi

qu'une augmentation de l'apoptose dose dépendante. L'association des deux traitements visant des cibles différentes permet d'obtenir des effets significatifs. Ces résultats encourageants doivent être confirmés *in vivo* chez la souris avant d'envisager une possible utilisation chez l'homme de cette combinaison thérapeutique.

Nous étudierons donc dans ce projet l'effet de la combinaison de deux drogues avec un ITK sur la capacité de greffe des cellules primaires leucémiques implantées chez la souris. Une absence de greffe reflètera la disparition des cellules souches leucémiques due au traitement pré-greffe des cellules par les inhibiteurs.

Pour atteindre nos objectifs, et que les résultats soient statistiquement significatifs, nous avons besoin de 180 souris sur 2 années.

Seules les procédures expérimentales strictement nécessaires seront mises en œuvre. Les procédures de greffe et de prélèvements (sang) seront faites sur animaux analgésiés et anesthésiés.

Les cellules greffées à l'animal pourraient provoquer une leucémie. L'estimation de la souffrance animale sera réalisée par le personnel de l'animalerie. Les critères utilisés seront ceux de Lloyd et al. (Lab Animal 1998, pièce jointe). Le score limite est de 14. Au-delà l'animal sera euthanasié sans attendre.

4055. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent pathogène responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Selon la dernière estimation de l'OMS, plus de 34 millions de personnes vivent aujourd'hui avec le VIH et 2 millions de personnes sont nouvellement infectées chaque année. L'Afrique subsaharienne, région la plus touchée, concentre près de 70% de ces nouvelles infections dans le monde. En l'absence d'un vaccin préventif, développer des thérapies efficaces demeure une priorité pour limiter la propagation du virus en réduisant les réservoirs viraux chez les sujets infectés.

Ce projet s'inscrit dans le cadre de recherche visant à proposer de nouvelles approches thérapeutiques capable d'éradiquer le virus. Nos travaux, dans le passé, ont montré que l'infection des primates non humains (PNH) par le virus de l'immunodéficience simienne conduisait, comme l'infection de l'homme par le VIH, à une mort exacerbée des cellules du système immunitaire.

L'objectif de ce programme vise (i) à évaluer les mécanismes physiopathologiques de cette mort cellulaire et l'établissement des réservoirs viraux; (ii) à évaluer *in vivo* des molécules thérapeutiques inhibant cette mort cellulaire de manière à prévenir le déficit immunitaire, et permettre ainsi un contrôle de l'infection.

Le modèle choisi est le primate non humain (PNH). Ce modèle est à l'heure actuelle le seul modèle animal mimant l'infection par le VIH. De plus, ce modèle est le plus pertinent pour corrélérer les paramètres pharmacocinétiques des molécules thérapeutiques à ceux qui seront obtenus chez l'homme. Enfin, ce modèle est bien connu car il est étudié depuis plus de 25 ans pour comprendre la physiopathologie de l'infection par le VIH.

Le projet prévoit au maximum 54 animaux provenant d'élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administration des préparations médicamenteuses/prélèvements/inoculations virales sous anesthésie, limitation des volumes prélevés). Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés par paires avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

4056. La rétinopathie diabétique est une complication du diabète qui atteint l'œil au niveau de la rétine et serait la première cause de cécité avant 65 ans. Dans cette maladie, les capillaires sanguins de la rétine sont détériorés, ils perdent leur étanchéité ce qui induit des hémorragies et des exsudats qui lèsent la rétine. La maladie peut évoluer vers une rétinopathie proliférative avec production anormale de nouveaux vaisseaux peu fonctionnels, des décollements de la rétine et des saignements dans le vitré (substance remplissant l'intérieur de l'œil). Un œdème au niveau de la macula, zone de la rétine essentielle pour la bonne acuité visuelle, peut survenir à tout moment et entraîner la perte de la vision. L'excès de sucre et de ces dérivés dans le sang est impliqué dans ces complications.

Bien que chacun des modèles animaux du diabète ne reproduise pas l'ensemble des signes cliniques de la pathologie humaine, ils permettent de décortiquer les mécanismes impliqués dans la rétinopathie diabétique ou d'étudier de nouvelles cibles thérapeutiques. L'objectif du projet est la mise en place, au sein de l'établissement utilisateur, d'un modèle expérimental de rétinopathie diabétique chez le rongeur et le lapin afin de tester l'efficacité de traitements potentiels dans cette maladie.

Une stratégie pour reproduire l'excès de sucre dans le sang, utilisée et décrite dans la bibliographie consiste en l'injection d'un produit sucré chez l'animal.

Ce projet nécessitera au maximum sur 5 ans, 1510 rats, 1510 souris, 1510 lapins, âgés au début de l'étude de minimum 6 semaines pour les rongeurs et 12 semaines pour les lapins.

Afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux, un suivi quotidien des animaux sera effectué. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettront de limiter une éventuelle douleur à son minimum. Les animaux sont hébergés dans des cages de taille adaptée, un enrichissement est fourni pour améliorer le bien être de l'animal. Ce projet a été soumis et évalué par un comité d'éthique et sera suivi par la structure en charge du bien-être animal de l'établissement.

4057. Un des défis majeurs dans la recherche sur les maladies neurodégénératives aujourd'hui est de déceler et traiter la maladie le plus tôt possible. Les chercheurs sont d'accord que l'étude de facteurs génétiques identifiés chez des patients de maladies neurodégénératives permettra de mieux comprendre les stades précoces de ces maladies. Pour ce projet, nous émettons l'hypothèse que dans les maladies neurodégénératives, en particulier la maladie de Parkinson, les facteurs génétiques de ces maladies sont dérégulés et que cela a pour effet des changements dans des fonctions cellulaires essentielles qui causent à terme la neurodégénérescence. Dans cette étude, nous appliquerons des traitements pharmacologiques afin de disséquer les étapes moléculaires de voies de signalisation où interviennent des protéines de la maladie de Parkinson. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, nous étudierons exclusivement les aspects de la voie de signalisation de la maladie de Parkinson pour lesquels des données en culture cellulaire auront été obtenues. Les moyens mis en œuvre pour limiter la souffrance sont : manipulation des animaux dans un local différent du local d'hébergement, acclimatation des animaux de minimum 1 semaine avant l'expérimentation, hébergement des animaux standard en cages de maximum 4 souris ou 4 rats par cage.

Dans nos groupes expérimentaux, nous utiliserons des souris (Souris C57BL/6J de Janvier et de Charles River) et des rats sauvages (Rat Wistar RjHan:WI et Crl:WI, Rat Long Evans RjOrl:LE et Crl:LE), soit en condition basale soit suite à un traitement pharmacologique. Des séries de 12 souris ou rats seront utilisées par condition expérimentale, soit au total 1248 rats et 576 souris (1824 animaux au total). Des biofluides tels que l'urine et le sang seront prélevés ainsi que des tissus. Ces échantillons seront analysés au niveau moléculaire pour des niveaux d'expression de biomolécules, interactions protéine-protéine, des niveaux de phosphorylation ou activité d'enzymes en utilisant des techniques biochimiques ou histologiques. Ces données seront aussi exploitées afin d'établir le lien entre les voies de signalisation impliquant des facteurs génétiques de maladies neurodégénératives et des phénotypes de la maladie. Ce projet mènera à de nouveaux tests diagnostiques et de nouvelles stratégies thérapeutiques pour maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson.

4058. L'aliment des volailles pondeuses est conçu pour apporter les nutriments nécessaires aux besoins d'entretien et de production. Il se définit par un mélange de matières premières, additifs et minéraux. L'objectif de ce projet est d'évaluer les différents constituants des aliments d'une part, et d'autre part d'identifier les besoins des volailles pondeuses en fonction de leur stade de développement. Au total pour ce projet, 8640 animaux répartis sur 4 bandes (2160 animaux par bande) sont élevés en cages afin de pouvoir étudier les différentes parties d'un cycle de ponte à savoir : fin d'élevage, début de ponte, pic de ponte et fin de ponte. Les animaux sont logés dans des cages aux normes d'élevages, jusqu'à 20 par cage. Ce logement assure ainsi un résultat au plus près des besoins des animaux en condition d'élevage. Afin d'évaluer l'impact de la nutrition, les performances de ponte (taux de ponte, poids des œufs) et la consommation d'aliments sont relevés chaque semaine. Le poids des poules est également un facteur important évalué régulièrement en fonction de la thématique. D'autres critères sont mesurés : paramètres sanguins (120 animaux par bande) et composition corporelle (120 autres animaux par bande), les animaux étant gardés en vie, ou encore composition de certains tissus post mortem (120 animaux par bande). Le nombre de prises de sang est limité à 24 par animal jusqu'à 100 semaines d'âge. Par essai, 6 aliments sont comparés. Ce dispositif permet d'observer des différences statistiques entre les aliments testés avec un minimum d'animaux (360 animaux par aliment testé). Les volailles pondeuses sont conduites avec une alimentation à volonté ou sub-limitante. Les cages sont équipées d'un nid, de perchoir, d'une litière permettant le picotage et le grattage et d'un dispositif de raccourcissement des griffes, dispositif conforme aux normes d'élevage. 8121 animaux (94%) resteront dans la filière de consommation.

4059. Le projet vise à réaliser la preuve de concept d'une technologie innovante de capteurs de pouls carotidien permettant de couvrir les besoins liés à la réanimation cardiorespiratoire extrahospitalière. Il repose sur deux innovations technologiques, d'une part la réalisation d'une matrice de capteurs permettant l'amélioration du rapport signal sur bruit et d'autre part le recours à des capteurs souples s'adaptant mieux aux contraintes anatomiques inhérentes aux gestes de réanimation. Cette phase de maturation technologique permettant d'arriver à la preuve de concept préalable à un dépôt de brevet devra être supportée par un ensemble de tests réalisés sur un modèle animal.

En effet, la preuve de concept sera établie sous réserve que le signal correspondant au pouls carotidien puisse être détecté chez l'homme en mouvement. Cependant, nous devons également faire la preuve que le système est suffisamment discriminant pour détecter un pouls très faible, correspondant à une restauration du flux sanguin carotidien pendant le massage. Ainsi, la validation du système sur le modèle animal, permettant de faire varier de manière contrôlée la pression sanguine constitue une étape indispensable de la phase de maturation.

Le choix de la chèvre comme espèce animale repose sur deux arguments : (i) la nécessité d'avoir un cou long ou tout du moins comparable à celui de l'homme, (ii) l'existence d'un pouls carotidien facilement palpable.

Les expériences ont été prévues sur 5 chèvres maximum afin d'avoir des résultats reproductibles avec une robustesse dans les données de prise de signal des capteurs. La règle des 3R visant à réduire le nombre d'animaux à prévoir a donc été respectée. D'un autre côté, des mesures de raffinement sont prévues lors des procédures scientifiques faisant spécial attention au bien-être des animaux. Dans ce cadre, une surveillance étroite (quotidienne ou biquotidienne) des animaux est prévue. Une analgésie complémentaire sera également réalisée afin d'éviter une angoisse au souffrance lors des expériences scientifiques qui se dérouleront sous anesthésie gazeuse, qui facilitera un réveil et récupération plus rapide.

4060. La microchirurgie vasculaire est une technique chirurgicale qui consiste à anastomoser (brancher) des vaisseaux de petite taille entre eux afin d'assurer la vascularisation (apport en oxygène entre autre) d'un tissu. L'anastomose chirurgicale correspond à une suture circulaire au niveau de la paroi vasculaire (artère et/ou veine). La microchirurgie implique

l'utilisation d'un microscope. La suture doit être réalisée rapidement et correctement afin d'assurer la bonne perméabilité des vaisseaux et donc du flux sanguin. Cette technique est employée dans plusieurs spécialités chirurgicales comme la chirurgie plastique et reconstructrice, l'ORL, la chirurgie maxillo-faciale, l'orthopédie pour le traitement des pertes de substance consécutive à un cancer (sein, sphère ORL, peau, muscle...) ou un traumatisme.

Cette chirurgie exigeante nécessite une formation spécifique en plusieurs étapes. Le nombre d'heures nécessaires à l'apprentissage de la microchirurgie vasculaire a été estimé, grâce à des études, à 120 heures. La réussite d'un lambeau libre est souvent primordiale chez un patient (terrain fragile, longueur des procédures, nécessité de mise en route d'une radiothérapie urgente, risque septique majeur, pas d'autre alternative thérapeutique,...). Il est donc difficile dans ce contexte de former les jeunes chirurgiens spécialisés sur cette technique chirurgicale pourtant indispensable au quotidien. Un prérequis ex vivo puis in vivo chez l'animal est indispensable à la phase initiale. Différents travaux pédagogiques ont déjà souligné l'importance de cette étape.

L'objectif de ce projet est la formation in vivo à la technique d'anastomoses microchirurgicales vasculaires chez le rat dans le cadre de la formation à la microchirurgie. Les gestes réalisés, sous anesthésie générale, seront entre autres des sutures microchirurgicales vasculaires termino-terminales et ou termino-latérales des artères et veines fémorales, de la carotide, de la veine jugulaire externe, de l'artère de la queue de rat, de la veine cave, des artères et veines rénales, de l'aorte. En moyenne 15 rats seront nécessaires par étudiant et par année universitaire soit 600 rats pour la durée totale du protocole.

Afin de respecter le principe énoncé par Russell et Burch en 1959 des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) il a été décidé de réaliser deux formations initiales : une première sur simulateur (suture sur tube de silicone, et sur « task trainer simulator » [7]) et une deuxième consistant à un travail de dissection sur cadavre humain au laboratoire d'anatomie. Toutefois, la phase d'apprentissage sur l'animal est le seul moyen de réaliser ce geste en situation réelle. Afin de limiter le recours aux animaux plusieurs anastomoses pourront être réalisées sur un même animal au décours d'une ou plusieurs manipulations.

Afin d'assurer le bien être des animaux des points limites ont été établis aussi bien durant leur hébergement que durant les procédures.

4061. Ce projet a pour objectif d'étudier les effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires potentiels d'agonistes de certains récepteurs cholinergiques dans un modèle expérimental de neuroinflammation et plus particulièrement, d'élucider le mécanisme d'action de ces agonistes ainsi que leurs effets thérapeutiques. 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 dans la littérature pour cette espèce ainsi que de son gabarit et de sa robustesse.

Remplacement : 96 mâles adultes Wistar sont nécessaires à la totalité de cette étude préclinique. En effet, cette étude de caractérisation in vivo sur des rongeurs ne peut être substituée par une méthode alternative in vitro ou sur cellules. Il s'agit d'un essai pharmacologique qui doit être impérativement réalisé in vivo.

Cette étude comportera des groupes d'animaux lésés et recevant ou non des agonistes alpha7 nicotiques à différentes doses. Différents paramètres seront évalués dans ces groupes.

- Imagerie de la neuroinflammation
- Immunohistochimie in vitro

Ce protocole a déjà été réalisé pour évaluer 2 agonistes des récepteurs nicotiques chez 48 rats Wistar mâle. Au vu des résultats obtenus, nous souhaitons reproduire ce même protocole pour 4 nouveaux agonistes de ces récepteurs.

