



**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 (18)

1801- 1. CD73 est une protéine membranaire exprimée par plusieurs types de tumeurs et qui agit comme 5'-ectonucléotidase pour transformer l'AMP en adénosine + Pi. L'adénosine semble jouer un rôle pro-tumoral (1) en stimulant la migration, l'invasion et peut-être la prolifération des cellules tumorales; (2) en inhibant les réponses immunitaires innées et adaptatives antitumorales. L'objectif du projet est d'étudier la possibilité de contrôler la croissance et les métastases de cellules tumorales murines en bloquant CD73 avec un anticorps monoclonal. 2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Le projet permettra de mieux comprendre les mécanismes d'action d'un anticorps anti-CD73 sur la croissance et la dissémination de cellules tumorales. Il permettra d'étudier les effets secondaires et les bénéfices fournis par l'association avec d'autres traitements. Ces résultats s'inscrivent dans le cadre du développement d'un anticorps thérapeutique utilisable chez les patients. 3- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Le projet fait suite à des études en culture ayant démontré le blocage par des anticorps anti-CD73 de (1) la conversion de l'AMP en adénosine ; (2) l'inhibition de la migration des cellules tumorales (3) la restauration de la prolifération de lymphocytes T humains stimulés par des billes couplées aux anticorps anti-CD3/CD28 et inhibée par l'AMP

- Seul un modèle in vivo nous permettra d'étudier les effets du blocage de CD73 sur la croissance et les métastases de cellules tumorales de souris (carcinome ovarien, mélanome), l'efficacité de la combinaison avec d'autres traitements, l'impact sur la réponse immunitaire anti-tumorale et les effets secondaires.

- Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats: ralentissement ou régression de la croissance tumorale, et diminution du nombre et de la taille des métastases après le traitement anti-CD73 par rapport aux groupes contrôles. Une définition précise des points limites (absence de signe évoquant une souffrance, taille des tumeurs <17mm) et une surveillance adaptée des animaux permettent de classer les procédures expérimentales en classe de gravité modérée. 4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet. Au total, un total d'environ 470 souris sont envisagées au cours des 24 mois à venir.

1802- Parmi les milliers d'espèces phytoplanctoniques marines recensées, une soixantaine d'entre elles sont reconnues comme pouvant produire des substances toxiques pour l'homme. Ces toxines d'algues ou phycotoxines peuvent transiter le long des chaînes alimentaires aquatiques et atteindre à certains échelons de la chaîne alimentaire des concentrations dangereuses, voire mortelles, pour le consommateur. Au cours des 25 dernières années, les pouvoirs publics et les scientifiques ont constaté une extension du nombre d'épisodes toxiques, une extension des zones de production touchées et une multiplication des toxines. Il existe peu de moyens de prévenir la contamination des fruits de mer par les phycotoxines, il s'avère donc nécessaire de sécuriser leur mise sur le marché en assurant une surveillance des zones de production et des produits mis sur le marché. En France, la surveillance exercée par les autorités compétentes permet d'éviter des intoxications graves, le risque majeur étant lié à la consommation de coquillages et de certains poissons d'importation. En charge de l'animation du réseau des laboratoires impliqués dans le dispositif national de surveillance des coquillages issus des zones de production et mis sur le marché, nous sommes amenés à mettre en œuvre plusieurs méthodes d'analyse pour évaluer la salubrité des produits de la mer et des coquillages. Bien que des méthodes physico-chimiques soient utilisées pour le dosage des toxines lipophiles et des toxines amnésiantes provoquant une intoxication diarrhéique ou amnésiante, la méthode officielle pour le dosage des toxines paralysantes dans les coquillages ainsi que le dosage des ciguatoxines dans les poissons provenant d'Outre-Mer (maladie de « la gratte ») reste le bioessai sur souris. De fait, ce projet concerne les analyses réglementées des toxines paralysantes dans les coquillages ainsi que les analyses de ciguatoxines dans les poissons. Par ailleurs notre laboratoire réalise quelques analyses de toxines lipophiles par bioessai sur souris. Bien que l'analyse physico-chimique soit désormais la méthode référence pour l'analyse de ces toxines lipophiles, le bioessai a été maintenu par les autorités compétentes dans le cadre du protocole de vigilance. Pour chacune de ces analyses de biotoxines marines, un extrait de coquillage ou poisson est injecté par voie intrapéritonéale à un lot de souris défini dans chaque méthode (toxines paralysantes : 3 à 8 animaux par échantillon selon la concentration, toxines lipophiles : 3 animaux par échantillon et ciguatoxines 2 animaux par échantillon). Les symptômes des souris, spécifiques aux toxines en présence, sont observés. Le

délat de mort des souris (test de toxicité aigüe) permet de quantifier les toxines ou de statuer sur la toxicité globale de l'échantillon. Depuis 2010 le nombre de souris utilisées par an fluctue en fonction du nombre d'échantillons reçus par notre laboratoire. L'arrêt des confirmations systématiques et une meilleure programmation analytique permet de limiter le nombre d'animaux utilisés. L'estimation du projet porte sur 314 souris par an (1570 sur 5 ans) soit une diminution de 20% par rapport aux 5 dernières années. Par ailleurs pour répondre aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement de l'article R.214-105, les actions suivantes ont été mises en place : pour réduire le nombre d'animaux, les séries d'échantillons sont dimensionnées de façon optimale en fonction des délais de rendu des résultats; pour limiter la douleur/souffrance animale, la durée d'observation imposée dans les méthodes officielles n'est jamais prolongée, enfin pour remplacer à terme le bio essai sur souris, des méthodes alternatives sont en cours de développement dans notre laboratoire, notamment pour le dosage des ciguatoxines et des toxines paralysantes.

1803- La filière volaille de chair connaît des problèmes de production en élevage, liés à l'amélioration de la génétique des oiseaux associée à un fort développement musculaire au détriment du développement osseux. Cela conduit à une forte incidence de problèmes de locomotion notamment chez le poulet, posant des problèmes majeurs de bien-être ainsi qu'une augmentation de la morbidité voire de la mortalité chez ces animaux. Des facteurs nutritionnels sont connus pour soutenir ce développement osseux et améliorer la solidité osseuse, dont la vitamine D3. L'objectif de ce projet est de développer un produit à base de métabolites de la vitamine D3 dont sa forme active pour améliorer la solidité des os du poulet de chair, au cours de son cycle d'élevage et donc son bien-être. Pour comprendre l'effet de ce produit administré dans l'aliment il est nécessaire d'utiliser des poulets de chair car les effets des métabolites de la vitamine D3 sont dépendants du statut de l'animal en vitamine D3, mais également pour travailler directement sur l'espèce cible visée par l'utilisation de ce produit. Afin de pouvoir détecter 5% d'écart entre les différents lots testés et pour les différents paramètres sélectionnés il est nécessaire d'utiliser 57 poulets par lot pour que l'étude soit valide. Le nombre total d'animaux qui sera utilisé pour ce projet sera de 22800 poulets tout au plus. Si, au cours de ces essais, le bien-être des animaux était impacté négativement, toutes les méthodes appropriées seraient mises en œuvre afin de réduire au maximum la souffrance des animaux.

1804- Les objectifs initiaux du projet de recherche visent à mieux comprendre le rôle des cellules gliales entériques (CGE) dans le contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale (BEI) et de déterminer l'impact d'atteintes pathologiques des CGE dans le développement de lésions de la BEI. Ce travail s'est développé autour des résultats mettant en évidence le rôle clé des CGE dans le contrôle de l'homéostasie de la BEI : inhibition de la prolifération et de la perméabilité et augmentation de la cicatrisation. Ce projet vise à tester l'hypothèse selon laquelle des facteurs gliaux pourraient ralentir ou stopper le développement de colite. Le facteur glial testé sera la prostaglandine E2 (PGE2). Dans ce projet, nous souhaitons induire et mesurer le développement d'une colite comme c'est le cas pour les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Tout en tenant compte du principe des 3R (limitation des effectifs (3-4 animaux par groupes), raffinement des conditions d'hébergement des souris, remplacement quand possible), nous mettrons en place le modèle de colite (déjà bien décrit dans la bibliographie). De plus, si la souris présente 2 ou 3 signes cliniques; elle sera retirée de l'étude et euthanasiée. En cas de doute, nous ferons appel au responsable de la structure du bien être animal de l'établissement. Le poids des animaux sera également suivi quotidiennement dès le début du traitement. Si un animal perd plus de 10% de son poids initial (début de l'expérimentation), il sera retiré de l'étude et euthanasié. Dans cette étude, nous comparerons le développement de colite dans des souris dont le gène codant pour la mPGES1 (enzyme terminale de la voie de synthèse de la PGE2) a été invalidé dans les CGE des souris sauvages. La moitié de chacun des groupes recevra du Dextran Sodium Sulfate (manière aigüe ou chronique) pour développer une colite. Les expériences seront reproduites 3 fois de manière indépendante et ce projet nécessitera 96 animaux maximum.

1805- La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies musculaires (1/3500 naissances males). Elle est causée par un défaut dans le gène de la dystrophine, situé sur le chromosome X, résulte en une dégénérescence progressive du tissu musculaire. La maladie touche tous les muscles de l'organisme, y compris le muscle cardiaque et le diaphragme. Chez les patients DMD, la marche est définitivement perdue avant l'âge de 15 ans et le décès survient généralement avant 30 ans. Il n'existe pas de traitement curatif à ce jour sur le marché. La thérapie génique est une des approches envisageables pour le traitement de cette pathologie. Avant le passage chez l'homme, l'efficacité thérapeutique des approches de thérapie génique est aujourd'hui validée à l'aide essentiellement de deux modèles animaux de la DMD : la souris mdx et le chien GRMD (pour Golden Retriever Muscular Dystrophy), tous deux porteurs d'une mutation dans leur gène de la dystrophine. Ces 2 modèles, bien que largement utilisés, présentent cependant un certain nombre d'inconvénients :

- La souris mdx ne reproduit que partiellement les lésions tissulaires retrouvées chez les patients DMD et est relativement peu malade (espérance de vie équivalente à celle d'une souris saine).
- Le chien GRMD présente des lésions tissulaires proches et une évolution semblable à la maladie retrouvées chez les patients DMD, mais reste un modèle de gros animal coûteux et lourd à manipuler. Enfin, l'établissement de cohortes statistiquement significatives est quasi impossible. En 2014, un consortium de laboratoires, dont fait partie notre équipe a généré un nouveau modèle animal de la DMD : le rat DMDmdx. Cette lignée de rat, qui a été totalement caractérisée, se révèle être un très bon reflet de la pathologie humaine (atteintes supérieures à celles observées chez la souris mdx, comparables voire meilleures et plus reproductibles que celles observées chez le chien GRMD). Le rat, qui est 10x plus gros que la souris, reste malgré tout un modèle de petit animal de laboratoire qui est bien connu et qui ne présente pas les limitations du modèle canin. Ce modèle animal - le rat DMDmdx - peut donc se substituer au moins pour cribler la recherche de la dose thérapeutique au modèle

canin. Nous souhaitons tester 2 produits de thérapie génique conçus pour traiter la maladie en permettant l'expression d'une dystrophine de plus petite taille (une  $\mu$ dystrophine) mais fonctionnelle. Les deux produits (ou vecteurs) diffèrent par la nature de leur capsid : l'un est un AAV8 l'autre un AAV9. Les tropismes cellulaires et tissulaires sont différents et nous souhaitons connaître lequel des deux permettra une correction de la maladie à la dose injectée minimale. Notre projet consiste à injecter par voie intra veineuse les deux produits dans deux séries indépendantes de rat DMDmdx à des doses croissantes afin de déterminer la dose thérapeutique de chacun des produits testés et également de connaître leur biodistribution. Le projet prévoit l'utilisation de 116 rats au total. Par vecteur évalué, nous utiliserons un total de 50 rats mâles DMDmdx. Les injections seront étalées sur 4 à 6 mois au fur et à mesure que les animaux seront disponibles et inclus. Ils seront répartis en 5 groupes de 10 animaux chacun. Un groupe témoin (Groupe 1) recevra le milieu de dilution du vecteur (dPBS), les 4 groupes expérimentaux recevront 1E13vg/kg (Groupe 2), 5E13vg/kg (Groupe 3), 1E14vg/kg (Groupe 4), et 5E14vg/kg (Groupe 5). Les animaux seront injectés après leur sevrage (5-6 semaines d'âge) et gardés 3 mois post-injection (5 animaux par groupe) ou 6 mois post-injection (5 derniers animaux par groupe). Enfin, un groupe de témoins sains (n=5) issus de portées communes au rats DMDmdx sera inclus. Des analyses exhaustives seront réalisées chez tous les animaux afin d'évaluer l'efficacité du traitement à la fois au niveau histologique mais aussi phénotypique (évaluation de la force et de la fonction cardiaque). Une étude pilote précédent celle décrite ci dessus sera initiée en priorité pour s'assurer de l'absence d'immunogénicité de la  $\mu$ dystrophine humaine chez le rat. Ainsi, les 2 vecteurs AAV8 et AAV9 codant chacun pour la  $\mu$ dystrophine humaine (produit qui sera utilisé en clinique humaine) seront injectés par voie intra veineuse à la dose de 1E14vg/kg et les animaux seront euthanasiés 6 semaines post injection des vecteurs. Chaque vecteur sera injecté indépendamment à 3 rats DMDmdx et le groupe contrôle consistera en 3 rat DMDmdx recevant le milieu de dilution du vecteur (dPBS). Enfin, 3 rats sains Sprague Dawley seront également injectés avec les 2 vecteurs indépendamment à la même dose (1E14vg/kg) pour s'assurer également de l'absence de réponse immunitaire contre le produit humain. Cette information permettra le cas échéant d'utiliser le rat sain comme modèle animal pour l'étude réglementaire de toxicologie qui devrait survenir après l'étude de dose décrite ci dessus. En dehors du phénotype lié à la maladie, ce projet ne fait intervenir que des procédures légères et se termine par l'euthanasie des animaux (procédure sans réanimation). La constitution de groupes de 2x5 animaux dans l'étude principale (euthanasiés à 3 mois et 6 mois post injection du vecteur de thérapie génique) est basée sur notre expérience précédente de protocoles de thérapie génique lors desquels nous avons pu obtenir des résultats cohérents et reproductibles dans des groupes de cette taille. Cela semble être un nombre minimal qui permette d'assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en terme d'animaux à inclure. Une étude statistique est prévue dans ce projet.