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

La douleur sera évaluée chaque jour en prenant en compte les critères suivants:

Hémorragie lors de la chirurgie, puis après la chirurgie, vocalisation, réduction de la mobilité, modification de la locomotion interférant avec la capacité d'abreuvement et la prise de nourriture.

Les rats seront traités pendant 5 jours (J0 à J4) avec deux injections par jour soit de l'agoniste soit du véhicule. L'étude des effets de ces agonistes sera réalisée par imagerie et immunohistochimie. L'utilisation de l'imagerie permet de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce protocole : les cerveaux des rats utilisés pour l'imagerie seront ensuite utilisés pour l'analyse par immunohistochimie. Par ailleurs, l'effectif de 96 rats (témoins inclus) correspond à l'effectif minimum pour pouvoir tester 4 agonistes.

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 et l'imagerie permettra de réduire l'effectif.

La durée de l'étude est évaluée à 3 ans.

4062. Les maladies de la valve aortique (orifice de sortie du cœur gauche) soulèvent des problèmes thérapeutiques difficiles chez l'enfant posés par la croissance. Aucune méthode chirurgicale pleinement satisfaisante n'existe actuellement permettant d'effectuer un remplacement de la valve aortique chez l'enfant. L'objet de cette recherche est de perfectionner l'opération de référence, dénommée, intervention de Ross, qui consiste à utiliser la valve pulmonaire (dont l'anatomie est très voisine de la valve aortique) transposée en position aortique. Celle-ci étant elle-même remplacée par une valve prélevée sur un donneur (homogreffe).

L'expérimentation vise à résoudre les 2 écueils connus de l'intervention de Ross :

- la dilatation de l'artère pulmonaire transposée,
- la détérioration de l'homogreffe mise en position pulmonaire (calcification).

Deux modifications de l'opération seront testées :

- d'une part le renforcement de l'artère pulmonaire à l'aide d'une prothèse semi-résorbable composite qui autorisera une croissance normale tout en prévenant l'évolution anévrysmale de la greffe
- d'autre part le traitement de l'homogreffe pulmonaire selon une méthode de conservation identique à celle utilisée en ophtalmologie pour les greffes de cornée (dite organo-culture) qui devrait permettre une meilleure longévité de cette homogreffe.

La recherche sera effectuée sur le mouton en croissance (âgé de 3 mois). Afin de prévenir les souffrances liées à l'opération, une anesthésie générale sera initiée par voie veineuse (propofol) puis maintenue par inhalation de gaz isoflurane jusqu'au réveil de l'animal. Un traitement analgésique et sédatif à base de morphine sera administré dans les 3 jours qui suivent l'opération après évaluation clinique des douleurs ressenties par l'animal.

Les dimensions de l'aorte seront évaluées par échographie au cours de l'opération initiale.

Après une période d'observation de 6 mois pendant laquelle le poids de l'animal aura doublé (aucun examen durant cette période), une nouvelle échographie sera réalisée sous anesthésie générale (même protocole que durant l'intervention initiale). L'animal sera alors sacrifié par injection intraveineuse de barbituriques et le segment d'artère pulmonaire greffé de même que l'homogreffe seront prélevés et analysés en microscopie optique.

Au total de 22 animaux seront opérés répartis en 2 fois 2 groupes selon

- 1) le type de matériau utilisé pour renforcer l'artère pulmonaire
- 2) le procédé de préservation de l'homogreffe : soit 4 combinaisons possibles et 4 groupes au total de 5 animaux chacun.

Le nombre de 5 animaux par groupe est le nombre minimal requis pour permettre une analyse statistique inter-groupe. Il n'existe aucune autre méthode que la chirurgie à cœur ouvert à l'heure actuelle pour atteindre l'objectif visé. Les animaux seront soumis à une anesthésie générale suivie d'une analgésie pendant la période postopératoire selon le protocole décrit en détail plus loin.

L'objectif de l'étude est double :

- 1) permettre une croissance normale de l'artère pulmonaire en position aortique, tout en prévenant une distension excessive de celle-ci,
- 2) éviter la survenue de calcification sur l'homogreffe en position artérielle pulmonaire.

4063. Il est maintenant bien établi que des lipides des membranes cellulaires appelés SLs, peuvent réguler des phénomènes essentiels tels que la croissance, la différenciation, la survie ou la mort cellulaire, mais aussi l'angiogenèse, le trafic lymphocytaire et la réponse immunitaire.

Notre projet a pour objectif général de clarifier le rôle de certains SLs simples dans des événements clés de la progression du mélanome: prolifération, résistance aux traitements anticancéreux, migration et dissémination et la réponse immunitaire anti-tumorale. Dans ce contexte, nous souhaitons aussi clarifier le rôle de la signalisation de récepteurs de mort cellulaire qui module non seulement la progression du mélanome et la réponse immunitaire anti-mélanome mais aussi le métabolisme sphingolipidique.

Ainsi, nos travaux visent à comprendre comment ces lipides et les récepteurs de mort cellulaire agissent pour favoriser ou freiner le développement du mélanome, et à proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques qui pourraient améliorer les résultats des traitements actuels. L'étude des sphingolipides et de la signalisation récepteurs de mort cellulaire nécessite l'utilisation de cellules et d'animaux génétiquement modifiés pour les enzymes de ce métabolisme. De plus, les modèles murins de cancer utilisés dans cette étude sont les seuls modèles disponibles aujourd'hui qui reproduisent les signes cliniques et histologiques de cancer observés chez l'Homme. Nous utiliserons des souris C56BL/6 sauvages ou génétiquement modifiées permettant le développement de tumeurs à partir de cellules murines transformées ou cancéreuses, et des souris immunodéficientes permettant le développement de tumeurs à partir de cellules d'origine humaine portant ou non des modifications génétiques.

- sexe : mâles et femelles

- âge : 6-16 semaines

- poids : 20-30g

- nombre de souris sur 5 ans environ 4 000 souris: Nombre de 6 animaux par condition expérimentale (suffisamment élevé pour études statistiques) 4 à 6 conditions par expériences (+/- traités par injection d'anticorps monoclonaux, +/- inhibiteurs pharmacologiques, +/- cellules cancéreuses génétiquement modifiées), 2 expériences indépendantes, tous les mois pendant 5 ans.

L'observation par les expérimentateurs et/ou le personnel zootechnique sera réalisée quotidiennement. La mesure du volume tumoral se fera tous les 2 à 3 jours, puis quotidiennement en fin de protocole. L'expérimentation sera interrompue en fonction de :

- la variation du poids corporel et du volume des tumeurs. Au-delà d'un volume tumoral supérieur à 10% du poids initial (tumeur d'environ 17 mm de diamètre), en cas d'ulcération de la tumeur, ou au-delà d'une perte de poids de 20%, l'expérimentation sera interrompue.

- La prise alimentaire et l'ingestion d'eau : Si les animaux ne peuvent plus se mouvoir pour atteindre leur nourriture ou leur boisson, ils seront euthanasiés.

- Le comportement général et l'apparence physique externe: en cas d'immobilité ou d'atonie ou bien de lésions cutanées et/ou d'envahissement par la tumeur en d'autres sites que le site d'implantation, entrainera la mise à mort par surdose d'anesthésie (isoflurane) puis dislocation cervicale. Les 3R seront respectés pour cette procédure.

4064. Ce projet porte sur l'étude de la fibrose cardiaque interstitielle qui se caractérise par une modification de la structure du tissu cardiaque qui devient plus rigide. Elle résulte de l'accumulation excessive de protéines comme le collagène et mène à des défauts de fonctionnement du cœur. Il existe à l'heure actuelle peu de méthodes permettant un diagnostic précoce et peu de traitements disponibles car les mécanismes menant à la fibrose sont peu connus.

L'objectif de notre projet est donc triple : caractériser les mécanismes mis en jeu dans la fibrose en se focalisant sur la maturation des fibres de collagène, évaluer de nouvelles techniques de diagnostic précoces non invasives (imagerie), et enfin évaluer les effets de nouveaux traitements.

La première étape sera donc de mettre en place un modèle animal présentant une fibrose cardiaque sur un faible nombre d'animaux. Pour cela une hypertension sera induite par 2 composés (L-NAME + angiotensine II) sur différentes durées pour s'assurer de la pathologie. 4 groupes de 5 rats seront utilisés (1 groupe sain et 3 groupes traités) soit 20 rats au total

La seconde étape permettra de mieux comprendre à quel niveau la maturation du collagène est perturbée dans cette pathologie et d'identifier la pertinence de nouvelles techniques d'imagerie dans la détection de la fibrose cardiaque. Pour cela, le modèle mis en place dans la 1ère étape sera utilisé et 2 groupes de 12 rats (1 groupe sain, 1 groupe traité) seront constitués soit 24 rats au total.

Le 3ème volet permettra d'étudier de nouveaux traitements dans un modèle validé de fibrose. Les traitements seront choisis grâce aux dysfonctions identifiées à l'étape précédente et à des tests in vitro préalables. Le suivi d'efficacité sera réalisé par imagerie. Trois études incluant 4 groupes de 12 rats sont planifiées soit 144 rats au total.

Pour la totalité du projet 188 rats seront donc nécessaires.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, en comparaison avec une étude classique qui nécessite la mise à mort des animaux à chaque point de temps examiné, l'imagerie est répétée à différents temps et permet de réduire le nombre d'animaux d'autant. De plus, le design choisi permettra d'éviter de multiplier les expérimentations identiques et de réaliser des validations successives. Le raffinement a été pris en compte : la totalité des procédures impliquant les animaux (chirurgie, imagerie) est réalisée sous anesthésie suivie d'un réveil sous lampe chauffante, ainsi que l'utilisation d'analgésique réduit l'inconfort potentiel à son minimum. L'étude du fonctionnement cardiaque rend la règle de remplacement difficilement applicable puisqu'il est nécessaire de l'étudier dans son environnement nerveux et hormonal.

4065. L'objectif du projet est la mise en place, au sein de l'établissement utilisateur, d'un modèle expérimental induisant une uvéite (inflammation intraoculaire) postérieure, au niveau de la rétine et de la choroïde par un mécanisme auto-immun.

Les uvéites sont des inflammations intraoculaires, pouvant représenter une réelle menace pour la vision des patients. Dans les pays occidentaux, l'incidence des uvéites serait de 17 à 52 cas pour 100 000 habitants par an. Chaque année, environ 17% des patients atteints d'uvéites actives présentent une diminution ou une perte de l'acuité visuelle. On distingue les uvéites d'origine infectieuse, les uvéites associées à une pathologie systémique ou limitée à l'œil d'origine immunologique. Bien souvent l'origine auto-immune est évoquée pour les uvéites pour lesquelles une origine infectieuse n'a pu être trouvée. Les pathologies humaines associées à une uvéite postérieure sont la maladie de Behçet, l'arthrite rhumatoïde juvénile, le syndrome de Reiter...

Ce projet a pour but de contribuer au développement de nouveaux traitements médicaux en permettant d'identifier et de tester l'efficacité de substances thérapeutiques visant à diminuer l'inflammation.

Compte tenu des particularités physiologiques et anatomiques de l'organe concerné et l'absence pour l'instant de modèle alternatif, nous devons avoir recours à des animaux pour établir notre modèle.

Les informations bibliographiques recueillies, les analyses statistiques ainsi que notre expérience, nous permettront de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés. Pour ce projet, un maximum de 1500 rats sur 5 ans âgés d'environ 8 semaines est prévu. Les études comporteront un groupe traité avec un placebo, un groupe traité avec une référence clinique et au moins un groupe traité avec la substance à tester.

Le modèle pourra durer jusqu'à 20 jours afin de pouvoir établir une élévation significative de l'inflammation.

L'inflammation apparaît entre 10 et 12 jours, dure quelques jours et se résorbe spontanément. L'évaluation de l'effet des produits à tester est basée sur un examen clinique en lampe à fente et par une évaluation histologique.

Afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux, un suivi quotidien des rongeurs sera effectué. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettant de limiter une éventuelle douleur à son minimum ainsi qu'un enrichissement des cages d'hébergement seront mis en place.

Ce projet a été soumis et évalué par un comité d'éthique et sera suivi par la structure de bien-être animal de l'établissement.

4066. Ce projet vise à étudier un facteur d'appétence (qui augmente l'appétit, le désir de manger) utilisé dans la nourriture pour chats. Le mécanisme d'action exact de ce facteur est pour l'heure inconnu.

Deux questions sont alors posées : 1/ ce facteur reste-t-il au niveau du tube digestif ou passe-t-il au niveau sanguin ? 2/ Où ce facteur va-t-il se localiser dans l'organisme ?

Pour répondre à ces questions, il est nécessaire d'ajouter à ce facteur d'appétence un « signal » qui permettra de le détecter. Le « signal » choisi est la radioactivité qui peut être suivie à de très faibles doses grâce à des techniques spécifiques comme le comptage gamma (compteur de radioactivité) ou l'imagerie scintigraphique (caméra qui détecte la radioactivité dans un organisme vivant).

Le rat réagit de la même façon que le chat au facteur d'appétence étudié, c'est donc cette espèce qui sera choisie.

Notre étude consistera donc à administrer par voie orale le facteur d'appétence muni de sa molécule signal à des rats et de le suivre 1/ dans le sang par prélèvements successifs et comptage gamma, 2/ dans l'organisme grâce à la scintigraphie.

Pour cette étude, 2 groupes de n= 3 rats seront utilisés (soit un total de n=6 rats), l'un recevant le signal seul, et l'autre le facteur d'appétence lié au signal. Lors d'une première étape, le passage dans le sang sera évalué par prélèvements sanguins successifs par dosage de la radioactivité sanguine. Les mêmes animaux seront ensuite réutilisés dans une 2ème étape à distance pour les scintigraphies qui seront répétées à 3 temps déterminés en fonction des résultats sanguins.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, la réduction puisque les mêmes animaux permettront de répondre successivement aux 2 questions posées. L'imagerie répétée à différents temps permet également de réduire le nombre d'animaux d'autant. Enfin, les prélèvements sanguins et imageries seront réalisés sous anesthésie suivie d'un réveil sous lampe chauffante afin de réduire l'inconfort potentiel à son minimum et participer au raffinement de l'étude. L'étude du devenir d'une molécule dans l'organisme rend la règle de remplacement difficilement applicable puisqu'il est nécessaire de l'étudier dans son contexte global avec une interaction entre les différents organes préservée.

4067. Lors de la mise au point de nouveaux médicaments, la réalisation de tests de toxicologie est nécessaire de manière à connaître l'effet du produit sur un organisme vivant, afin de pouvoir éliminer les substances qui seraient trop toxiques pour les patients. Les tests de toxicité sont obligatoires et imposés pour tous les candidats médicaments. Le recours à l'expérimentation animale pour ces tests est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable la réaction d'un organisme entier vivant suite à l'injection d'un nouveau composé. Ce comportement dépend de très nombreux facteurs tels que la voie d'injection, la dose et la fréquence d'injection, etc.