1806- Les infections mammaires constituent la première pathologie de la vache laitière par leur fréquence et leurs conséquences. Elles entraînent des pertes économiques importantes, sont la première cause d'utilisation d'antibiotiques en élevage laitier, et sont une source d'inconfort pour les animaux. Un seul vaccin est disponible en Europe, et son efficacité est limitée. Le développement de vaccins efficaces est entravé par le manque de connaissances sur l'immunité mammaire, en particulier concernant la réponse immunitaire locale faisant suite à une vaccination. L'objectif du projet est de contribuer à combler cette lacune. Ce projet permettra de répondre à la nouvelle orientation des recherches indiquée par l'analyse des résultats obtenus dans un précédent projet. Ces résultats suggèrent que les événements qui conditionnent l'efficacité d'un vaccin contre les mammites sont déterminés par des cellules qui résident dans le tissu mammaire. Ce projet entraînera la réutilisation d'une partie des animaux du projet précédent. Ces animaux ont fait l'objet d'une infection mammaire expérimentale qui a entraîné une mammité clinique de sévérité modérée et de durée limitée (quelques jours). Tous les animaux se sont débarrassés spontanément de leur infection en moins de 10 jours, ont repris une production laitière normale et sont en bon état général. Dans le nouveau projet les vaches seront immunisées avec deux protéines selon deux schémas d'immunisation. Les animaux feront ensuite l'objet d'une inoculation de ces antigènes par le canal du trayon de façon à induire une réaction immunitaire antigène-spécifique. La dose utilisée induira une réaction inflammatoire locale fugace et d'intensité modérée. L'analyse de la réponse immunitaire sera orientée vers la réponse tissulaire locale. De façon à prélever du tissu mammaire à différentes localisations à un moment proche du déclenchement de la réaction locale, les animaux seront abattus quelques heures après l'inoculation intramammaire des antigènes. Un total de 14 vaches sera impliqué dans le protocole d'immunisation. Ces animaux seront soumis au protocole d'inflammation mammaire. La réutilisation de certains animaux permettra également de réduire le nombre de nouveaux animaux impliqués dans le projet. L'étude visant à caractériser la réponse tissulaire à une immunisation, il n'est pas possible de remplacer les études in vivo par des expériences in vitro. Il n'est pas possible non plus de réaliser ce projet en utilisant des rongeurs de laboratoire, car la transposition des résultats à la vache n'est pas bonne. Un avantage de ce dispositif expérimental est de réduire le nombre d'animaux impliqués. Cela est possible car plusieurs quartiers seront utilisés par vache, et deux antigènes différents pourront donner des indications complémentaires. Le prélèvement de la mamelle à l'abattoir permettra également de prélever du tissu à différents sites de la mamelle. Un autre avantage est de ne pas recourir à une infection expérimentale de la mamelle : les réactions locale et systémique à l'antigène sont d'intensité moindre, et la durée de la phase inflammatoire sera limitée à quelques heures. Afin de limiter le stress chez les animaux ceux-ci seront hébergés en stabulation conventionnelle sur paille avec aire d'exercice.

1807- Certains médicaments administrés par voie orale peuvent avoir une biodisponibilité faible, c'est-à-dire que seule une faible quantité passe dans le sang et peut agir sur sa cible. Le passage des composés dans l'estomac peut avoir un impact sur leur absorption. La technique décrite ici permet d'évaluer l'effet du passage des composés dans l'estomac en comparant les différences entre une administration intra-duodénale et une administration orale. Ainsi, deux cathéters sont implantés chez le rat, un dans le duodénum pour l'administration du composé à étudier et l'autre dans l'artère carotide (sang systémique)

permettant le prélèvement de petits volumes de sang tout au long de l'expérience, afin d'y doser la molécule d'intérêt. Dans le cas de la faible biodisponibilité d'un composé, l'effet du passage de l'estomac pourra être évalué en comparant les différences entre une administration intra-duodénale et orale. Ceci est particulièrement intéressant dans le développement d'un nouveau composé dont l'activité in vitro aura été prouvée au préalable, afin d'optimiser sa structure chimique et/ou sa formulation et ainsi améliorer sa faible biodisponibilité in vivo. La pose de cathéter dans l'artère carotide a plusieurs avantages : Scientifiquement, elle permet d'avoir des profils individuels complets pour limiter la variabilité interindividuelle, et sa réalisation in vivo permet de prendre en compte toute la complexité de l'organisme entier dans l'ensemble des phénomènes régissant la biodisponibilité d'un composé, ce qu'une étude sur modèles in vitro (culture cellulaire par exemple) ne permet pas. Ethiquement, les prélèvements par un cathéter sur l'animal vigile limitent le stress causé par l'anesthésie et les manipulations répétées des animaux. De plus, une cinétique dont tous les points sont réalisés sur un même rat permet de limiter le nombre d'animaux nécessaires et limite la variabilité des résultats. Enfin, seuls les composés d'intérêt sélectionnés après des tests acellulaires et cellulaires et répondant à des critères prédéfinis seront testés chez le rongeur. Ce projet est réalisé chez le rat car cette espèce possède un volume sanguin total autorisant les prélèvements multiples suffisants pour réaliser des dosages. Lors d'une étude, 4 animaux sont utilisés par dose et par composé, afin de prendre en compte la variabilité interindividuelle et pouvoir interpréter les résultats. Des mesures sont prises pour prévenir la douleur lors du réveil (administration d'analgésique) et pour limiter les contraintes lors de l'opération (anesthésie gazeuse pendant toute la durée de l'opération, planche chirurgicale chauffante pour limiter l'hypothermie lors de la chirurgie, gel ophtalmique placé sur chaque œil pour éviter leur dessèchement pendant l'opération). Ce projet concerne un total de 600 rats sur une durée de 5 ans.

1808- Dans l'optique de suivre par échographie (méthode non invasive) l'engraissement de veaux en réponse à différents régimes alimentaires nous souhaiterions mener une étude préliminaire par CT-Scan (computerized tomography) sur 3 veaux afin de localiser les dépôts de tissus adipeux les plus pertinents à étudier. Réduction : Il est prévu d'utiliser 3 veaux âgés de 1 à 3 semaines afin de ne pas fonder nos hypothèses sur l'observation d'un seul animal. Le fait de disposer de 3 animaux d'âges légèrement différents (1 à 2 semaines d'écart) nous permettra d'avoir une idée des sites de croissance initiaux chez le veau pendant la période périnatale. Raffinement : Puisqu'il s'agit d'animaux nouveaux-nés, les animaux ne seront pas mis à jeun avant l'anesthésie. Une intubation sera réalisée pour éviter tout reflux gastrique pendant la l'examen et un suivi constant de la température, du rythme cardiaque et de la respiration des animaux sera effectué par monitoring. Les examens au CT-Scan sont courts (de l'ordre de 15 minutes) mais si l'examen se prolongeait de façon imprévue, une perfusion de sérum glucosé serait administrée. Le réveil des animaux aura lieu dans une case capitonnée, dans le calme et dans une salle chauffée. Après le réveil effectif (environ 1 heure selon nos observations antérieures), le veau sera tout de suite ramené dans son box à l'élevage. Remplacement : très peu de données sont disponibles aujourd'hui sur la variation des indicateurs phénotypiques permettant de suivre la croissance des veaux de la naissance à la puberté. De plus, il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle mathématique prédictif qui nous permettrait de suivre la croissance des veaux, à l'échelle du tissu adipeux, en réponse à des régimes alimentaires différents.

1809- La pharmacocinétique a pour objectif d'étudier le devenir d'une substance active contenue dans une molécule après son administration dans l'organisme. Elle comprend quatre grandes étapes : l'absorption, la distribution dans le sang et les organes ciblés, le métabolisme (dégradation par l'organisme) et l'excrétion de la molécule et de ses métabolites. La réalisation de l'étude pharmacocinétique chez le rongeur permet de prendre en compte toutes ces étapes et donc la complexité de l'organisme entier ce qu'une étude sur modèles in vitro ne permet pas.

Les données obtenues grâce aux études de pharmacocinétique permettent la sélection des composés qui seront étudiés dans les études de pharmacologie, de choisir la voie d'administration, le schéma posologique (dose et fréquence d'administration) et la forme galénique pour obtenir la meilleure efficacité avec le minimum d'effets indésirables. En effet, aux concentrations trop faibles la molécule est inefficace, et aux concentrations trop élevées, les effets indésirables deviennent trop importants par rapport à l'efficacité.

Lors de ce projet, les études pharmacocinétiques seront réalisées chez le rongeur (rat, souris, gerbille ou cobaye selon l'indication thérapeutique étudiée).

Différents tests acellulaires et cellulaires in vitro permettent d'évaluer les composés disponibles en se basant sur leur efficacité et leur sélectivité. Certaines données pharmacocinétiques sont ensuite obtenues par des tests cellulaires (tests de perméabilité cellulaire, tests de stabilité métabolique, liaisons aux protéines plasmatiques ou aux tissus...). Ces tests permettent de sélectionner les meilleures molécules mais ne permettent pas une évaluation complète du profil pharmacocinétique. C'est pourquoi, les composés d'intérêt sélectionnés selon des critères prédéfinis lors de ces tests sont ensuite testés chez le rongeur.

Lors d'une étude pharmacocinétique, des prélèvements de sang sont réalisés à différents temps après l'administration d'un composé afin de mesurer les concentrations du composé ou de ses métabolites au cours du temps. Des prélèvements de liquide céphalorachidien sont envisageables pour étudier le passage du composé au niveau cérébral. Les urines et fèces peuvent également être récupérées afin de mesurer les concentrations au cours du temps et identifier les voies d'excrétion du composé. Enfin, des tissus peuvent être prélevés après sacrifice de l'animal pour explorer la distribution du composé.

L'administration du composé peut se faire par différentes voies choisies en fonction de l'objectif de l'étude, de la molécule à tester ou de l'indication thérapeutique : voie orale, sous-cutanée, intraveineuse, intrapéritonéale, intramusculaire, intradermique, cutanée, rectale, buccale ou oculaire.

Les prélèvements de sang sont réalisés au niveau de différents sites en fonction de l'espèce animale utilisée ou du volume à prélever : veine jugulaire, sublinguale, saphène, mandibulaire, caudale ou au niveau du sinus rétro-orbital. Les volumes prélevés sont limités par des normes éthiques strictes, en fonction du poids de l'animal et du temps de récupération nécessaire.

Certains prélèvements ou administrations pouvant générer du stress sont réalisés sur l'animal anesthésié.

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant un enrichissement pendant toute la durée de l'étude. Cependant, si les urines et fèces sont récupérées, les animaux sont isolés dans des cages à métabolisme.

Lors d'une première étude avec un nouveau composé, 3 animaux par temps de prélèvement seront prélevés. Selon la variabilité observée lors de cette étude, le nombre d'animaux par temps pourra être augmenté pour les études suivantes, afin d'interpréter correctement les résultats.

Ce projet concerne un total de 6000 souris, 4000 rats, 1000 gerbilles et 1000 cobayes sur une durée de 5 ans.

1810- Ce projet étudiera des cellules tumorales particulières, nommé "cellules souches cancéreuses" (CSC). Celles-ci, très mal connues, pourraient être les principaux responsables de la prolifération tumorale et des résistances aux traitements anticancéreux. Néanmoins, la difficulté à trouver des gènes spécifiques de ces CSC handicape la recherche. Identifier ces gènes, ou simplement mettre en évidence un gène important pour les CSC, permettrait de les suivre dans le développement tumoral pour comprendre leurs fonctions ou les cibler.

Nous voulons déterminer : 1) L'origine et les caractéristiques des CSC 2) Leur contribution dans la croissance tumorale? 3) Leurs résistances aux traitements anticancéreux et leurs implications dans la récurrence tumorale?

Pour répondre à ces questions, nous utiliserons le modèle murin K-ras et NSG. Les souris K-ras développent des tumeurs pulmonaires entre 10 et 12 semaines et ont une espérance de vie de 200 jours. Les souris NSG (espérance de vie de 59 à 95 semaines) sont une souche créée pour minimiser le rejet des greffes grâce à un système immunitaire déficient. De plus, nous nous concentrerons sur 2 marqueurs potentiels des CSCs : p16 et Oct4.

Le modèle K-ras sera modifié par ajout de gènes pour permettre 3 types d'expériences : A) le traçage et B) la suppression de lignée cellulaire ; C) étude de la récurrence tumorale par injection de médicaments anti-cancéreux après injection de cellules tumorales.

L'expérience A consistera à marquer les cellules souches (avec une protéine fluorescente par exemple) exprimant les gènes d'intérêt (oct4 et p16). Cette marque sera conservée dans la descendance de la cellule. On déterminera ainsi quels types de CSC sont présents (question 1), où elles sont situées dans la tumeur et quelle est leur descendance (question 1 et 2).

L'expérience B consistera à éliminer les CSC exprimant p16 et Oct4 grâce à l'expression d'un "gène tueur" nommé RosaDTT. On étudiera ainsi l'importance des différentes sortes de CSC dans le cancer (question 2).

Dans l'expérience C, nous traiterons les souris K-ras avec des médicaments anticancéreux pour induire une brève rémission suivie d'une récurrence tumorale. Les CSC à l'origine de cette récurrence seront isolées puis injectées dans notre second modèle murin, les souris NSG, afin d'étudier leur capacité à y développer une tumeur (question 2, 3).

Nous avons pris en compte le respect des 3R en choisissant le nombre de souris à utiliser, tant comme reproducteurs que comme animaux expérimentaux (1608). Nous l'avons réduit au maximum en utilisant les tests statistiques permettant de tirer le maximum de données exploitables à partir d'un effectif le plus réduit possible. D'autre part, certaines expériences seront organisées de façon séquentielle afin d'utiliser plus/moins de souris, en fonction des premiers résultats. De plus, nous utiliserons des grilles de scores et des contrôles quotidiens pour évaluer le bien-être des animaux et euthanasier rapidement les souris présentant un niveau inacceptable de mal-être. Nous utiliserons également des accessoires (abri en plastique, nestlets) pour diminuer le stress des animaux. Enfin nous éviterons de modifier les groupes de souris afin de ne pas perturber leur cohésion sociale.

1811- *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) est une bactérie Gram-négative responsable de 16% des cas de pneumonies nosocomiales, de 12% des infections urologiques iatrogènes, de 8% des infections de plaies chirurgicales et de 10% des infections sanguines. Les individus possédant un dispositif médical dans l'organisme (respirateur, sonde cathéter) ou les patients atteints de mucoviscidose, de leucémie ou de brûlures sont particulièrement sensibles à l'infection à Pa.

La prise en charge de patients ayant une infection à Pa est délicate en raison de la multirésistance de la plupart des souches aux antibiotiques et de l'absence d'émergence de nouveaux antibiotiques dans les dix ans à venir. La recherche actuelle s'oriente vers l'étude des facteurs de virulence (toxines impliquées dans la pathogénicité) et de leur mode d'action afin de limiter le processus d'infection. Notre projet de recherche s'inscrit dans ce contexte.

Pa dispose de plusieurs facteurs de virulence dont certains sont relativement bien caractérisés alors que d'autres, présents dans de nouvelles souches cliniques hyper-toxiques, restent à identifier.

Notre équipe s'intéresse depuis de nombreuses années aux systèmes de virulence de Pa et dispose de souches mutantes permettant de mieux les étudier. Notre laboratoire a pour mission de continuer à étudier activement dans les années à venir les mécanismes de toxicité de ce pathogène et à évaluer les nouvelles souches cliniques.

Les mutants produits sont testés en routine sur des cultures cellulaires et différents paramètres de leurs activités toxiques sont examinés. Cependant, les résultats in vitro sont insuffisants pour évaluer la toxicité globale. La toxicité des mutants les plus intéressants ou de certains isolats cliniques doit être évaluée in vivo dans des modèles d'infection pulmonaire bien caractérisés, dans un modèle rongeur, le poumon étant le principal point d'entrée du pathogène chez l'homme.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet, en provenance d'élevages reconnus, sont nés et élevés en captivité. Leur nombre (700 animaux pour l'ensemble des expériences sur 5 ans, soit environ 140 par an) a été réduit au minimum

nécessaire afin d'obtenir des données suffisantes pour évaluer l'effet de l'agent infectieux. Les lots sont de 5 ou 10 animaux suivant le type d'expérience réalisée et le test statistique employé pour analyser les résultats. Le pathogène est introduit dans les voies aériennes par inhalation réalisée sous anesthésie. Les protocoles d'anesthésie sont validés. Les animaux sont soit euthanasiés après quelques heures, soit suivis pour l'examen des symptômes infectieux. Des échelles cliniques journalières et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des animaux.