Ce projet va consister à réaliser des études de toxicité pour des produits injectés par doses répétées chez la souris : un modèle animal standard polyvalent largement décrit dans la littérature et accepté par les autorités règlementaires. Il s'agit d'un animal couramment employé en expérimentation animale, permettant ainsi d'une part de gérer plus facilement son bien-être au cours de l'étude et d'autre part de travailler sur des lots homogènes (âge et sexe fixés).

Lors de ce projet, l'imagerie médicale scanner (rayons X) sera utilisée. Cette technique présente l'avantage d'être non invasive (requiert seulement une légère anesthésie) et permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaire car tous les animaux seront conservés tout au long de l'étude.

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 hiérarchie établie; et en leur fournissant un enrichissement 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 traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés (injection de fluides / analgésiques, isolement, réchauffement, etc).

Une étude préliminaire sera réalisée en amont des études de toxicité de manière à valider la méthode d'analyse par imagerie scanner. Cette étude comportera au maximum 24 animaux.

Puis deux études de toxicité sont envisagées dans ce projet, utilisant chacune au maximum 104 animaux. Un total de 232 souris au maximum sera donc utilisé sur l'ensemble du projet.

4068. Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme et reste encore le plus mortel malgré des progrès thérapeutiques notables basés sur la chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. Ce cancer regroupe en fait plusieurs entités qui varient sur le plan clinique et biologique d'une patiente à l'autre notamment en terme de réponse à un traitement donné et de dissémination métastatique. Cette dernière est responsable de l'évolution défavorable de la maladie liée à l'apparition de métastases résistant aux traitements actuels. Améliorer l'efficacité des traitements nécessite de mieux comprendre la biologie des cellules tumorales pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et d'envisager une approche de thérapie personnalisée, c'est-à-dire adaptée à un patient donné.

Notre projet vise à modéliser l'évolution d'un cancer mammaire chez un hôte murin pour augmenter nos connaissances biologiques des cellules tumorales et tester l'efficacité de nouvelles molécules potentiellement antitumorales dans différents types de cancer du sein à un stade primaire (tumeur localisée au niveau mammaire) ou bien métastatique (cancer métastasé). Il se déroule après une étude préliminaire réalisée sur des cellules ou tissus tumoraux en culture pour évaluer la sensibilité ou résistance des cellules tumorales à un traitement donné et est une étape nécessaire, en tant que modèle préclinique, à l'utilisation en essais cliniques chez les patients de ces nouveaux traitements.

Il se déroulera en 3 phases :

1) Création des modèles murins de Xénogreffes Dérivées de Patients (ou PDX): Cette étape consiste à réaliser des greffes de fragments tumoraux de patientes atteintes de cancer du sein qui ont bénéficié d'une exérèse chirurgicale de leur tumeur, sur des souris immunodéprimées au niveau de leurs glandes mammaires. Ces modèles permettent de suivre l'évolution de la tumeur humaine sur la souris à la fois pour mieux comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents, identifier les cibles potentiellement intéressantes pour bloquer les processus de prolifération, dissémination, résistance aux traitements et enfin tester de nouveaux agents anticancéreux. Ils sont donc un atout majeur pour la recherche translationnelle en oncologie et la médecine personnalisée. Une fois que le greffon tumoral pousse sur la souris, une amplification et une caractérisation histologique, génomique et fonctionnelle incluant son potentiel métastatique ou angiogénique, sont évalués.

2) Sélection des modèles PDX et modélisation de la maladie résiduelle pour un traitement spécifique: Déterminer la sensibilité ou résistance à un traitement donné (agent de chimiothérapie conventionnelle ou molécules innovantes) d'un modèle PDX par rapport à son évolution en absence de traitement, est une étape essentielle. En effet, chaque modèle PDX est unique et sa réponse aux traitements est spécifique. Cette étape permet d'évaluer l'effet d'un traitement sur la tumeur primaire au niveau mammaire et aussi sur l'apparition de métastases. Elle permet également de modéliser la maladie tumorale résiduelle éventuelle qui correspond à la persistance de cellules tumorales après la phase initiale de traitement par un agent incomplètement efficace. Cette maladie résiduelle directement liée au risque de récurrence du cancer le plus fréquemment sous sa forme la plus dangereuse, c'est-à-dire, métastatique, est actuellement le problème majeur du traitement des cancers. Cette phase du projet permet de sélectionner le ou les PDX pertinents pour le traitement envisagé.

3) Etude de la maladie résiduelle après traitement de la tumeur : Les modèles PDX traités par un agent donné (conventionnel ou innovant) fourniront les cellules tumorales résistant à ce traitement pour une analyse biologique poussée et un support pour définir quel type de traitement permettra le contrôle de cette maladie résiduelle, c'est-à-dire son éradication ou son absence d'évolution vers des métastases létales.

Cette phase ultime du projet est essentielle pour améliorer le traitement des cancers du sein qui récidivent après la première ligne de traitement et qui évoluent alors de manière très péjorative entraînant à terme la mort des patientes.

Lors de notre projet nous tenons à respecter la règle des 3R : formation du personnel aux outils statistiques, utilisation de protocoles validés et robustes issus de la bibliographie, mutualisation des animaux et des techniques, enrichissement de l'habitat et gestion du stress et de la douleur des animaux et administration de traitements préalablement testés ex vivo.

Pour notre projet, en se basant sur le taux de prise de greffe le plus faible, 5430 animaux maximum seront nécessaires sur 5 ans. Ce taux de greffe pourra être divisé par 2 si le taux de greffe est maximal:

1) Création des modèles PDX : 480 souris

2) Sélection des modèles PDX : 450 souris

3) Etude de la maladie résiduelle : 4500 souris

4069. L'objectif de notre travail est d'évaluer l'efficacité et la tolérance d'un nouvel agent de contraste ultrasonore (X) pour l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) induite par ultrasons non focalisés. Pour cela, nous évaluerons la diffusion intra-cérébrale du bleu d'évans et les éventuels effets indésirables induits après ouverture de la BHE par ultrasons associés à l'agent X chez le lapin.

L'ouverture de la BHE reste un enjeu majeur dans le domaine de la neuro-oncologie puisque cette barrière physiologique, destinée à la protection cérébrale, limite le passage intra-cérébral des drogues antinéoplasiques destinées au traitement des tumeurs cérébrales. Il a été montré qu'il était possible d'ouvrir cette barrière temporairement et à moindre risque par l'application d'ultrasons à faible puissance, associés à un agent de contraste ultrasonore (microbulles injectées par voie veineuse), permettant ainsi d'optimiser le passage intra-cérébral de drogues utilisées en pratique clinique. Un nouvel agent de contraste ultrasonore a récemment été développé spécialement pour les applications thérapeutiques, avec des caractéristiques physiques qui pourraient permettre une ouverture de BHE plus homogène, plus longue, et à moindre risque. Une évaluation préliminaire de cet agent chez l'animal est indispensable avant d'envisager son utilisation chez l'homme.

De nombreuses études ont déjà évalué l'ouverture de la BHE par les ultrasons chez le lapin, en faisant un modèle animal idéal pour le travail en cours.

L'étude portera sur un total de 34 lapins au maximum.

L'ensemble des procédures, y compris d'imagerie IRM, seront réalisées sous anesthésie générale. Il est prévu des injections supplémentaires d'anesthésiant dès les premiers signes de réveil éventuels de l'animal. Nous nous attacherons à limiter la souffrance animale par l'administration systématique d'antalgiques locaux et généraux aux différentes étapes de la procédure. Le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de l'étude a été judicieusement pensé de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux sacrifiés.

En outre, un protocole « progressif », avec des analyses intermédiaires, permettra d'évaluer en cours de protocole la possibilité de réduire le nombre d'animaux dans l'étude.

A terme, les résultats de cette étude permettront d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de ce nouvel agent de contraste ultrasonore. Ils permettront de déterminer la concentration utile à l'ouverture de la BHE en vue de l'utilisation de l'agent de contraste X en pratique clinique courante chez l'homme.

4070. Les glioblastomes sont les tumeurs primitives du système nerveux central les plus fréquentes chez l'adulte. Les traitements incluant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie sont restreints et ces tumeurs demeurent incurables, avec une courbe de survie inférieure à 15 mois.

Il est aujourd'hui admis que les cellules souches de gliomes (GiCs) sont responsables du développement de la tumeur, de sa progression et des récurrences. Fortement hétérogènes, les glioblastomes se composent d'une part, de territoires enrichis en cellules souches qui se multiplient activement et sont insensibles aux traitements, et d'autre part de zones différenciées, non proliférantes et sensibles aux chimiothérapies.

Notre objectif est de contribuer à l'élaboration de nouvelles thérapies anti-cancéreuses efficaces en identifiant des facteurs capables de bloquer les propriétés souches des GiCs et de les conduire vers un état plus différencié non proliférant pour inhiber la tumorigénèse.

Pour cela, nous avons criblé une collection de composés chimiques in vitro puis dans un modèle 3D substitutif qui permet de réduire le nombre de sujet utiles lors de la phase d'expérimentation animale. Ainsi, nous avons identifié trois composés

présentant un intérêt thérapeutique réel puisqu'ils sont capables d'inhiber la prolifération des GiCs, de stimuler leur différenciation et d'augmenter leur sensibilité au témozolomide, la chimiothérapie de référence pour le glioblastome. Les tests de toxicité ont montré qu'aucun de ces composés n'induit la mort de cellules normales humaines souches et adultes aux doses efficaces sur les GiCs.

Ce programme a pour objectif d'évaluer le potentiel inhibiteur d'un des composés sélectionnés, le DVXX, sur le développement de glioblastome chez la souris. Pour cela, les GiCs traitées et contrôles seront greffées dans le cerveau des souris immunodéprimées à l'aide d'un cadre stéréotaxique. Afin de déterminer le spectre d'activité du composé nous utiliserons trois cultures de GiCs provenant de patients différents. Les GiCs rendues luminescentes permettront d'évaluer le développement tumoral à l'aide d'un dispositif d'imagerie qui permet de réduire sensiblement le nombre d'animaux sans affecter la quantité de mesures. Les animaux restent vivants jusqu'au terme de l'expérience (26 semaines) ou jusqu'à l'apparition de signes cliniques critiques établis selon une grille de score garantissant la prévention de la souffrance animale. Afin de déterminer la meilleure efficacité, le composé sera utilisé à deux concentrations différentes. Les hypothèses statistiques que nous avons formulées pour obtenir des résultats significatifs indiquent que 10 animaux seront nécessaires par condition expérimentale. Au total ce projet nécessitera 95 souris qui seront hébergés par trois ou quatre dans des cages comportant des objets à ronger et des igloos pour se faire un nid de façon à garantir leur bien-être et leur permettre d'exercer les activités spécifiques à leur espèce.

Les résultats permettront de déterminer l'efficacité et le spectre d'activité de ce composé sur la croissance de tumeurs gliales. Ces expériences sont un préalable au développement pré-clinique plus poussé et clinique d'un médicament. De plus, l'étude du mécanisme d'action de ces composés éclairera sur les mécanismes moléculaires de la biogenèse du glioblastome, encore très peu connus.

4071. Les anti-TNF sont des thérapies ciblées (inhibition du TNF, une molécule pro-inflammatoire) qui ont révolutionné la prise en charge des maladies inflammatoires, la polyarthrite rhumatoïde (PR) notamment. Cependant, les patients peuvent s'immuniser contre ces traitements ce qui s'accompagne d'une perte d'efficacité.

Au cours de la PR, les anti-TNF sont systématiquement prescrits en association avec le méthotrexate (MTX). Le MTX constitue le traitement de 1^{ère} ligne des PR. Il a été clairement montré que le MTX utilisé en association avec les anti-TNF diminuait le risque d'immunisation contre les anti-TNF bien que le mécanisme impliqué ne soit pas compris.

Des travaux menés chez la souris apportent des éléments de réponse. Ils visent à diminuer l'immunogénicité face à des traitements par des enzymes qui sont défectueuses dans certaines maladies génétiques exceptionnelles. Il est montré qu'un traitement bref par MTX lors de l'initiation du traitement substitutif par les enzymes de remplacement permettait de prévenir sur le long terme l'apparition d'ADAb. Cependant, la façon dont agit le MTX n'est pas comprise.

Notre projet vise à étudier sur quelle(s) étapes de l'immunisation agit le MTX afin de comprendre comment ce schéma thérapeutique pourrait être appliqué à l'homme pour réduire l'immunisation anti biomédicament. L'objectif principal sera d'évaluer l'effet du MTX sur l'immunisation. L'objectif secondaire sera d'évaluer l'impact du MTX sur les différentes populations du système immunitaire.

Ce projet s'appuiera sur l'étude de 40 animaux, effectif basé sur les observations faites avec les enzymes de remplacement. Ce chiffre devrait permettre de détecter des différences significatives en termes d'incidence d'immunisation. L'étude durera 5 semaines ce qui correspond au délai d'immunisation attendu dans les modèles étudiés. L'immunisation sera effectuée par injection intra péritonéale, procédure ne s'accompagnant pas de signe de souffrance habituellement. Tout animal présentant des signes de souffrance (apathie, perte de poids) au cours de la période d'étude sera sacrifié. Tout acte de prélèvement sur l'animal sera fait après anesthésie afin de réduire la souffrance.

4072. Chez les oiseaux, les souches d'*Escherichia coli* pathogènes engendrent différentes pathologies, toutes extra-intestinales, et notamment une infection systémique à point de départ respiratoire qui peut conduire à la mort de l'animal. Cette forme de colibacillose respiratoire est particulièrement observée chez les animaux âgés de 3 à 10 semaines. On assiste également depuis quelques années à une forte recrudescence de problèmes de mortalité des poussins au démarrage puis de cellulite, pododermatite, arthrite et ovarite chez les animaux plus âgés. La colibacillose aviaire affecte donc tous les niveaux de la chaîne de production (mortalité, retard de croissance, déclasserement des carcasses, chute de ponte) et est la première cause de pertes économiques d'origine bactérienne dans les élevages.

Les souches d'*E. coli* pathogènes aviaires présentent une grande diversité. Elles appartiennent à différents sérogroupes et possèdent un arsenal variable de facteurs de virulence. Il en découle que leur diagnostic reste difficile et que les 2 vaccins actuellement disponibles n'offrent qu'une protection partielle. Le développement de la maladie et les réponses de l'hôte à l'infection restent quant à eux mal connues. Le traitement de la colibacillose aviaire repose donc essentiellement sur l'antibiothérapie, favorisant l'émergence de souches résistantes. Par ailleurs, la sélection des animaux pour améliorer les performances de production (croissance, ponte) et d'efficacité alimentaire ainsi que l'évolution des pratiques d'élevage visant à améliorer le bien-être et la santé animale et à réduire les intrants médicamenteux font craindre, avec le retour/intensification de l'élevage au sol ou en plein air, une explosion des pathologies, et notamment un surcroît de colibacillose.

Dans ce contexte, il est plus que jamais important d'améliorer les connaissances sur la colibacillose aviaire afin de pouvoir proposer des solutions efficaces aux éleveurs. Cette amélioration des connaissances, tant du point de vue du pathogène que de celui de l'hôte, nécessite le recours à des expérimentations de reproduction de la colibacillose aviaire, objet de la présente demande.