1812- *Cryptosporidium parvum* est un agent pathogène majeur responsable d'entérites diarrhéiques. Les ruminants représentent l'espèce de mammifères la plus concernée par la cryptosporidiose. Les bovins ont été incriminés plusieurs fois lors d'épidémies hydriques humaines. L'absence de traitements "pleinement efficaces" pour lutter contre cette maladie chez l'Homme et les animaux, couplée à l'absence de vaccins, a incité la communauté scientifique à poursuivre la recherche de nouvelles molécules "anti-cryptosporidiennes".

Il est maintenant bien établi que des polysaccharides naturels (les chitosans) ou d'autres produits naturels (les levures vivantes, le tannin de châtaignier, etc.) ont des effets "anti-cryptosporidiens" *in vitro*. Nous avons montré que ces molécules ne sont pas cytotoxiques et qu'elles inhibent le développement de *C. parvum* dans deux modèles *in vitro* de culture cellulaire de *C. parvum* (lignées cellulaires HCT-8 et Caco-2) par rapport à un témoin négatif non-infecté et un témoin positif (la paromomycine : molécule "anti-cryptosporidienne" de référence). Jusqu'à maintenant une cinquantaine de molécules ont été testées *in vitro*. nous avons retenu 30 molécules à tester *in vivo* (10 molécules par an). Ce sont les molécules non-cytotoxiques, ayant une activité "anti-cryptosporidienne" confirmée. Ces résultats doivent être confirmés et validés par des essais *in vivo*. L'objectif est d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques basées sur l'utilisation de produits naturels.

Le modèle que nous utiliserons est un modèle de souriceaux non sevrés infectés par *C. parvum*. Les souriceaux non sevrés sont, contrairement aux adultes, très réceptifs et sensibles à l'infection par *C. parvum*. Cette infection est asymptomatique et auto-résolutive, elle n'engendre donc pas de souffrance chez les animaux. Nous avons choisi d'utiliser des souris dont nous maîtrisons bien l'élevage et qui ont une prolificité importante (au moins 10 souriceaux par portée) permettant ainsi de réduire au maximum le nombre de femelles à utiliser.

Le projet se décline en deux procédures expérimentales :

La première procédure expérimentale correspond à la mise au point du modèle d'infection dans les conditions précises de l'unité expérimentale, et permettra de définir la cinétique précise de l'infection. Cette première procédure nécessitera 8 portées (8 adultes femelles et 4 adultes mâles) pour pouvoir suivre 80 souriceaux non-sevrés.

La deuxième procédure expérimentale permettra de tester les différentes molécules. Dans cette procédure, le nombre de portées et de souriceaux sera adapté en fonction des résultats de la première procédure afin de pouvoir observer une différence significative de 30 % entre la charge parasitaire des lots traités (sulfate de paromomycine, molécule à tester) et du lot témoin négatif. La deuxième procédure nécessite au maximum 6 portées pour pouvoir suivre 60 souriceaux non sevrés (20 souriceaux par lot). Pour ce faire, cette deuxième procédure nécessite au maximum 6 adultes femelles et 3 adultes mâles.

La deuxième procédure sera répétée 10 fois par an soit au maximum pour la deuxième procédure et pour un an : 600 souriceaux, 90 femelles et 30 mâles. Ce qui fait pour trois ans : 180 adultes femelles, 90 adultes mâles et 1800 souriceaux.

Ce projet nécessite en tout (pour les deux procédures expérimentales) et pour toute sa durée (3 ans) 1880 souriceaux non sevrés, 188 adultes femelles et 94 adultes mâles. Au final, le projet nécessite "2162souris".

Les expérimentations conduites seront faites dans le respect de la règle des 3R (ensemble de recommandations concernant les moyens à mettre en œuvre pour limiter l'utilisation des animaux : Remplacer, Réduire, Raffiner), en particulier, le nombre d'animaux est réduit au maximum grâce au préalable à une validation du modèle et en testant *in vitro* toutes les molécules naturelles, pour ne tester *in vivo* que les molécules d'intérêt. Les expériences seront réalisées par des personnes expérimentées et qualifiées afin d'éviter toutes fausses manipulations ou un éventuel stress pour les animaux. L'infection est asymptomatique chez les souriceaux, mis en cas de complications, le bien-être animal sera privilégié et l'euthanasie de l'animal pourra être effectuée.

1813- La grippe est une maladie virale fréquente et contagieuse causée par plusieurs virus à ARN de la famille des Orthomyxoviridae. Elle est responsable d'épidémies saisonnières et plus rarement de pandémies meurtrières.

L'objectif de cette étude est de tester l'efficacité de nouveaux « candidats vaccins » induisant une immunité croisée contre les différents virus de la grippe, dont le virus H1N1 et pouvant avoir des applications cliniques chez l'Homme à moyen terme. Les avantages de cette nouvelle stratégie vaccinale seront comparés avec le vaccin actuellement commercialisé et utilisé contre la grippe saisonnière (Vaxigrip®) chez l'Homme.

L'efficacité des « candidats vaccins » à induire une réponse immunitaire a déjà été démontrée par des études *in vitro*. Ainsi, le modèle animal est nécessaire pour apporter le maximum d'informations avant la réalisation d'essais cliniques chez l'Homme. Pour ce projet, le macaque cynomolgus a été choisi afin d'avoir d'une part une réponse vaccinale similaire à celle qui sera obtenue chez l'Homme et d'autre part un modèle d'infection par le virus de la Grippe comparable à la maladie humaine.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 40 animaux provenant d'élevages reconnus. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été réduit au maximum tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques adaptés aux petits effectifs pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (limitation des volumes de sang prélevés, prélèvements sous anesthésie...). Un hébergement individuel durant l'infection est nécessaire pour maîtriser les éventuelles surexpositions virales, les contaminations croisées entre individus. L'état fébrile des animaux n'excède pas deux semaines après l'infection.

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 alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

1814- L'insuffisance rénale chronique (IRC) induit précocement des troubles du métabolisme phosphocalcique, qui sont responsables à long terme d'atteintes osseuses et de calcifications vasculaires, source d'une morbi-mortalité importante. La calcification vasculaire médiale dans l'urémie et son effet sur la fonction musculaire lisse ou endothéliale est mal connue. Il est donc nécessaire de développer des études expérimentales sur modèle animal, pour mieux comprendre ces mécanismes physiopathologiques chez les patients IRC.

Au cours de ce travail expérimental, nous voulons développer un modèle de rat rendu insuffisant rénal chronique avec des calcifications vasculaires médiales, par induction d'un régime alimentaire enrichi en adénine et phosphore. Nous nous baserons sur des modèles publiés et reconnus par les sociétés savantes [1- 3].

Le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum tout en conservant un nombre suffisant pour pouvoir déterminer les meilleures conditions expérimentales. Ainsi 18 rats seront utilisés au total dont 8 animaux pour le groupe contrôle présentant une fonction rénale normale seront nourris avec un régime alimentaire standard et 10 animaux pour le modèle IRC induit par voie alimentaire enrichie en adénine (0,75%) et en phosphore (1,03%).

Un enrichissement de la cage d'hébergement sera effectué par l'ajout de frisettes de papier et/ou de nids végétaux. Les animaux seront sacrifiés après 8 semaines de régime alimentaire, par une injection intra-péritonéale d'une surdose de barbiturique afin de prélever des anneaux vasculaires aortiques et mettre en évidence une calcification médiale.

1815- Ce projet consiste en l'optimisation de l'immunogénicité d'un vaccin thérapeutique contre HBV dans un modèle murin.