Dans ce modèle, les poulets sont infectés avec des souches pathogènes d'E. coli et euthanasiés à différents temps post-inoculation. Les lésions macroscopiques sont notées et les organes d'intérêts prélevés pour analyses (bactériologiques, histologiques, réponse inflammatoire).

Ces expérimentations répondent aux exigences de la règle des 3 R :

Remplacement : Le développement d'une maladie infectieuse telle que la colibacillose résulte d'un ensemble complexe de paramètres qu'il est impossible de remplacer par des approches in vitro.

Réduction : Le nombre d'animaux par lot (5 ou 20) est adapté aux buts de l'expérimentation et permet l'exploitation statistique des résultats. Sur 5 ans, le nombre d'animaux utilisés sera au maximum de 1300.

Raffinement : Les animaux sont maintenus dans des cages ou des isoteurs adaptés en nombre et en taille, dans des conditions environnementales contrôlées, avec nourriture et boisson à volonté. Ils bénéficient d'un enrichissement social et comportemental.

4073. Les réseaux de neurones impliqués dans la régulation de la balance énergétique ont fait l'objet d'intenses efforts de recherche ces deux dernières décennies. En revanche, la contribution des cellules astrocytaires dans cette régulation a été jusqu'ici peu étudiée. Les astrocytes sont connus pour communiquer entre eux via des canaux intercellulaires formés de protéines membranaires appelées connexines 43 (Cx43). Les connexines peuvent également former des hémicanaux permettant aux astrocytes d'émettre des messages chimiques vers les neurones. Notre étude vise à tester une hypothèse selon laquelle le blocage des hémicanaux astrocytaires formés de Cx43 se traduirait par une perturbation de la balance énergétique. Nous procéderons pour cela à l'analyse de l'expression du gène de la Cx43 lors de déséquilibres nutritionnels (jeûne, obésité). Nous étudierons ensuite les effets du blocage in vivo de l'ouverture des hémicanaux Cx43, sur la prise alimentaire, sur la régulation glycémique et sur les dépenses énergétiques mesurées par calorimétrie indirecte. En complément, les neurones activés en réponse au blocage des hémicanaux Cx43 seront identifiés par une approche de neuroanatomie fonctionnelle. Ce projet nécessite 120 souris mâles C57BL6, ainsi que 16 souris mâles génétiquement modifiées, exprimant la Green Fluorescent Protein dans les neurones à ProOpiMelanocortine (POMC-GFP). La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole : - Raffinement : le modèle animal qui sera utilisé est parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les paramètres physiologiques ou pathologiques impliqués dans la régulation de la balance énergétique. Le protocole a été planifié de sorte à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages collectives autant que possible (2 à 4 animaux par cage), avec un enrichissement du milieu à base de coton et cellulose (Cellulose Diamond Twist, Harlan). Pour les animaux équipés d'une canule chronique, l'hébergement en cage individuelle est rendu indispensable en raison des risques de blessures liées au grooming social. Néanmoins, les cages seront disposées côte à côte pour permettre les échanges visuels et olfactifs entre congénères. La chirurgie d'implantation de canule icv sera réalisée sous anesthésie générale et contrôle stéréotaxique, avec un traitement antalgique et anti-inflammatoire au Rimadyl en pré- et post-opératoire. Par ailleurs, l'évaluation de la souffrance sera basée sur un suivi journalier (attitude corporelle, aspect du pelage, examen de la suture, poids corporel) ainsi qu'un suivi bi-hebdomadaire de la prise alimentaire de sorte à administrer un traitement anti-inflammatoire/antalgique supplémentaire, ou sortir un animal de l'étude en cas d'atteinte des points limites établis. - Réduction : le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience précédemment acquise sur l'analyse des paramètres d'intérêt, de façon à être en mesure de mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre groupes. - Remplacement : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un traitement sur la régulation de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques de l'organisme.

4074. Dans le cadre du diagnostic, de la prévention et du traitement des maladies humaines et animales, la recherche de nouveaux médicaments apportant une meilleure sécurité d'emploi, une efficacité accrue ou tout autre avantage thérapeutique reste essentielle. Compte tenu de la complexité des organismes visés par cette recherche, il n'existe pas à ce jour de méthode alternative fiable au recours à l'animal. Dans un souci de protection de la santé publique, la loi exige que l'innocuité des candidats médicaments soit évaluée lors d'études précliniques chez une espèce rongeur et une espèce non-rongeur. Ces études doivent en outre être conduites en respectant les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) qui garantissent leurs qualité et intégrité. Elles sont à ce titre l'objet d'inspections réglementaires spécifiques et sont destinées à être soumises à différentes autorités réglementaires à diverses étapes du développement de médicament.

Ce projet couvre les études réglementaires de toxicologie et de toxicocinétique telles que définies ci-dessus et réalisées chez le miniporc. Des études d'efficacité, de pharmacologie, d'interaction entre médicaments ou à des visées plus mécanistiques (biomarqueurs) permettant de comprendre et prédire les effets toxiques sont aussi couvertes par cette demande. De même que l'utilisation de miniporcs dans des études visant l'acquisition et le maintien des compétences techniques par le personnel assurant l'application des procédures expérimentales aux animaux, le développement de techniques et/ou de méthodes, la validation d'équipements et/ou la génération de données historiques. Certaines de ces études peuvent en outre viser de raffiner et de réduire le recours à l'animal, voire de le remplacer dans l'avenir. Le nombre total d'animaux couverts par ce projet est 500 sur une période de 5 ans.

La composition, le contenu et le déroulement des études réglementaires couvertes par ce projet sont précisées dans des lignes directrices internationales (OCDE, ICH, VICH...) afin d'obtenir les résultats les plus fiables et scientifiquement pertinents tout en garantissant les plus hauts standards en matière de qualité, bien-être animal, et d'éthique (remplacement, réduction, et raffinement). A ce titre, celles-ci requièrent :

- des animaux autres que rongeurs (miniporcs en général de lignée Göttingen, ici) des 2 sexes, d'environ 2 à 8 mois d'âge (et donc d'un poids approximatif entre 5 et 15 kg)
- un nombre minimal d'animaux (3 animaux/sexe/groupe et 4 groupes, soit en général 24, ou pour des besoins spécifiques justifiés, jusqu'à 40),
- une durée (de un jour à un an),
- et des procédures (administration du candidat médicament, observations et examens réguliers, suivi médical individuel, et examens terminaux).

Les études réglementaires sont réalisées séquentiellement afin d'obtenir toutes les informations scientifiques nécessaires tout en minimisant les dommages pour les animaux ; de fait, la plupart des animaux des premières études, réalisées sur la base d'informations très limitées, auront des effets légers à modérés, et un très faible nombre d'entre eux pourra avoir des effets substantiels. Dans les études suivantes, ceux-ci ne devraient avoir pas d'effets ou seulement avoir des effets légers à modérés. Des effets sporadiques, généralement légers et transitoires, peuvent aussi être observés du fait des propriétés pharmacologiques du candidat médicament.

Une attention particulière est apportée aux exigences de remplacement, réduction et raffinement tout au long des études, depuis leur conception jusqu'aux données présentées aux agences afin de conduire les essais cliniques chez l'homme.

4075. La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative entraînant notamment d'importants troubles moteurs, et qui touche près de 6,5 millions de personnes dans le monde. Aujourd'hui 1 Français sur 5, de 60 ans ou plus, est atteint par cette maladie chronique, qui affecte le système dopaminergique. En 2050 ce sera 1 Français sur 3. Les traitements pharmacologiques actuels permettent d'atténuer les symptômes, mais n'ont aucun effet curatif, ne permettent pas de ralentir le développement de la pathologie, entraînent des effets secondaires très gênants et leurs effets s'amenuisent au cours de l'évolution de la maladie. La stimulation cérébrale profonde, intervenant essentiellement à un stade avancé de la maladie de Parkinson, a également une action uniquement symptomatique. En conséquence, la neuroprotection dans la maladie de Parkinson est une piste importante de recherche, afin d'enrayer ou de ralentir la dégénérescence des neurones dopaminergiques.

De récentes études ont démontré l'effet neuroprotecteur de l'illumination proche infra-rouge (NIR) sur des cultures cellulaires ainsi que sur des modèles précliniques exposés à une neurotoxine (induisant la mort des neurones dopaminergiques et donc conduisant au développement de symptômes similaires à ceux de la maladie de Parkinson idiopathique). Notamment, les résultats démontrent que l'illumination NIR atténue les symptômes en améliorant les performances motrices, mais aussi préserve les neurones dopaminergiques.

L'objectif de cette étude est d'évaluer à long terme, la durabilité et la fonctionnalité d'un nouvel implant permettant l'illumination NIR, afin de soutenir une application clinique imminente. Un modèle alternatif ex vivo, n'existant pas, le projet prévoit le recours à un minimum nécessaire de 5 primates, provenant d'élevages reconnus, afin d'assurer la validité des résultats. Le modèle primate sera utilisé en raison de ses similitudes anatomiques fortes avec l'Homme, permettant une extrapolation aux conditions d'utilisation de l'implant en pratique clinique. Les protocoles d'anesthésie ont été définis et validés par le vétérinaire de l'installation et les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance ou douleur lors des interventions sur les animaux. L'application de critère d'arrêts et le suivi quotidien des animaux assurent leur bien-être. Les études menées précédemment au laboratoire, nous laissent penser que le comportement et le bien-être des primates ne seront pas affectés par la mise en place de l'implant NIR. Cependant, en cas d'effets inattendus, telle que la perte de poids importante ou le rejet de l'implant, le vétérinaire en charge du bien-être des animaux sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie anticipée.

4076. Le surpoids, également appelé obésité, conduit souvent au développement d'une insulino-résistance qui peut évoluer en diabète de type 2. La prévalence de l'obésité et des pathologies associées (diabète de type 2, complications vasculaires, pulmonaires, digestives, etc) a atteint des proportions d'épidémie mondiale et il est prévu que le nombre de personnes obèses doublera dans certains pays dans la décennie à venir. Il est donc d'une nécessité capitale de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour vaincre les pathologies associées à l'obésité. Ces dix dernières années, les recherches ont montré que l'obésité s'accompagne d'un état inflammatoire chronique de bas grade qui se caractérise par une augmentation de l'inflammation dans le tissu adipeux des sujets obèses. Cette inflammation contribue au développement des pathologies associées à l'obésité. Dans ce contexte, il a été récemment montré que les lymphocytes T, cellules clés de la réponse immunitaire, jouent un rôle important dans les phénomènes inflammatoires induits par l'obésité. L'objectif de notre projet est d'étudier le rôle d'un récepteur nucléaire appelé Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta (PPAR β) dans la biologie des lymphocytes T, dans le contexte de l'inflammation associée à l'obésité et au diabète de type 2. L'étude de ces pathologies multifactorielles nécessite l'utilisation de modèles animaux, qui sont les seuls moyens de reproduire des modèles de pathologies dont l'obésité. PPAR β joue un rôle important dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques dont le métabolisme énergétique, l'immunité et l'inflammation (rôle anti-inflammatoire). De plus, nos résultats préliminaires montrent que l'augmentation de la quantité de PPAR β spécifiquement dans les lymphocytes T diminue leur nombre et change la proportion des différentes sous-populations de ces lymphocytes. Basée sur l'ensemble de ces données, notre hypothèse est que la modulation de PPAR β dans les lymphocytes T aura des conséquences sur l'état inflammatoire du tissu adipeux et de l'intestin en particulier. Les changements au sein de ces tissus auront à leur tour un impact sur le développement de l'obésité et du diabète de type 2 qui lui est associé. Notre étude portera donc sur différents modèles murins génétiquement modifiés dans lesquels le facteur PPAR β est, soit augmenté (forme sauvage ou mutée), soit absent de façon spécifique dans les

lymphocytes T. Les lignées génétiquement modifiées qui seront produites ne devraient pas développer de dommage pour les animaux. Toutefois nous réaliserons un suivi des élevages pour détecter tout dommage imprévu et intervenir pour soulager/abrèger toute souffrance. Nous étudierons la biologie des lymphocytes T dans ces différentes conditions et déterminerons comment l'augmentation ou l'absence de PPAR β affectent leurs fonctions. Nous projeterons ensuite de soumettre ces différentes souris à un régime riche en graisses afin de les rendre obèses. Nous mesurerons leur prise alimentaire, leur prise de poids, leur état inflammatoire et nous évaluerons leurs paramètres métaboliques grâce à des systèmes non invasifs (exemple : cages métaboliques). Pour toutes ces études nous utiliserons des souris mâles (type C57BL6), car il est connu que les souris femelles sont moins susceptibles de développer une insulino-résistance suite à un régime riche en gras. Dans un souci de réduction, les souris femelles issues des croisements des différents élevages seront utilisées pour étudier les lymphocytes T primaires in vitro, ainsi que pour la mise au point de certaines techniques. Quand cela sera possible (exemple : étude détaillée des mécanismes moléculaires), nous remplacerons les animaux par des lignées de cellules lymphocytaires dans lesquelles le facteur PPAR β est augmenté ou absent. Pour satisfaire au raffinement, le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape de l'expérimentation. Les souris seront suivies quotidiennement par les animaliers et régulièrement par les expérimentateurs afin de détecter au plus tôt tout signe de souffrance et d'y remédier. Sauf exception, les souris seront hébergées en groupe de 3 à 5 dans des cages avec un milieu enrichi (tige de papier et igloo). Nous estimons que le nombre de souris nécessaire pour mener à bien ce projet et obtenir des résultats statistiquement significatifs, en tenant compte de la règle des 3R, est de 384. Nous espérons que ces travaux permettront de mieux comprendre le rôle des lymphocytes T et leur fonctionnement dans le contexte de l'inflammation associée à l'obésité et à l'insulino-résistance. De plus, nos résultats pourraient conduire à l'élaboration de futures stratégies thérapeutiques pour le traitement des pathologies associées à l'obésité.

4077. Ce projet a pour objectif d'évaluer l'immunogénicité et l'innocuité de candidats vaccins développés en traitements prophylactiques et/ou thérapeutiques de maladies infectieuses, chez le primate non humain (PNH).

L'évaluation de l'immunogénicité sur animaux est l'une des méthodes décrites pour démontrer l'efficacité préclinique des candidats vaccins avant d'envisager des études cliniques chez l'homme. Les essais d'immunogénicité permettent d'évaluer le bénéfice de différentes préparations vaccinales, d'identifier les composants nécessaires à la formulation vaccinale, d'évaluer les nouvelles voies d'administration ou les nouvelles formes pharmaceutiques qui permettent d'améliorer la performance du vaccin. Ces études permettent également de comprendre le mécanisme d'action des candidats vaccins. Un test d'immunogénicité consiste à administrer à des animaux un candidat vaccin, à les héberger pendant la période nécessaire à l'obtention d'une réponse immunitaire, puis à recueillir du sang, des fluides corporels et/ou des organes afin d'analyser, par des méthodes in-vitro, la réponse immune humorale et/ou cellulaire. Ces différentes données précliniques sont un préalable aux essais cliniques et à l'enregistrement du candidat vaccin et seront incluses dans les différents dossiers réglementaires.

Aucun signe clinique n'est attendu, les souches évaluées étant des souches atténuées ayant été évaluées dans des modèles de petits animaux. A ce stade de l'évaluation ces nouvelles souches présentent le même profil d'atténuation que les souches vaccinales de références (incluses en contrôle dans ce test). Ces souches vaccinales de référence n'induisent pas de dommage chez le singe d'après nos données historiques et d'après la littérature.

Les espèces utilisées pour ce projet sont le macaque cynomolgus et le macaque rhesus. Le modèle animal utilisé est sélectionné en fonction de la maladie infectieuse ciblée, du type de réponse immune analysée et des données de la littérature ou des connaissances scientifiques.

Il est estimé qu'au cours de ce projet d'une durée de 5 ans, 400 macaques seront nécessaires, à raison de 2-3 études d'immunogénicité par an sur 30 à 40 singes/étude (5 groupes de 6 à 8 singes/groupe).

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Des essais in-vitro sur cellules animales ou humaines sont également utilisés pour évaluer l'immunogénicité. Ils apportent des données complémentaires mais, à ce jour, ne peuvent se substituer aux essais in-vivo. Un travail de développement de technique in-vitro sur des systèmes 3D d'hépatocytes et neurones humains est réalisé pour comparer les effets des nouvelles souches. Mise au point également de modèle petits animaux (souris A129) pour étudier le viscérotropisme et le neurotropisme des souches pathogènes, comme celles de la fièvre jaune. Les études singes sont réalisées en dernier recours.

Réduction :

Chaque animal sera son propre contrôle ce qui permettra d'avoir une puissance statistique avec un nombre limité d'animaux par groupe.

Raffinement :

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des dispositifs d'enrichissement dans des locaux appropriés, conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé. L'inclusion de paramètres hématologiques et biochimiques pour le suivi clinique, l'inclusion de prélèvement de fluides pour le suivi du viscérotropisme et du neurotropisme permettront de voir s'il est possible d'éviter par la suite les prélèvements d'organes pour les charges virales.

4078. L'amyotrophie spinale est une maladie neurodégénérative très sévère caractérisée par la dégénérescence des neurones moteurs de la moelle épinière et du tronc cérébral entraînant une faiblesse et une hypotonie généralisée des muscles squelettiques. Cette pathologie affecte 1 naissance sur 10 000, n'a aucun traitement et est la première cause de mortalité infantile liée à une maladie génétique. Elle est due à des mutations dans le gène SMN1 qui code pour une protéine de survie du

motoneurone, la SMN. Il existe 5 formes cliniques de la maladie selon le degré de sévérité (amyotrophie spinale de type 0, I à IV, de la plus grave à la moins sévère).

4079. Afin de réaliser des essais thérapeutiques pré-cliniques, nous allons utiliser le modèle murin *Smn2B/-* : ce modèle est atteint d'une amyotrophie spinale moins sévère (type II) et une durée de vie relative allongée par rapport à d'autres (souris, cochons, chats) qui ont tous une pathologie plus sévère et une durée de vie très limitée. Notre projet vise à développer une nouvelle stratégie thérapeutique pour l'amyotrophie spinale en apportant, à l'aide de vecteurs AAV (dérivés de virus associés à l'adénovirus), le gène humain SMN1 chez le modèle murin *Smn2B/-*.

La stratégie d'expérimentation consiste en trois procédures :

1) Génération d'un modèle murin d'amyotrophie spinale *Smn2B/-*.

2) Sélection d'un vecteur de thérapie génique chez des souris C57Bl/6.

3) Administration d'un vecteur de thérapie génique chez le modèle animal d'amyotrophie spinale *Smn2B/-*.

Afin de prendre en compte le bien-être des animaux, nous avons conçu les procédures expérimentales en respectant la règle des 3 R :

-Réduction : certains souris issues des croisements mais ne présentant pas de pathologie seront utilisées pour les croisements nécessaires au maintien de l'élevage. L'amyotrophie spinale affecte indifféremment les hommes et les femmes : des souris des deux sexes seront donc utilisées. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés par groupe, le nombre de souris nécessaire a été estimé à 10 souris par groupe par une étude statistiques prédictive (test de comparaison des moyennes).

-Remplacement : il n'existe pas de moyen de remplacer l'utilisation d'animaux pour l'étude de cette pathologie, car bien que des modèles cellulaires de motoneurons déficients en SMN existent, ils ne permettent pas d'étudier certains défauts fonctionnels majeurs de la pathologie, tels que la dégénérescence de la jonction neuromusculaire, événement précoce essentiel dans la progression de la pathologie. A l'opposé, le modèle murin utilisé ici reproduit avec fidélité l'ensemble des symptômes (dégénérescence neuronale, faiblesse musculaire, réduction de l'espérance de vie) et nous permettra de suivre l'évolution de la maladie après le traitement.

-Raffinement : pour la sélection du vecteur de thérapie génique, nous allons utiliser des souris C57Bl/6 (procédure n°2). Pour les souris malades présentant un défaut de motricité, un aliment spécifique hydratant et nourrissant sera placé au sol dans la cage afin de leur en faciliter l'accès (procédures n°3).

Notre projet durera 3 ans et nécessitera l'utilisation totale de 868 souris.

4080. Historiquement, notre équipe s'est d'abord intéressée aux mécanismes moléculaires contrôlant le développement du système nerveux. Nous utilisons l'embryon de poisson zèbre comme modèle et plus particulièrement la glande pinéale, une structure photosensible localisée dans le diencephale. Nous souhaitons maintenant comprendre le rôle des différents photorécepteurs de la glande pinéale dans le contrôle de l'activité locomotrice. En effet, différents travaux suggèrent que cette activité est contrôlée à la fois par les conditions d'illumination et le rythme circadien. La glande pinéale est un acteur clé de la régulation circadienne à travers la sécrétion de la mélatonine qui agit comme 'signal nocturne'. Le poisson zèbre est un modèle reconnu et validé pour l'étude du comportement animal. Il s'agit de plus d'une espèce diurne et donc potentiellement plus pertinente à étudier que les rongeurs qui sont des modèles nocturnes. Un autre avantage est la possibilité d'analyser simultanément l'activité locomotrice de 24 larves de poisson zèbre placées dans une plaque, elle-même placée dans un dispositif appelé 'ZebraBox' permettant de filmer ces larves de jour et de nuit.

Nous portons une attention particulière à la réduction du nombre de poissons hébergés au laboratoire ainsi que des larves utilisées pour l'expérimentation et veillons donc à faire évoluer nos techniques expérimentales en conséquence. Les poissons adultes sont conservés à des fins purement reproductives.

Bien que n'utilisant pas de protocoles invasifs sur les adultes, nous nous appliquons à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse des poissons au maximum et veillons au bien-être de nos animaux en suivant quotidiennement les signes visibles d'un animal souffrant et en procédant si nécessaire à une euthanasie. La partie concernant la génération et le génotypage des lignées utilisées dans ce projet a fait l'objet d'une demande préalable numéro 2016011512005922. La présente demande concerne les mesures d'activité locomotrice et différentes analyses histologiques réalisées sur des larves de 6 et 7 jours. Le nombre total d'animaux utilisés sera de 1600.

4081. L'épilepsie focale du lobe temporal est une des formes d'épilepsies parmi les plus réfractaires aux traitements anti-épileptiques actuels. En effet, cette forme d'épilepsie représente à elle seule la moitié des patients épileptiques en échec thérapeutique.

Les neurostimulations intracérébrales constituent une nouvelle approche thérapeutique efficace, désormais couramment utilisées dans de très nombreuses pathologies neurologiques comme la maladie de Parkinson. Toutefois, dans le domaine de l'épilepsie, des travaux restent à effectuer afin de pouvoir proposer ce traitement de manière plus large et routinière aux patients épileptiques en échec thérapeutique. Dans ce contexte, notre laboratoire développe de nouveaux protocoles de neurostimulation à visée thérapeutique.

Dans ce projet, nous étudierons l'effet de stimulation électrique locale du cerveau à différentes fréquences afin d'identifier les protocoles capables de diminuer l'activité épileptique chez un modèle souris d'épilepsie focale du lobe temporal.

Dans le strict respect de la règle des 3R, l'élaboration des procédures a objectivé la minimisation d'une hypothétique souffrance des animaux avec une détermination précise des points limites (Raffinement), le nombre d'animaux (n=25) inclus dans le projet a été minimisé pour permettre une approche statistique pertinente pour l'évaluation de nos hypothèses

(Réduction), et enfin il faut préciser qu'il n'est pas envisageable d'utiliser une approche in vitro (Remplacement) en suppléance à l'approche in vivo.

4082. Notre laboratoire est engagé dans des programmes de recherches ayant pour but principal de découvrir et de développer de nouveaux médicaments pour lutter essentiellement contre les maladies de la sphère gastro-intestinale d'origine métabolique ou inflammatoire.

Le processus de développement prend donc naissance au laboratoire de chimie par l'invention puis la synthèse de nouvelles molécules innovantes.

Les propriétés physico-chimiques des composés sont étudiées, leur potentielles caractéristiques de futur médicament sont évaluées par des mesures d'activité dans des modèles in vitro ou in tubo avant qu'il soit décidé de les évaluer chez l'animal.

Avant même de pouvoir étudier l'efficacité intrinsèque des molécules dans un modèle animal affecté d'une pathologie précise, il est nécessaire de savoir comment la molécule se comporte une fois administrée à un organisme vivant. C'est-à-dire quelle sera son devenir dans un organisme et quel sera son impact sur l'organisme vivant dans lequel elle est administrée.

Pour être efficaces, les molécules doivent pouvoir atteindre leur organe-cible, une fois administrées à un être vivant, que ce soit par voie orale ou par injection, les molécules subissent des modifications chimiques, elles sont véhiculées, stockées ou éliminées. Toutes ces différentes étapes caractérisent le futur médicament et constituent les critères qui doivent être étudiés in vivo.

En complément de ces études de pharmacocinétique, il est nécessaire de savoir si un composé administré seul ou formulé avec des excipients peut produire des effets indésirables, et surtout à quelle concentration il pourrait produire ces effets non désirés. Nous réaliserons des études d'évaluation des effets toxicologiques sur des modèles de souris et de rats dans le but de déterminer la dose maximale tolérée et de s'assurer de l'absence d'effets secondaires non désirés.

Le projet décrit ici a donc pour objectif de détailler des procédures expérimentales (pharmacocinétiques et toxicologie non-réglementaire) qui permettent d'étudier ces caractéristiques préalablement au développement de molécules candidates à devenir de futurs médicaments indiqués dans diverses pathologies.

Ces procédures préalables, nécessitent peu d'animaux au regard de l'ambition des programmes menés, ils permettent d'ajouter un filtre supplémentaire dans notre arbre de sélection des nouvelles molécules qui seront destinées aux études d'efficacité chez l'animal.

Cela permet par voie de conséquence de réduire considérablement le nombre global d'animaux utilisés pour ces développements, ceci en respect de la règle des 3R's qui dicte l'expérimentation animale. Les études pharmacocinétiques produisent un inconfort modéré aux animaux qui les subissent, il est cependant mis en œuvre toutes les mesures qui permettent de diminuer le stress et la douleur notamment l'anesthésie si elle s'avère nécessaire.

Lors des études d'évaluation de l'apparition des effets délétères, les animaux sont en observation continue, la mise en œuvre de l'application des points limites définis préalablement aux réalisations des expériences est immédiate si ils sont atteints.

L'ensemble des procédures décrites dans ce projet appliquées à des petits rongeurs (rats et souris dans notre cas) nécessitera l'emploi de 1780 rats et 4360 souris, soit 6140 animaux pour la durée de 5 années que couvre ce projet.

4083. L'application de la Tomographie par Emission de Positons (TEP) aux maladies lymphoprolifératives fournit aujourd'hui des renseignements diagnostiques et thérapeutiques d'importance majeure, notamment en matière de rapidité et de qualité de réponse aux traitements. Le médicament radiopharmaceutique utilisé en pratique courante pour cet examen est le fluorodésoxyglucose ([¹⁸F]FDG). Toutefois, la captation de ce traceur n'est pas sélective au sein des tissus lymphoïdes, générant des aspects de fixation d'interprétation parfois difficile (spécificité); en outre, l'avidité pour ce traceur est inégale d'une variété histologique à l'autre, rendant les images peu interprétables dans certaines variétés (sensibilité). Un radiopharmaceutique spécifique des tissus lymphoïdes développé dans l'équipe a permis d'établir, sur un modèle de lymphome folliculaire pré clinique, sa spécificité et son contraste élevé pour la zone tumorale, par comparaison au [¹⁸F]FDG.

Le lymphome primitif du système nerveux central (SNC) étant multifocal et infiltrant, le rôle de la chirurgie est, contrairement aux autres tumeurs cérébrales, purement diagnostique. La TEP, technique d'imagerie non-invasive, pourrait être une alternative à la chirurgie pour l'aide au diagnostic et au suivi de traitement.

Le but du projet est de mettre en place un modèle animal de lymphome cérébral chez le rat « nude » pour établir l'efficacité de ce nouveau radiopharmaceutique en tant qu'agent d'imagerie pour l'aide au diagnostic pour ce type de lymphome et d'établir que ce radiopharmaceutique pourrait être un outil de diagnostic différentiel pour les tumeurs cérébrales (lymphome primitif du SNC, gliome de haut grade ou métastase cérébrale). Un diagnostic précis grâce à une technique de différenciation spécifique est d'une importance majeure car les thérapies à adopter sont très différentes.

Au préalable à cette mise en place du modèle, une étude in vitro a démontré l'avidité du radiotraceur pour les cellules tumorales de lymphome humain, lignée cellulaire choisie d'après la littérature. L'évaluation de la captation du radiotraceur dans les tumeurs et les tissus lymphoïdes par imagerie fonctionnelle TEP, ne peut être évaluée que sur l'animal.

Cette étude sera réalisée sur 140 rats « nudes » femelles au maximum. Une étude pilote sera menée pour des rats avec une greffe tumorale en sous cutanée (flanc de l'animal) pour caractériser le modèle tumorale in vivo, ce qui limitera le nombre d'animaux pour la mise au point du modèle tumorale implanté en intra cérébral. La technique chirurgicale d'injection intra cérébrale est développée au sein de l'UMR depuis plusieurs années, pour le modèle murin de glioblastome, ce savoir-faire est précieux pour réduire le nombre d'animaux lors de la mise au point du modèle. L'étude de différenciation du radiotraceur pour les lymphomes primaires du système nerveux central et les glioblastomes en sera également facilitée.

Deux modèles de lymphomes primaires du SNC seront développés, avec un suivi de la croissance tumorale par IRM :

- Modèle de lymphome parenchymateux, avec greffe dans le noyau caudé (striatum droit).
- Modèle de lymphome ventriculaire et méningé, avec greffe intraventriculaire (ventricule latéral droit).

Ces deux modèles nous permettront de balayer la majeure partie des cas de lymphomes cérébraux.