L'hépatite B est une infection virale qui s'attaque au foie. Bien qu'un vaccin prophylactique efficace existe, le nombre de cas de personnes porteuses d'hépatite B continue de progresser, en particulièrement dans les pays en voie de développement. L'OMS estime que plus de 780 000 personnes meurent chaque année des conséquences de l'hépatite B aiguë ou chronique et plus de 240 millions de personnes souffrent d'une infection hépatique chronique. Bien que l'infection initiale soit le plus souvent asymptomatique ; dans 0,1-1% des cas, elle peut évoluer vers une hépatite fulminante souvent mortelle. Il n'existe pas de traitement spécifique contre l'hépatite B aiguë. Les soins visent à préserver le confort du malade et l'équilibre nutritionnel jusqu'à la guérison. Si l'infection n'est pas résolue durant cet épisode aiguë, à cause d'une réponse immunitaire spécifique trop faible, la maladie évolue vers un état chronique dans 2-10% des cas. Concernant les personnes atteintes d'hépatite B chronique, elles peuvent se voir prescrire des agents antiviraux mais aussi des injections d'interféron. Cependant de tels traitements ralentissent la progression des maladies dues à l'infection (exemple : la cirrhose) et prolongent la vie, mais ne permettent pas une rémission. En plus de nombreux effets secondaires sont associés aux traitements et dans certains pays, les coûts réduisent l'accessibilité à ces soins. Les nouvelles thérapies en essais actuellement visent le rétablissement de la réponse immunitaire spécifique du virus par administration de vaccin thérapeutique.

Notre projet vise l'amélioration d'un vaccin thérapeutique contre l'hépatite B chronique, qui a déjà montré un effet immunogène. Des réponses spécifiques cellulaires et humorales sont détectables chez la souris suite à l'administration du vaccin. En revanche de nombreuses administrations sont nécessaires à l'établissement de la réponse. Nous proposons d'optimiser notre produit avec l'ajout d'un adjuvant. Pour déterminer un nouveau modèle d'immunisation, nous qualifierons et quantifierons la réponse immunitaire spécifique. Pour cela, nous déterminerons les quantités minimales de produits nécessaires mais aussi le nombre d'administration minimale pour générer une réponse spécifique et durable.

Étant donné la complexité de l'établissement et du maintien des réponses immunitaires, la modélisation ne peut être rendue possible à ce jour qu'avec des organismes vivants, entiers et intégrés. Nous conduirons donc notre étude chez la souris C57Bl/6 avec un total de 671 animaux. Nous avons pris soin de déterminer ce nombre en nous basant sur une étude statistique pour décider du nombre minimal mais suffisant d'animaux par expérience. L'étude expérimentale a été aussi pensée pour réduire le nombre d'animaux en couplant plusieurs tests sur un même lot d'animaux. Finalement nous avons mis en place des solutions pour évaluer et garantir le bien-être des animaux.

Le besoin de nouvelles thérapies curatives pour l'hépatite B chronique est flagrant, notamment dans les pays en voie de développement. Grâce à cette étude, nous améliorerons notre produit et proposerons un vaccin thérapeutique contre l'hépatite B chronique avec un schéma d'administration simple.

1816- Malgré l'existence d'un vaccin pour lutter contre le virus de l'hépatite B cette infection virale reste une priorité de santé publique. Le nombre de personnes atteintes par ce virus est estimé à 240 millions dans le monde. Ces personnes porteuses sont un réservoir potentiel pour sa dissémination et présentent un fort risque de développer une cirrhose hépatique ou un hépatocarcinome. Plus de 780 000 personnes meurent chaque année des suites d'une infection par l'hépatite B.

Chez ces patients, la disparition des antigènes HBs (HBsAg) sériques signe l'élimination complète du virus ce qui permet l'arrêt du traitement, les risques de développement de complications hépatiques étant alors très faibles. Les traitements actuels parviennent à contenir l'infection mais la disparition complète des HBsAg n'est observée que chez 10% des patients. Le virus contenu le noyau des cellules sous forme d'ADN super-enroulé peut se réactiver dans le cas d'une immunodépression. C'est pourquoi il est important de développer de nouvelles approches thérapeutiques permettant l'élimination complète du virus.

Les tests in vitro, effectués pour valider l'efficacité de nouvelles molécules, ne permettent pas d'appréhender l'intégralité des mécanismes de l'infection et de l'interaction hôtes/pathogènes. C'est pourquoi, le recours à des modèles expérimentaux in vivo s'avère nécessaire pour tester les cibles et les composés et également anticiper leur éventuelle toxicité dans ces conditions complexes de relation hôte/pathogène

Afin d'étudier les mécanismes de l'infection et de la persistance du HBV in vivo et l'efficacité des approches thérapeutiques, nous avons choisi de mettre en place des modèles d'infection chez la souris. Ils sont basés sur l'injection du virus HBV couplé à un vecteur permettant le contrôle de son expression et sa localisation au niveau du foie. Ces modèles, sont considérés complémentaires des modèles in vitro pour la recherche de nouvelles molécules anti-HBV.

Le nombre d'animaux utilisés pour ce projet est de 12500 rongeurs pour 5 ans, avec des impacts de gravité légers à modérés sans réutilisation. Une observation quotidienne est réalisée pour tous les modèles, la fréquence de cette observation est adaptée selon la durée et la sévérité du modèle.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Les tests in-vitro sont développés pour répondre aux questions sur l'activité ou la toxicité des produits avant d'être évalués dans un modèle in vivo. En effet, à ce jour, il n'existe aucune méthode évitant totalement le recours à l'animal selon les exigences réglementaires de tous les pays de destination des produits.

Réduction :

Le schéma expérimental des procédures de ce projet s'appuie sur des données bibliographiques. Ces expériences feront l'objet d'une revue par des biostatisticiens afin de calculer au plus juste le nombre d'animaux à utiliser tout en permettant un support au dossier réglementaire «Common Technical Document».

Raffinement

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement, dans des locaux conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé. Dès que possible, une anesthésie générale ou locale est pratiquée et des points limites sont mis en place dans les études pour limiter la souffrance des rongeurs.

1817- La leishmaniose cutanée est une zoonose transmise aux humains par un insecte volant, le phlébotome. La maladie se manifeste par des ulcérations cutanées localisées disgracieuses, non douloureuses. Ces dernières évoluent ensuite lentement vers la guérison en laissant des cicatrices disgracieuses sur les parties découvertes du corps. Cette maladie est liée à la pauvreté et se retrouve au Moyen Orient, Afrique du Nord et Sud saharienne, Sud de l'Asie centrale et Amérique du Sud. Entre 0.7 et 1.2 million de personnes sont atteintes chaque année. Le traitement actuel pour accélérer la guérison fait appel à des médicaments anciens à base d'antimoine injectés dans les lésions. Nous développons des formulations à base d'un antileishmanien de référence. Ces formulations se sont révélées actives in vitro sur le parasite et nous voulons vérifier leur activité à l'aide d'un modèle animal (*Leishmania major* chez la souris BALB/c femelle) avant de lancer le développement d'un nouveau traitement chez l'homme. Le modèle consiste à injecter des éléments infectieux par voie sous cutanée à la base de la queue chez la souris et à mesurer la taille des lésions obtenues (la lésion est indolore) quelques semaines après. La vitesse de décroissance ou de guérison des lésions se fait en mesurant la taille des lésions chez les souris traitées et en comparant ces tailles à celles observées sur les souris non traitées. Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement).

Une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude, et pour avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet.

Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress.

Le développement de l'infection cutanée leishmanienne est une somme de processus physiopathologiques complexes découlant d'interactions vasculaires, tissulaires, cellulaires et moléculaires formant de nombreuses barrières pharmacologiques. Le recours à l'animal est indispensable pour évaluer l'activité de nouvelles formulations médicamenteuses. Il n'existe à ce jour aucun modèle in vitro capable de reproduire la complexité de ce processus. Deux cents souris seront employées pour ces essais.