Dans l'ensemble du projet, le nouveau radiopharmaceutique sera évalué sur le modèle de lymphome implanté en sous cutané, en intra cérébral au niveau parenchymateux et au niveau ventriculaire, par imagerie pré clinique TEP. Sa réponse différentielle pour les lymphomes sera réalisée avec le modèle murin de glioblastome, également par imagerie TEP.

Les rats « nudes » seront hébergés en animalerie L2, leur état sanitaire sera surveillé tous les jours par du personnel qualifié. Les croissances tumorales seront examinées par palpations tous les 2 jours (pour les tumeurs implantées en sous cutané, étude pilote) ou par IRM, 2 fois par semaine (pour les tumeurs implantées en intra cérébral). Cette surveillance quotidienne et hebdomadaire permet de détecter tous signes cliniques de souffrance (douleur, perte de poids ...) et d'agir rapidement pour mettre fin à cette détresse. Pour toutes les chirurgies, les injections de cellules, les imageries, les animaux seront anesthésiés par voie gazeuse avec un monitoring de température et un suivi de la fréquence respiratoire.

4084. L'étude d'un gène humain que ce soit sur le plan fondamental ou dans le cadre d'une pathologie humaine nécessite la validation de son mode d'action dans un contexte physiologique proche de celui de l'homme. De la même façon, la mise au point de médicaments requiert des études approfondies ainsi que de nombreuses validations (toxicologiques par exemple) in vivo. Les modèles transgéniques souris et rat (selon l'étude) représentent aujourd'hui une étape indispensable qui répond aux nécessités scientifiques et /ou légale (dans le cas de médicament) d'étude ou de validation.

Le projet vise à générer des modèles de recherche sur mesure pour les laboratoires de recherche académiques et privés.

Ces modèles de recherche concernent uniquement des rongeurs transgéniques (18740 animaux).

Les animaux transgéniques générés seront constitués :

-De souris transgéniques obtenues grâce aux outils de transgénèse classique : microinjection d'ADN dans les ovocytes fécondés de souris, microinjection de cellules souches dans des blastocystes de souris.

-De rats transgéniques, obtenues grâce aux outils de transgénèse classique : microinjection d'ADN dans les ovocytes fécondés de rat

L'anesthésie et l'analgésie seront également utilisés en fonction des besoins, conformément aux procédures validées par le comité d'éthique.

4085. Environ 750 000 personnes épileptiques sont suivies en France et on estime que 5 % de la population est susceptible de déclencher une crise. Mieux comprendre l'origine et la progression de cette pathologie passe aussi par la caractérisation et l'utilisation de modèles animaux mimant au mieux la pathologie, et à exploiter ces mêmes modèles pour valider de nouveaux traitements. Nos travaux visent à caractériser le rôle de l'inflammation, en particulier des tissus périphériques, dans l'épilepsie. En effet, des données cliniques ainsi que des données récentes issues de la recherche fondamentale suggèrent un rôle pathologique de l'inflammation sur l'épilepsie, au travers d'interactions entre cerveau et organes périphériques au cours des crises. Dans ce contexte, les données obtenues chez l'homme ne permettent pas à elles seules de caractériser précisément les changements observés au niveau inflammatoire, au cours de la mise en place des crises puis de leur récurrence. C'est dans ce contexte du suivi du statut inflammatoire que s'inscrit ce projet. Nous travaillerons sur un modèle murin d'épilepsie induite par une injection i.p. de kainate. A l'image de la pathologie humaine, ce modèle déclenche une première crise mimant l'initiation de la pathologie, suivie de crises récurrentes spontanées. Nous étudierons les réponses inflammatoires des animaux au cours des crises, dans le tissu cérébral et dans différents organes périphériques connus pour être impliqués dans les processus inflammatoires (rate, glandes surrénales, moelle osseuse). Des échantillons sanguins seront aussi collectés. Nous caractériserons les changements de cytokines pro-inflammatoires, de taux d'hormones, des leucocytes dans les tissus et dans le sang et des enzymes impliquées dans la régulation du métabolisme et du stress, connues pour être augmentées durant les crises. Bien qu'étant menés uniquement chez l'animal, nos travaux s'inscrivent néanmoins dans un contexte de recherche translationnelle et sont susceptibles de trouver des applications cliniques ciblant des médiateurs de l'inflammation.

En pratique, cette étude utilisera 340 souris réparties en 8 groupes de 30 à 50 animaux, selon qu'il s'agisse de groupes contrôles ou traités. Ces calculs prennent en considération le taux de mortalité inhérent à la procédure d'induction de l'épilepsie ainsi que le nombre d'animaux qui ne développeront pas de crises récurrentes. Satisfaisant aux 3R, nous avons effectué une recherche bibliographique afin d'identifier de possibles approches alternatives in vitro. Ces méthodes, basées sur la culture cellulaire, sont, pour cette étude, inappropriées car elles ne conservent pas les systèmes de communication multicellulaires. Le nombre d'animaux sera réduit grâce à une approche rationnelle, associant des prélèvements réalisés de façon optimale (plusieurs tissus prélevés sur un même animal et utilisation des mêmes animaux par les différentes équipes), et un nombre d'animaux par lot approprié pour des analyses statistiques fiables. Une médication analgésique et anti-inflammatoire sera mise en œuvre pour réduire la douleur. Egalement, une habituation des animaux à leur environnement ainsi qu'un hébergement en cage enrichie contribuera à leur bien-être. Ces mesures de raffinement permettront de diminuer les états de stress, d'augmenter la reproductibilité des résultats et par conséquent contribueront à réduire le nombre d'animaux.

4086. Ce projet a pour but d'évaluer l'activité tumorigène (multiplication des cellules tumorales) des interleukines de la famille IL-17 (protéines messagères et régulatrices du système immunitaire naturellement présentes dans chaque organisme) dans les mélanomes, les fibrosarcomes, et les cancers mammaires, colorectaux et pancréatiques. Les interleukines sont des

cytokines autrement dit des facteurs solubles présents dans chaque organisme. Elles servent de messagers entre les cellules du système immunitaire.

L'objectif de ce projet est d'analyser chez la souris l'impact du blocage de l'IL-17B et son possible effet synergique avec l'inhibition de IL-17A sur le développement de la tumeur et la chimiorésistance et de valider ainsi l'utilisation des anticorps anti-IL-17 comme candidats pour l'immunothérapie anti-tumorale par neutralisation de ces cytokines.

Dans ce projet, quatre approches complémentaires sont utilisées pour évaluer l'inhibition de la voie IL-17B en combinaison avec celle de IL-17A sur la croissance tumorale et la mobilisation de la réponse immunitaire anti-tumorale et la chimiorésistance.

La progression tumorale est évaluée en comparant les valeurs de masse tumorale au cours du temps.

Les souris sont surveillées quotidiennement, ceci dans le but de :

- suivre le développement de la tumeur, celle-ci ne devant pas excéder 1500mm³ de volume ou 17 mm de diamètre
- détecter le moindre signe de souffrance et/ou de détresse de l'animal (exigence de raffinement).

Au maximum 2200 souris peuvent être utilisées. Le nombre d'animaux est réduit au minimum tout en ayant un nombre suffisant pour obtenir un résultat statistiquement significatif (exigence de réduction). On anticipe cependant que le nombre total de souris utilisées peut être inférieur au nombre total annoncé, car selon les résultats des premières études, l'utilisation de certaines lignées cellulaires ne sera pas poursuivie. Il est cependant difficile à ce stade de déterminer quelles lignées seront conservées.

Toutes les expériences sont menées par du personnel formé et compétent. De plus le contenu de celles-ci intègre les impératifs éthiques, la mise en place de points limites, les modalités d'hébergement, d'enrichissement du milieu, de prévention de toute douleur, détresse, et/ou inconfort chez l'animal.

Ces études découlent de premiers résultats *in vitro* et *in vivo* non publiés et réalisés au sein du laboratoire. Les effectifs donnés dans ce projet ont été évalués par les biostatisticiens de notre laboratoire et les résultats de ce projet seront analysés par cette équipe afin de déterminer la significativité.

4087. De nombreuses données de la littérature attribuent un rôle causal à une inflammation cérébrale à bas seuil dans la mise en place du syndrome métabolique. La prostaglandine E synthase microsomale (mPGES1) catalyse spécifiquement la dernière étape de la biosynthèse des prostaglandines E2. Notre projet vise à déterminer sa contribution dans le développement de l'obésité et du diabète. Pour ce faire, des souris transgéniques (n=32) présentant une invalidation du gène de la mPGES-1 (le phénotype des souris KO mPGES1 est non dommageable), et leurs contrôles (n=32), seront soumises soit à un régime enrichi en graisse pendant 15 semaines de façon à induire un phénotype obèse et pré-diabétique, soit à une alimentation standard. L'évolution du phénotype obèse sera évaluée grâce à des mesures bihebdomadaires de la prise alimentaire et du poids corporel. De plus, l'utilisation d'un système de calorimétrie indirecte en fin de régime (13ème semaine) permettra de mesurer différents paramètres physiologiques de façon automatisée continue et haute fréquence pendant 48h. En ce qui concerne l'évolution du phénotype diabétique, elle sera évaluée grâce à des mesures de glycémie (mise à jeun de 3h) régulière tout au long du régime, et un test oral de tolérance au glucose (OGTT) à la 14ème semaine de régime. Enfin, après la fin du régime (15ème semaine), tous les animaux seront sacrifiés pour réaliser des prélèvements d'organes et l'analyse de différents biomarqueurs.

Un deuxième groupe d'animaux (16 souris transgéniques et 16 souris sauvages) sera soumis au même régime sur la même durée, afin de réaliser des études immunohistologiques sur coupes de cerveau fixé. Cette procédure visera à évaluer l'inflammation du tissu nerveux, en particulier l'activation de la microglie du tronc cérébral et de l'hypothalamus après 15 semaines d'un régime enrichi en graisse chez des souris KO mPGES1 et WT.

Nous utiliserons un élevage de 68 animaux (21 mâles et 47 femelles). Compte-tenu du rendement d'environ 12,5% de mâles homozygotes KO mPGES1 en moyenne, ainsi que pour les mâles sauvages utilisés comme contrôle, environ 380 souriceaux seront nécessaires pour obtenir la totalité des 48 souris mâles KO mPGES1 et 48 souris mâles WT. Le nombre total d'animaux utilisé est donc de 448 (68+380).

Hormis le prélèvement d'organes et la perfusion qui se feront sous anesthésie générale, le projet est basé sur des procédures expérimentales peu invasives puisque limitées à des mesures de prise alimentaire et de poids corporel, des prises de sang, des passages en calorimétrie indirecte, ainsi qu'à une administration orale unique de glucose. De plus, les animaux pourront récupérer pendant au moins 5-6 jours entre chaque expérimentation. Le niveau de souffrance qui en résulte est par conséquent léger.

L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe, à ce jour, aucune méthode de substitution *in vitro* n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude des effets d'une délétion génétique, sur le contrôle de la prise alimentaire et du poids corporel. Le modèle animal adapté pour cette étude est un modèle de souris transgénique (fond génétique : DBA1) soumis à une alimentation enrichie en graisse. Ce modèle expérimental est particulièrement maîtrisé au sein du laboratoire car développé avec succès à plusieurs reprises dans des contextes expérimentaux similaires. Ce dernier point nous permet de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à la bonne conduite de l'étude.

4088. La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après l'étude multicentrique STAR*D, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines

de traitement. En outre, les patients rétablis à la suite d'un premier épisode dépressif présentent un risque de récurrence dans les 6 mois évalué à 50% en cas d'arrêt du traitement et il a été montré qu'en l'absence de traitement 15% des patients succombent à la suite d'un suicide et qu'entre 60% et 80% des suicides (entre 10000 et 15000 par an en France) sont le fait d'individus fortement dépressifs. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements et la compréhension des mécanismes physiopathologiques et étiopathologiques 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 « dépressif-like » (similaire à un état dépressif ou « depressed-like state »). Or les traitements aux antidépresseurs induisent très peu d'effets chez l'homme sain. Ces études ont été une première étape pour définir le spectre des actions possibles des ADs mais demeurent limitées pour déterminer les effets qui sont réellement nécessaires à l'action thérapeutique. C'est la raison pour laquelle nos travaux se basent sur l'utilisation du modèle du stress chronique léger imprédictible (SCI). Il s'agit d'un protocole initialement développé par Willner et al. (1987) que nous utilisons au laboratoire. De façon intéressante, il s'agit du seul modèle pour lequel il existe une signature moléculaire commune entre la dépression humaine et celle existant après stress chronique imprédictible chez la souris. Ce modèle de stress chronique imprédictible a également été validé pharmacologiquement, et semble le mieux adapté et le plus pertinent pour étudier la pathophysiologie de la dépression et le mécanisme d'action des ADs.

Le but de cette expérience est d'évaluer les effets cérébraux d'une molécule agissant via un mécanisme dopaminergique, le Brexpiprazole, comparé à ceux d'un antidépresseur agissant via un mécanisme sérotoninergique, la Fluoxétine. Pour cette expérience, 80 souris réparties en 4 lots sont requises.

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

Raffinement : les stress appliqués aux animaux peuvent être qualifiés de léger à moyen, sans stress physique de type nociceptif.

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=20 sujets par groupe au début de l'étude, n=15 à la fin de l'étude).

De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

4089. Les communications inter-auriculaires (CIA) représentent la malformation cardiaque la plus fréquemment observée chez l'adulte. Leur traitement a longtemps consisté en une fermeture chirurgicale mais, depuis environ 20 ans, le développement des techniques de cathétérisme interventionnel permet leur occlusion de manière sûre et peu invasive dès l'enfance (à partir de 10-15 kg). La très grande majorité de ces occlusions est réalisée grâce à des prothèses en nitinol. Ces prothèses ont d'excellents résultats à court et moyen terme mais posent 2 principaux problèmes au long cours: 1) un défaut de cicatrisation et d'endothélialisation de la prothèse entraînant la formation potentielle de caillots et 2) un relargage de Nickel excessif responsable d'une hypersensibilité et de tableaux migraineux parfois sévères. Une société a mis au point une nouvelle prothèse également fabriquée en nitinol mais dont le recouvrement devrait permettre une meilleure cicatrisation au sein du cœur et un relargage de Nickel moindre. Ces données sont théoriques et doivent être validées in vivo.

Ce projet a pour but de caractériser la biocompatibilité et la durée de cicatrisation de la nouvelle prothèse mais également le relargage de Nickel qu'elle occasionne, en comparaison avec la prothèse « classique ».