1818- Chez l'homme, l'exposition à un stress intense et traumatique peut induire un syndrome de stress post-traumatique (ou PTSD pour «post-traumatic stress disorder») chez certains individus. L'une des caractéristiques de ce syndrome est la trop longue persistance dans le temps des souvenirs du trauma, ce qui est généralement considéré comme représentant un déficit d'oubli de ce type de souvenirs chez les patients. Chez l'animal, ce type de mémoire traumatique peut être stimulée en utilisant un test de conditionnement aversif dans lequel les animaux seront mis dans une situation stressante (courts chocs électriques aux pattes). Le fait de les remettre le lendemain dans le même environnement va induire un rappel de ce qu'ils ont vécu et une réaction (immobilité) qui peut être assimilée à un comportement de peur.

Le but de ce projet est d'identifier des composés capables de bloquer le développement de ce syndrome PTSD chez l'homme, en évaluant leur capacité chez le rat à atténuer efficacement ou au mieux bloquer cette mémoire. Pour cela, lors d'une première étape, les conditions expérimentales du test seront validées chez des animaux contrôles ou administrés avec un produit de référence positive (procédure 1). Ensuite (procédure 2), ce protocole sera utilisé pour tester des nouveaux composés. Au cours de chaque étude, les animaux (un nombre prévisionnel total de 1500 rats sur 5 ans) seront évalués dans ce test de



conditionnement aversif. Le candidat médicament sera administré soit avant la phase de conditionnement soit avant la phase de test. A la fin de chaque étude, des prélèvements de sang ou de tissus pourront être effectués.

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur ce type de mémoire émotionnelle. Or avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'un candidat médicament. A ce jour, le rat est l'une des espèces (avec la souris) qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude car présentant une réponse robuste et reproductible.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

1819- Notre projet vise à mesurer in vivo dans la souris de souris l'inocuité et l'efficacité de nouveaux protocoles de thérapie cellulaire et génique de 9 déficits hématopoïétiques héréditaires.

Les déficits hématopoïétiques héréditaires sont causés par des mutations dans un gène et touchent principalement une population d'âge pédiatrique. Ils peuvent affecter le développement ou la fonction des cellules du sang (lymphocytes, granulocytes ou globules rouges). A l'heure actuelle, le seul traitement curatif est la greffe après chimiothérapie de cellules souches hématopoïétiques (CSH) provenant d'un donneur sain (plus communément appelée greffe de moelle osseuse). L'efficacité de ce traitement repose sur le degré de compatibilité tissulaire entre le donneur et le receveur. La mortalité peut atteindre 50%, causée principalement par les infections virales qui profitent de la lenteur de la reconstitution du compartiment lymphocytaire T.

Trois traitements seront testés:

- 1) L'accélération de la production de nouveaux lymphocytes T après greffe de CSH, en cultivant les CSH avant de les greffer dans un milieu qui les engage dans la voie de différenciation T;
- 2) la thérapie génique c'est-à-dire la greffe de CSH du patient lui-même après correction par transfert d'une copie du gène sain. Cette alternative à la greffe de CSH à partir d'un donneur sain a prouvé son efficacité dans le traitement de 3 déficits hématopoïétiques héréditaires,
- 3) une combinaison des deux protocoles, transfert de gène et préculture dans la voie de différenciation T.

La mise au point de ces protocoles innovants nécessite une étape chez l'animal afin de vérifier in vivo leur efficacité et leur innocuité. La souris NSG est le seul modèle animal qui tolère la greffe des CSH humaines et permet leur différenciation dans toutes les lignées du sang. Les souris seront greffées soit dans les 3 jours suivant la naissance, soit entre 4 et 8 semaines.

Des groupes de 3 à 4 souris (nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs) seront greffés avec les cellules corrigées et/ou cultivées en condition de différenciation T ou avec des cellules non corrigées et/ou non cultivées comme contrôles. Le nombre total d'animaux à greffer s'élève au maximum à 624. Les patients étant souvent très jeunes (moins de 1 an), les prélèvements de moelle osseuse sont d'un volume réduit (moins de 5ml) et le nombre de CSH à greffer également très faible ; notre expérience montre que c'est l'accès aux cellules de patients qui limite le nombre de souris greffées et incluses dans les protocoles.

Ces animaux seront hébergés tout au long de l'étude dans des cages enrichies à l'aide de coton et d'abris en carton dans un environnement exempt d'organisme pathogène. Toutes les manipulations induisant la douleur chez l'animale (Injection intraveineuse et prélèvement du sang via le sinus retro-orbital) ainsi que l'euthanasie seront précédées par une anesthésie générale.

Les résultats de ces expériences nous permettront de compléter les dossiers réglementaires pour les futurs essais cliniques de thérapie génique ou de thérapie cellulaire chez les enfants atteints de déficits hématopoïétiques héréditaires sévères.

1820- Franchissement de la barrière d'espèce par le virus rabique (EBLV-1a) de chauve-souris

La rage est une maladie due à l'infection par un virus. Tous les mammifères sont sensibles à la rage et peuvent la transmettre par morsure, le virus étant excrété dans la salive. De plus certaines espèces domestiques (chiens) ou sauvages (renards, chiens viverrins, certaines espèces de chauves-souris) sont à la fois vectrices et réservoirs de "souches" virales qui leur sont très bien adaptées. La rage est une maladie toujours mortelle dès que les signes cliniques sont apparus, elle est à l'origine de 50 000 à 75 000 décès annuels dans le monde, principalement en Afrique et en Asie, le plus souvent suite à une morsure de chien. Le traitement antirabique administré chez les personnes exposées au virus est une vaccination dont le but est de rendre résistant l'individu contaminé avant que le virus n'atteigne le système nerveux central. Dans le monde, 12 des 14 espèces reconnues de virus rabique ont été isolées chez des chauves-souris. En Europe, 3 virus différents ont été isolés chez des chauves-souris : EBLV-1 (European Bat Lyssavirus type-1), EBLV-2 et BBLV (Bokeloh Bat Lyssavirus). La majorité de ces cas de rage chez les chauves-souris est causée par un des 2 variants du virus EBLV-1. Huit cas de franchissement de la barrière d'espèce ont été observés en Europe: 3 cas humains avec EBLV-2 et EBLV-1 et 2 moutons, 1 fouine et 2 chats avec le variant EBLV-1a. La majorité des études épidémiologiques, moléculaires et de pathogénicité concerne RABV, à l'origine des cas humains. Peu d'études expérimentales ont été menées i) sur des carnivores sauvages et domestiques avec les virus isolés des chauves-souris., ii) sur le franchissement de la barrière d'espèce par les virus EBLV.

Nous nous proposons d'utiliser le modèle renard afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec les études publiées et le variant EBLV-1a qui a seul franchi, de manière naturelle, la barrière d'espèce. Le projet est divisé en deux études. L'étude préliminaire porte sur un nombre limité d'animaux (3), afin de vérifier la pathogénicité réelle de ce virus pour le renard. Si des cas positifs sont observés, une seconde étude dose-effet sera entreprise sur 15 animaux. Après inoculation, l'excrétion salivaire et le titre en anticorps seront suivis régulièrement. Tous les animaux qui développeront la maladie seront examinés au moyen des techniques de diagnostic de référence et des techniques moléculaires. Les animaux survivants seront euthanasiés à la fin de la période d'observation car pour montrer l'absence de réplication du virus, le diagnostic se fait sur le cerveau. Cette expérimentation ne peut être entreprise que chez l'animal, le renard étant le modèle de choix. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux, la seconde partie du projet ne sera entreprise que si la première est validée (au maximum utilisation de 18 renards). A partir du moment où les signes cliniques seront fortement évocateurs de la rage, les animaux seront euthanasiés. Le personnel impliqué dans la manipulation des animaux est formé et entraîné, ce qui garantit à la fois la maîtrise du risque d'accident et des manipulations dans de bonnes conditions pour les animaux.