Ce projet sera développé autour d'un modèle animal porcin de CIA. En effet, afin de nous permettre de répondre aux questions d'ordre clinique, des modèles animaux de pathologies humaines et des tissus animaux sont nécessaires. Le porc a été choisi en raison de la proximité de son anatomie avec l'homme, notamment au niveau du septum inter-atrial et des oreillettes et de sa croissance accélérée. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans cette étude et dans le but d'obtenir un plus grand bénéfice de l'utilisation de ces animaux, nous avons fixé une limite maximale de 12 cochons au total. Il s'agit, de par notre expérience, du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité optimale et permettant une analyse statistique fiable. Les animaux seront répartis en 2 groupes pathologiques : 1 groupe chez qui nous implanterons la prothèse à tester (6 animaux), et 1 groupe contrôle chez qui nous implanterons la prothèse « classique » servant de Gold-standard (6 animaux). Si les objectifs expérimentaux peuvent être atteints par l'utilisation de moins d'animaux, alors plus aucun animal supplémentaire ne sera utilisé. D'autre part, nous sommes en mesure de pratiquer la plupart des différentes investigations à la suite les unes des autres (étude de biocompatibilité, relargage du Nickel) ce qui nous permettra d'accroître la quantité d'informations obtenues à partir d'un animal et ainsi de limiter l'utilisation globale d'animaux. Les résultats de cette étude seront précieux quant à la validation de cette nouvelle prothèse permettant de diminuer le nombre de complications survenant après fermeture. Afin de prendre en compte les 3R, le raffinement sera mis en place par différentes mesures tout au long des différentes étapes du projet. Des mesures de raffinement seront mises en place lors de l'opération pour éviter leur angoisse par l'utilisation d'une prémédication adaptée ainsi qu'une anesthésie générale durant toute la procédure, lors de l'hébergement pour favoriser leur bien être au sein de l'établissement agréé notamment par la mise en place de jouets, de

pierre à sel, de box favorisant le contact des congénères) et l'entretien des animaux sera réalisé par des personnes compétentes.

4090. La dépression est une maladie extrêmement répandue que le DSM-V (Diagnosis and Statistical Manual of mental disorder) décrit comme se caractérisant par plusieurs modifications importantes de l'humeur et par des altérations psychophysiologiques dont la prégnance relative est très variable d'un patient à l'autre : humeur dépressive, perte d'intérêt ou de plaisir, perte d'appétit ou hyperphagie, insomnie ou hypersomnie, agitation ou ralentissement psychomoteur, perte d'énergie ou fatigue, faible estime de soi ou culpabilité, troubles de la concentration ou difficultés à prendre des décisions, pensées suicidaires. Selon le DSM-V, le diagnostic de dépression majeure est établi par la présence d'au moins cinq des symptômes précédemment cités parmi lesquels doit figurer la dysphorie et l'anhédonie. Ces symptômes doivent être présents pendant deux semaines consécutives et doivent faire l'objet d'une détresse ou d'une altération significative. Enfin, ils ne doivent pas être attribués à une substance médicamenteuse ou à un trouble psychotique. Il convient d'ajouter à cette liste de nombreux symptômes associés, plus ou moins liés aux précédents et de fréquence variable, tels que l'anxiété, le retrait social, la perte motivationnelle, des troubles cognitifs, la perturbation de l'activité sexuelle... La dépression majeure est l'une des affections les plus lourdes en termes de morbidité dans le monde, affectant plus de 350 millions de personnes. Plus grave, il a été établi qu'en l'absence de traitement, 15% des patients succombent à la suite d'un suicide. Les souffrances engendrées par cette pathologie ainsi que les répercussions économiques et sociales sont considérables. L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) considère qu'en 2020, la dépression sera l'affection qui, après les maladies cardiovasculaires, entraînera les plus gros coûts de santé. Toujours d'après l'OMS, le trouble dépressif majeur sera la première cause d'incapacité en 2030. Compte tenu de toutes ces données, l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires de la dépression est essentielle puisqu'elle relève du domaine de la santé publique.

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une sérine protéase synthétisée par les cellules endothéliales, initialement décrite pour sa capacité à cliver le plasminogène en plasmine. La plasmine, protéine active, permet alors la dégradation de la fibrine, constituant majeur des caillots sanguins. Bien que le tPA circulant soit majoritairement d'origine vasculaire, la démonstration que le tPA est également synthétisé par les neurones et certaines cellules gliales a ouvert un domaine de recherche innovant et stimulant concernant le rôle de cette sérine protéase. Des travaux ont ainsi rapporté de nombreux éléments en faveur d'une implication du tPA dans diverses fonctions du système nerveux central (SNC) parmi lesquelles la migration neuronale au cours du développement, la plasticité synaptique chez l'adulte et certains comportements. Plusieurs mécanismes d'action peuvent expliquer son rôle au niveau du parenchyme cérébral comme par exemple son interaction avec le récepteur N-méthyl-D-aspartate ou bien encore l'activation de facteurs neurotrophiques tels que le Brain-Derived Neurotrophic Factor. L'ensemble de ces données permet de postuler que le tPA n'est pas seulement une protéase intervenant dans la cascade fibrinolytique mais qu'il est également un acteur polyvalent dans le parenchyme cérébral. Quelques études se sont intéressées à l'implication du tPA dans l'anxiété et montrent que cette protéine est nécessaire au déclenchement de la réponse comportementale face à un événement menaçant l'intégrité de l'organisme. Cependant, il n'existe à ce jour aucune étude décrivant le rôle potentiel du tPA dans la dépression. Pourtant, il existe une forte comorbidité entre anxiété et dépression et des modifications des taux sanguins du principal inhibiteur du tPA (PAI-1 : inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène de type 1) ont été caractérisés à de multiples reprises chez des patients atteints de dépression majeure sans être en mesure d'en déterminer l'origine.

Notre projet de recherche consiste donc à caractériser l'implication de l'axe tPA / PAI-1 dans la dépression majeure. Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-après. La souris est l'espèce animale la plus utilisée dans les études des troubles émotionnels. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que les tests comportementaux largement décrits dans la littérature pour quantifier les états dépressifs. La communauté scientifique dispose pour ces études de modèles déficients en tPA et en PAI-1. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est 120.

4091. *Clostridium difficile* est une bactérie strictement anaérobie et productrice de spores. Il s'agit de la première cause de diarrhées bactériennes associées aux soins chez l'adulte dans les pays développés et en particulier en France (> 24000 cas par an, dont 14 % de formes compliquées). La mortalité associée aux infections à *C. difficile* est de l'ordre de 3%.

La contamination se fait à partir des spores résistantes, présentes dans l'environnement des services de soins hospitaliers. Les infections à *C. difficile* peuvent évoluer sur un mode épidémique avec la survenue de cas groupés d'infection (exemple de l'épidémie qui a touché le Nord de la France en 2006). Les infections à *C. difficile* représentent un coût sanitaire important pour nos sociétés, en raison de l'augmentation des durées moyennes de séjours et du surcoût des soins associés. Malgré des traitements antibiotiques généralement efficaces, l'infection à *C. difficile* récidive fréquemment, chez plus de 20% des patients, ce qui peut être très invalidants pour ces derniers.

La bactérie produit des toxines qui sont majoritairement responsables des signes cliniques et des lésions de la muqueuse intestinale. Cependant, d'autres facteurs interviennent dans l'établissement de l'infection, au cours de la première étape qui correspond à la colonisation du tube digestif de l'hôte par *C. difficile*. Notre laboratoire s'est spécialisé dans l'étude de cette étape de colonisation, et travaille notamment sur le rôle des structures de surfaces impliquées dans cette étape. L'objectif de ces études est de trouver de nouvelles cibles vaccinales et/ou thérapeutiques pour lutter contre les infections à *C. difficile*. Pour caractériser précisément le rôle de ces protéines dans l'étape de colonisation, la stratégie de choix est l'étude de souches mutantes n'exprimant plus l'une ou l'autre de ces protéines. Nous caractérisons au préalable les mutants par plusieurs tests in

in vitro, mais les essais de colonisation de ces mutants chez l'animal restent une étape incontournable pour comprendre leur rôle dans le cadre d'un processus infectieux global.

Deux types d'essais sont programmés : des essais de compétition entre souche parentale et souches mutantes chez la souris axénique (sur des lots de 15 souris), et des essais de colonisation individuelle chez la souris conventionnelles (sur des lots de 12 souris). Dans ces deux modèles animaux, les signes cliniques induits à la suite de l'infection par *C. difficile* sont très limités.

L'exigence de réduction, raffinement, et remplacement des animaux sera ainsi respectée avec d'une part une souffrance animale résultant d'une diarrhée modérée spontanément résolutive extrêmement réduite et une intervention minimale sur l'animal jusqu'au point final, et, d'autre part, la réduction au maximum du nombre d'animaux afin de conclure sur ces expériences sans avoir besoin de les renouveler. Nous prévoyons de tester 5 mutants durant les 3 ans du projet, et donc d'utiliser 135 animaux maximum.

4092. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont de manière prédominante d'origine ischémique. Plusieurs facteurs de risques favorisent le déclenchement de cette pathologie dont l'hypertension artérielle chronique qui représente le facteur de risque le plus important.

L'AVC représente la troisième cause de mortalité pour les hommes et la première pour les femmes. Cette maladie représente aussi la première cause d'handicap acquis chez l'adulte.

Malgré les efforts et les progrès scientifiques ces dernières années dans la compréhension de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale et la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques, l'efficacité des traitements thrombolytiques reste discutée et celle des traitements neuroprotecteurs inexistante en clinique.

En effet, l'efficacité et la marge thérapeutique des traitements pharmacologiques de cette maladie restent considérablement insatisfaisantes. Il est ainsi très important de poursuivre des études pré-cliniques visant à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les AVC.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet d'une intervention thérapeutique sur le volume de la lésion cérébrale et la récupération fonctionnelle à la suite d'une ischémie chez le rat. Cette intervention consiste en un traitement moléculaire à l'aide d'un agent de la matrice extracellulaire injecté après l'induction d'une ischémie cérébrale chez le rat.

Deux procédures seront menées dans cette étude: "Étude de l'effet "dose-réponse" du traitement moléculaire de l'AVC ischémique à base d'agent de la matrice extracellulaire" pour déterminer la dose optimale du traitement et "Étude de l'effet du traitement moléculaire de l'AVC ischémique à base d'agent de la matrice extracellulaire chez des rats présentant une hypertension artérielle" pour déterminer l'effet du traitement sur les animaux présentant le facteur de risque aggravant majeur c'est-à-dire l'hypertension artérielle. Ces procédures seront réalisées en suivant le principe des 3R (Raffiner, Réduire, Remplacer). Ainsi, un nombre minimal d'animaux a été retenu, 80 animaux pour la première procédure et 40 animaux pour la seconde, soit 120 animaux au total.

4093. Depuis quelques années, un nombre croissant d'études indiquent que l'autisme et la schizophrénie pourraient être des maladies neurodéveloppementales (MND) caractérisées par des altérations anatomiques du cortex apparaissant lors des phases de développement précoce ou de maturation du cerveau.

Ce projet s'intègre dans une thématique générale de recherche qui vise à étudier la mise en place du système nerveux chez la souris. Nous nous intéressons tout particulièrement au rôle de la voie de signalisation Eph/ephrin, un système de communication entre cellules voisines qui joue un rôle important dans de nombreux processus développementaux et physiologiques. Nous nous focalisons plus précisément sur deux membres de la famille des ephrinBs : ephrin-B1 et ephrin-B2 qui présentent des patrons d'expression partiellement recouvrant dans le cortex embryonnaire. L'objectif du présent projet de recherche est d'étudier les conséquences de mutations dans les gènes *EfnB1* et *EfnB2* sur le développement du néocortex.

Ce projet fait appel d'une part à des lignées existantes de souris génétiquement modifiées pour les gènes *Efnb1* et *Efnb2* mais aussi des lignées exprimant la Cre recombinase. Il inclut l'entretien des lignées, des croisements en vue d'obtenir des embryons à différents stades de développement et des prélèvements d'embryons. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, nous concentrerons nos analyses sur 4 stades clés du développement embryonnaire. Les analyses immunohistochimiques seront réalisées sur 4 individus pour chaque génotype à chaque stade, ce qui est le minimum pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Les échantillons seront inclus en paraffine ce qui nous permet de collecter un grand nombre de coupes pour chaque échantillon et ainsi réaliser toute la série de marquages immunohistochimiques nécessaires à la caractérisation des phénotypes. Ces procédures n'entraînent pas de douleurs ou de souffrance.

D'autre part, ce projet comprend la génération de nouvelles lignées de souris par la technique d'édition du génome CRISPR/Cas9. Cette procédure nécessite un acte chirurgical pour réimplanter les embryons modifiés dans l'utérus d'une mère porteuse. Afin de réduire la douleur, la chirurgie est réalisée sous anesthésie et l'animal bénéficie de traitements analgésiques post-opératoires. Tous les animaux sont hébergés en milieu enrichi, 5 animaux maximum par cage, sauf en cas de portée (une mère/une portée par cage), ainsi que pour les mères porteuses après chirurgie (une par cage). Les animaux reçoivent une visite quotidienne. Au total, 434 souris seront utilisées pour ce projet.

4094. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant de lutter contre des maladies psychiatriques incluant des troubles psychotiques, la manie, les troubles d'hyperactivité et de déficit attentionnel et l'autisme. Certaines procédures peuvent également s'avérer utiles comme modèles en lien avec les troubles de l'humeur.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet ont été caractérisées de façon extensive dans la littérature scientifique et sont mises en œuvre à grande échelle au sein des laboratoires de psychopharmacologie. Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substance pharmacologiques sur le comportement animal de façon à prédire leur efficacité clinique.

Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre de rongeurs qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 5000.

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

4095. La myasthenia gravis est une maladie auto-immune touchant les muscles striés squelettiques. Elle est caractérisée par une attaque de la jonction neuromusculaire post-synaptique par des anticorps dirigés notamment contre les récepteurs à l'acétylcholine. Il en résulte une faiblesse musculaire fluctuante et une fatigabilité excessive. Le pronostic vital du patient peut être engagé si les muscles respiratoires sont touchés. A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif pour la MG. Les traitements thérapeutiques actuels sont essentiellement symptomatiques ou non-spécifiques. De plus, ils doivent être pris à vie.

Le thymus est impliqué dans la pathogénèse de la maladie. En effet, une hyperplasie thymique caractérisée par la présence de centres germinatifs (impliqués dans la production des anticorps pathogènes) ou un thymome sont fréquemment retrouvés chez les patients.

La finalité de nos projets de recherche est de mettre au point de nouveaux traitements plus efficaces et moins contraignants pour les patients myasthéniques.

Le présent projet vise à tester des nouvelles cibles thérapeutiques en utilisant un modèle expérimental qui mime la pathologie humaine : le modèle humanisé de MG expérimentale. Ce modèle consiste à greffer des fragments de thymus issus de patients atteints de myasthénie grave à des souris immunodéficientes de la souche NSG.

Les souris NSG sont accueillies dans l'animalerie au minimum deux semaines avant la chirurgie.

Le test de molécules thérapeutiques candidates sur un organisme entier est une étape préalable aux essais cliniques sur les patients. Nous estimons avoir besoin de greffer 200 souris pour mener ce projet. Ce chiffre ainsi que toute la démarche scientifique a été établi afin de respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) et ainsi obtenir des résultats statistiquement pertinents avec le minimum d'animaux possible. Le raffinement des expériences est assuré par la mise en place de points limites destinés à éviter l'inconfort et la douleur des souris.

4096. Les thérapies courantes des maladies neuropsychiatriques comme la maladie de Parkinson ou la schizophrénie présentent des limitations importantes. En effet, le traitement de la maladie de Parkinson avec la L-DOPA provoque des dyskinésies et devient inefficace à long terme, tandis que les neuroleptiques, couramment utilisés pour traiter la schizophrénie, ont beaucoup d'effets collatéraux comme la dyskinésie tardive et permettent de contrôler les symptômes positifs de la maladie, comme le délire et les hallucinations, et négatifs, comme l'éroussement affectif et émotionnel, mais ne sont pas efficaces contre les déficits cognitifs, caractérisés par la désorganisation de la pensée. Ainsi, des nouvelles cibles thérapeutiques plus efficaces sont activement recherchées pour améliorer le traitement de ces maladies et/ou pour réduire la portée des effets secondaires des thérapies courantes.

Dans ce contexte, nous effectuons des études translationnelles afin de valider des nouveaux gènes de risque génétique comme nouvelles cibles thérapeutiques pour des maladies neuropsychiatriques telles que la maladie de Parkinson ou la schizophrénie. Pour ce faire nous allons générer des modèles murins présentant des modifications du comportement qui reproduisent différents symptômes de ces maladies et évaluer du point de vue fonctionnel l'effet que la manipulation de l'expression du gène d'intérêt a sur ces symptômes. Les modèles animaux seront obtenus en traitant des rats à différents périodes de leur vie (nouveaux nés, adolescents ou adultes) avec des drogues psychotropes comme la phencyclidine, l'amphétamine ou l'apomorphine ou avec des neurotoxines comme la 6-hydroxydopamine. Le gène d'intérêt sera inactivé par transfert intracérébrale de siRNA exprimés par des vecteurs lentiviraux injectés en stéréotaxie dans des régions cérébrales spécifiques.

Les effets de l'inactivation localisée du gène d'intérêt sur les altérations comportementales des modèles animaux seront évalués avec des tests spécifiques sur différents paramètres intégrant locomotion, cognition, réponse au stress etc. qui reproduisent des symptômes comme les altérations de la motricité, la psychose, la dépression, l'anxiété qui sont communs à différentes maladies neuropsychiatriques et notamment la maladie de Parkinson et la schizophrénie. A la fin de ces expériences, les animaux seront sacrifiés et leurs cerveaux prélevés pour être utilisés dans des études cellulaires et moléculaires.

L'analyse de l'ensemble des résultats vise à valider une nouvelle cible thérapeutique pour des symptômes communs à différentes maladies neuropsychiatriques et permettra ainsi de faire avancer nos connaissances sur les fonctions cérébrales en conditions normales et pathologiques.

Nous utiliserons sur 5 ans un total de 1480 rats. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée :

- 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ;
- 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ;
- 3) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes-le rat est donc l'espèce la plus appropriée.

4097. Le syndrome néphrotique résulte d'un dysfonctionnement glomérulaire rénal conduisant à une perte massive de protéines dans les urines. Cette altération glomérulaire primaire s'accompagne d'une rétention tubulaire d'eau et de sel conduisant à la formation d'œdèmes et d'ascite qui entravent la vie quotidienne. Nous travaillons depuis plusieurs années à l'élucidation des mécanismes responsables de la rétention hydro-sodée et de la constitution des œdèmes et de l'ascite au cours du syndrome néphrotique afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Ce projet de physiopathologie intégrative ne peut être réalisé que sur un modèle animal présentant une physiologie rénale et vasculaire comparable à celle de l'humain. Actuellement il existe un seul modèle animal qui récapitule la plupart des symptômes de la maladie humaine. Il s'agit d'un modèle de rat chez lequel le syndrome néphrotique est induit par une injection intraveineuse unique d'acide aminé-protéine de puromycine (PAN), un composé induisant aussi un syndrome néphrotique chez l'homme mais pas chez la souris.

L'étude de ce modèle animal nous a antérieurement permis d'identifier le site intra-rénal de la rétention de sodium ainsi que le canal à sodium responsable. Cependant, ce modèle présente un taux plasmatique d'aldostérone élevé, une caractéristique rare chez les patients néphrotiques. L'administration de PAN à des rats présentant chez lesquels nous avons clampé la concentration circulante d'aldostérone nous a ensuite permis de d'identifier un nouveau canal à sodium possiblement responsable de la rétention de sodium. L'expression de ce canal a été retrouvée chez la plupart des patients néphrotiques étudiés. De plus, nous avons récemment obtenu des résultats préliminaires suggérant que l'expression de ce canal serait induite par la présence anormale d'albumine dans l'urine. Enfin, en utilisant le même modèle animal, nous avons montré que la constitution d'œdème et d'ascites secondaires à la rétention rénale de sodium est associée à une augmentation de la perméabilité capillaire à l'eau, et que ce processus est secondaire à l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène. Notre projet vise à démontrer le rôle de ces nouvelles cibles (nouveau canal à sodium rénal, albumine urinaire et perméabilité vasculaire) dans la pathogénèse de la rétention de sodium et des œdèmes associés au syndrome néphrotique.

La réalisation du projet nécessitera l'étude de 180 rats plusieurs lignées de rats: des rats Sprague-Dawley, des rats analbuminémiques Nagase, et des rats invalidés pour le gène codant pour le nouveau canal sodique identifié dans le modèle clampé en aldostérone.

Application des 3R. S'agissant d'étudier un processus physiopathologique impliquant plusieurs tissus et organes, seuls les modèles animaux permettent de répondre aux questions posées, à l'exclusion de tout modèle cellulaire. Le nombre total d'animaux a pu être réduit à 180 sur la base de nos études précédentes montrant que des groupes de 6 animaux sont suffisants pour atteindre une signification statistique. Par ailleurs, chaque animal est utilisé pour réaliser un maximum d'analyses différentes en fin de protocole. Enfin tout sera mis en œuvre pour garantir le minimum de stress et de douleur au cours de l'hébergement préalable aux expériences (mise en œuvre des procédures d'enrichissement développées par notre centre d'exploration fonctionnelles) et au cours des procédures (utilisation d'analgésie en périodes post opératoires).

4098. La mucoviscidose est une maladie héréditaire monogénique autosomique récessive grave affectant chaque année un nouveau-né sur 4200 en France. Nos travaux de recherche visent à mettre au point un traitement curatif pour cette maladie. Nous voulons ici évaluer l'efficacité de transfert de gènes *in vivo* de formulations, issues de nos recherches, et préalablement testées de façon approfondie en conditions *in vitro*. Nos investigations nous ont permis de sélectionner 20 formulations lesquelles représentent des candidates parmi les plus intéressantes à tester à l'heure actuelle. Dans le cas présent, les molécules testées correspondent à des lipides cationiques originaux et les cellules cibles sont les cellules épithéliales bronchiques. Ceci implique d'effectuer des tests en conditions *in vivo* afin de prendre en compte toutes les contraintes liées à la complexité des voies respiratoires pulmonaires lesquelles ne peuvent être reproduites en conditions *in vitro*. La méthode d'administration utilisée consiste à délivrer les formulations à tester sous la forme d'un aérosol pouvant être respiré. Les molécules testées peuvent ainsi interagir directement avec l'épithélium des voies respiratoires, en particulier avec les cellules cibles à traiter. L'espèce animale de référence pour ce type d'étude est la souris. En pratique, les animaux sont introduits pendant 30 à 45 minutes dans une chambre d'exposition où ils peuvent se déplacer librement (sans contrainte). Ils y respirent un aérosol formés à partir des agents de transfert de gènes à tester. Aucune anesthésie ou analgésie des animaux n'est nécessaire au cours de l'exposition à l'aérosol. De suite après cette exposition, les animaux sont replacés dans leur cage puis stabulés normalement, sans autre traitement, jusqu'à la fin du protocole (soit au plus tard 28 jours après l'exposition). L'évaluation de l'efficacité du transfert de gènes est effectuée de deux manières, (1) au cours de la stabulation par imagerie de bioluminescence (sous anesthésie gazeuse) puis (2) en point final, c'est-à-dire sur des prélèvements effectués uniquement immédiatement après l'euthanasie des animaux. L'administration par aérosol est une stratégie adaptée pour un traitement de maladies telle que la mucoviscidose ; elle pourrait être rapidement transposée à la clinique, en particulier du fait que le matériel utilisé pour générer l'aérosol (le nébuliseur) est déjà utilisé par des patients pour d'autres indications. Par ailleurs, le protocole utilisé est non-invasif c'est-à-dire qu'aucun geste n'est pratiqué sur les animaux, lesquels restent vigilés tout au long de l'expérience (depuis leur réception jusqu'à leur euthanasie en fin de protocole). Enfin, la procédure ne génère pas ou peu de stress, ce qui impacte positivement la qualité des résultats obtenus en réduisant en particulier la variabilité liée à l'administration et donc le nombre d'animaux qu'il est nécessaire d'inclure, en bon accord avec la règle des 3R. Le nombre total d'animaux nécessaires pour la réalisation de ce protocole est de 315 ([20 formulations à tester * 5 animaux par temps * 3

temps] + 15 animaux « témoins »). Ce nombre est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Un test statistique non paramétrique sera utilisé afin de comparer les efficacités des différentes formulations testées.

4099. Le parodonte est un assemblage complexe de différents tissus (gencive, os alvéolaire, et ligament parodontal principalement) connexes à l'organe dentaire dont le rôle est de maintenir cet organe en fonction le plus longtemps possible. Ce parodonte est en contact étroit avec un biofilm bactérien adhérent à la surface dentaire composé de nombreuses espèces bactériennes qui, sans l'élimination mécanique par le brossage, va induire une réaction inflammatoire locale. Cette inflammation est la plupart du temps réversible lorsqu'elle reste cantonnée au tissu gingival. Parfois et selon des mécanismes imparfaitement compris, la maladie progresse provoquant une lyse importante de l'os alvéolaire de soutien de la dent (parodontite). La flore bactérienne impliquée dans la parodontite est majoritairement anaérobie gram négative et l'attention se porte plus particulièrement sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et sur *Porphyromonas gingivalis* associés aux formes cliniques les plus sévères. En France, 82% de la population adulte est atteinte d'une parodontite parmi lesquels 10% semblent affectée d'une forme sévère réfractaire au traitement mécanique de référence.

Il a été décrit que l'atteinte bactérienne permet la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 ou le TNF. Ces cytokines exercent principalement leurs actions en promouvant la différenciation et le recrutement des cellules ostéorésorbantes que sont les ostéoclastes. Cependant, les anticorps dirigés spécifiquement contre chacune de ces trois cytokines ne montrent qu'une efficacité partielle dans le traitement de la maladie parodontale chez l'homme. Récemment, la famille de l'IL-1 s'est enrichi de nouveaux membres comme l'IL-33, l'IL-36 et l'IL-38 qui ont montré un rôle pro-inflammatoire puissant dans le cadre de maladies inflammatoires rhumatismales ou cutanées non bactériennes. Dans ce contexte, nous formulons l'hypothèse que l'IL-33, IL-36 et l'IL-38 pourraient être des acteurs pertinents impliqués dans une maladie inflammatoire d'origine bactérienne.

L'existence de modèles animaux de parodontite a permis de clairement établir une corrélation entre bactéries parodontogènes et perte osseuse ce qui permet ainsi d'appréhender le rôle de certains facteurs inflammatoires dans la progression de la maladie parodontale. L'un des modèles les plus performants est la pose d'une ligature de soie autour d'une molaire de souris permettant une accumulation bactérienne et en conséquence une inflammation qui va engendrer une ostéolyse alvéolaire. L'introduction de *Porphyromonas gingivalis* par imprégnation de la ligature permet d'optimiser l'émergence d'une parodontite.

L'objectif sera de vérifier l'implication éventuelle d'IL-33, d'IL-36 et d'IL-38 dans un modèle de parodontite généré chez des souris WT CD1/SWISS ou C57BL/6 par ligature péri-dentaire (Trois groupes de 10 animaux sont prévus, l'un servant de contrôle absolu, et les autres dans lesquels la maladie parodontale sera induite pendant quatre semaines soit par ligature imprégnée de *Porphyromonas gingivalis* soit par ligature sans agent bactérien).

La sévérité de la maladie parodontale sera quantifiée sur la moitié des animaux (5 dans chaque groupe) en mesurant la perte d'os alvéolaire dans la zone d'intérêt par « micro-computed tomography ». L'implication des interleukines d'intérêt sera étudiée par diverses techniques de biologie moléculaire.

Le nombre total d'animaux prévu pour l'ensemble du projet est de 150, ce nombre est réduit au maximum afin de permettre des analyses statistiques significatives (Réduire), les points limites ont été définis et seront pris en compte lors de l'expérimentation (Raffiner) et l'utilisation d'un modèle animal est indispensable pour l'étude de cette pathologie car il reproduit tout les signes cliniques observables chez l'homme qu'une étude cellulaire ne pourrait pas reproduire (Remplacer).

4100. Le projet de recherche de notre équipe vise à acquérir des connaissances pour contrôler la fertilité des poissons d'élevage, que ce soit pour la réduire ou l'améliorer. Nous étudions les mécanismes de régulation permettant aux spermatogonies (cellules souches germinales) de se renouveler ou de produire des spermatozoïdes chez le poisson zèbre. Des lignées transgéniques de poisson zèbre ont été générées afin de marquer ces cellules souches par la synthèse, en leur sein, d'une protéine fluorescente verte appelée GFP. Les cellules fluorescentes observées chez ces animaux transgéniques pourraient être effectivement des cellules souches spermatogoniales mais cela doit être confirmé par des explorations fonctionnelles qui démontrent leur aptitude à coloniser la gonade et à initier des vagues spermatogénétiques.

Le protocole présenté ici a pour objectif de transplanter des cellules germinales exprimant la GFP et collectées à partir d'individus transgéniques donneurs, dans la cavité abdominale d'alevins receveurs issus d'une autre lignée transgénique exprimant une protéine fluorescente rouge au niveau de la gonade. Si les cellules transplantées sont des cellules souches, nous devrions pouvoir observer la fluorescence verte dans les gonades des animaux transplantés. La capacité des cellules transplantées à générer des spermatozoïdes sera également évaluée en étudiant le transfert du transgène GFP à la descendance.

Le nombre d'animaux nécessaires au projet est de 480 poissons. Le projet prend en compte la règle éthique des 3Rs :

- Remplacer : Il n'existe pas d'alternative in vitro à la collecte de cellules germinales souches à partir des gonades d'animaux donneurs car il n'existe pas de lignées permettant l'obtention de cellules souches germinales de poissons zèbre. Notre objectif de recherche permettra de cultiver les cellules souches germinales de poisson zèbre et de pérenniser ces cultures sans avoir à sacrifier de nouveaux animaux.

- Réduction : Le nombre d'animaux transplantés est adapté au plus juste pour permettre une évaluation de la capacité des cellules fluorescentes à recoloniser la gonade des animaux receveurs et leur aptitude à initier des vagues spermatogénétiques.

- Raffiner : Le protocole expérimental préconise l'anesthésie des animaux pour limiter la douleur éventuellement induite par l'injection des cellules germinales fluorescentes. D'autre part, il permettra de décider d'une euthanasie prématurée en cas de comportements anormaux des animaux transplantés traduisant un mal être.