1821- Chez l'homme, des anomalies d'une copie du gène C9ORF72 sont impliquées dans le développement de la sclérose latérale amyotrophique, une maladie très invalidante, conduisant à une dégénérescence mortelle des motoneurons. Afin d'étudier cette maladie nous avons reproduit une anomalie génétique (knockout) de C9orf72 chez la souris. De manière inattendue, nous observons que les animaux ayant perdu les deux copies du gène C9orf72 développent une lymphadénopathie, c'est à dire un grossissement de leurs ganglions lymphatiques (en particulier des ganglions cervicaux). Des études complémentaires histologiques et de tri de cellules montrent une prolifération excessive des cellules immunitaires de type lymphocytes (globules blancs) dans ces animaux. Nous souhaiterions donc savoir si ces lésions sont dues à un effet direct de la mutation du gène C9orf72 sur les cellules immunitaires, ou s'il s'agit d'une réaction du système immunitaire à un dérèglement de cellules ou d'organes non immunitaires.

Pour répondre à cette question, nous proposons d'utiliser un protocole d'étude couramment utilisé par les équipes de recherches qui étudient la fonction de cellules immunitaires : le transfert de moelle osseuse dans des souris hôtes irradiées. L'irradiation tue les cellules immunitaires de l'animal et le transfert de moelle osseuse rétablit un nouveau système immunitaire.

Nous allons générer deux types de souris: des souris mutantes (knockout) pour C9orf72 possédant un système immunitaire normal (chimères de type I), ou des souris normales possédant un système immunitaire mutante (knockout) pour C9orf72 (chimères de type II). Si nous observons un développement ganglionnaire chez les souris de type I, cela indiquera que le dérèglement primaire n'est pas d'origine immunitaire. Si par contre ce développement est observé chez les souris de type II (cellules provenant de souris C9orf72 mutées transférées dans des souris contrôles), cela indiquera un défaut primaire de prolifération des cellules immunitaires.

En conclusion, il s'agit d'une expérience importante pour notre projet car si nous confirmons que l'altération des ganglions et de la prolifération cellulaires est propres aux cellules immunitaires, ces souris C9orf72-/- pourraient alors constituer un excellent modèle pour étudier l'apparition de lymphome (cancer du « sang ») et pouvoir alors tester des stratégies thérapeutiques pour ce type de cancer. Enfin, nous espérons aussi que ces travaux permettront de mieux comprendre la fonction de ce gène et pourquoi il est muté chez les patients atteints de sclérose latérale amyotrophique.

Remplacement :

Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser un modèle souris, car aucun modèle in vitro ou de culture cellulaire ne nous permet d'étudier l'hyperplasie des ganglions lymphatiques observés dans les souris mutées pour C9orf72.

Raffinement :

Afin de limiter la douleur induite par une éventuelle croissance des ganglions lymphatiques, nous n'étudierons que les premières étapes de ce processus et les animaux seront sacrifiés avant que la phase terminale de la maladie n'apparaisse. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient mis à mort pour éviter toute souffrance.

Réduction :

Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir que l'étude de vingt souris au total permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

1822- Malgré l'existence d'un vaccin préventif, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) demeure un problème de santé publique avec environ 240 millions de personnes infectées chroniquement dans le monde et risquant de développer une cirrhose voire un cancer du foie. Aujourd'hui environ 1 million de décès/an dans le monde sont dus aux conséquences hépatiques de l'infection chronique par le VHB. Le traitement actuel le plus utilisé est un traitement « à vie », basé sur des analogues de nucléosides permettant de contrôler la réplication virale et l'évolution de la maladie mais ne permettant pas l'élimination du virus, qui persiste dans les cellules infectées. Nous estimons aujourd'hui un taux de guérison de 3 à 5% chez les patients traités ; il existe donc un réel besoin médical de développer de nouvelles approches thérapeutiques permettant d'augmenter ce taux. Par ailleurs il a été montré dans de nombreuses études que l'élimination du virus implique que le patient développe une forte réponse immunitaire. De ce fait, les approches de type immunothérapie qui permettraient d'induire une réponse immunitaire appropriée sont très favorisées.

Notre laboratoire développe actuellement un produit d'immunothérapie de ce type, basé sur un vecteur viral non répliquatif codant pour des antigènes du VHB, et qui a été sélectionné pour un développement clinique chez l'homme.

Nous avons transféré récemment dans notre laboratoire un modèle murin d'hépatite B chronique et nous avons démontré l'effet antiviral de notre produit d'immunothérapie dans ce modèle. Dans le cadre du développement de ce produit, nous avons aujourd'hui pour but d'évaluer la possibilité d'augmenter l'effet antiviral par une combinaison de notre produit d'immunothérapie avec des immunomodulateurs.

Le seul modèle animal infectable par le VHB est le chimpanzé mais son utilisation pour tester des candidats d'immunothérapie est exclue pour des raisons éthiques. Le modèle murin représente une bonne alternative. Bien que non-infectable par le VHB, le modèle que nous avons transféré et mis au point permet d'induire une hépatite chronique chez la souris par l'infection avec un virus assistant modifié et permet ainsi de tester des effets immunologiques et antiviraux du produit d'immunothérapie. Ce modèle ressemble fortement à l'infection chronique par le VHB chez l'homme permettant de mimer notamment la phase de portage chronique immunotolérant/non-inflammatoire qui est décrite chez les patients infectés par le VHB.

A l'heure actuelle, aucun modèle in vitro ne peut se substituer au modèle murin dans notre étude. Le nombre de souris utilisé dans ce projet sera néanmoins réduit à son minimum sans pour autant compromettre les objectifs du projet. Enfin, les conditions d'hébergement et d'enrichissement des cages, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées pour respecter le bien-être animal et limiter au maximum la souffrance subie par l'animal.

Ce projet inclura au total 1392 souris maximum.

1823- Des milliers de femmes enceintes, patientes et professionnelles, sont exposées chaque année à des rayonnements ionisants. Les doses les plus fortes, comme celles reçues dans le cadre de procédures thérapeutiques, peuvent entraîner un préjudice important pour le fœtus.

L'exposition à des radiations ionisantes durant la vie foetale ou adulte entraîne le développement de différentes pathologies du cerveau, telles que des malformations, des retards mentaux, des altérations des capacités cognitives et des tumeurs. Une large part de ces pathologies pourrait dépendre de l'atteinte des cellules souches et des progéniteurs nerveux (CSPN).

La compréhension des effets des irradiations sur le développement du cerveau d'un fœtus est un enjeu de santé public important. Ces études devraient apporter de nouvelles connaissances scientifiques qui, à terme, interviendraient dans la prévention des risques et favoriseraient la mise en place de thérapie pour soigner les cancers, éviter les altérations du cerveau...

Lors d'études récentes il a été montré que les rayonnements ionisants induisent une dérégulation dans l'expression de gènes particuliers entraînant une modification du processus de renouvellement cellulaire. Ce projet vise à étudier les gènes impliqués et leur rôle dans le renouvellement cellulaire afin de mieux comprendre quels peuvent être les conséquences d'une irradiation sur le cerveau en développement.

Dans cette étude, le recours à des animaux est guidé par la nécessité de comprendre les mécanismes d'action, complexes et impossible à modéliser, des cellules souches neurales dans le cortex embryonnaire chez un modèle rongeur.

Une injection d'un fragment d'ADN dans le ventricule du cerveau d'un fœtus est pratiquée par électroporation (méthode de transfert de gènes in utero), suivie d'une irradiation, ce qui nous permettra :

1-d'étudier l'implication des gènes d'intérêt dans le développement du cortex de l'embryon

2-d'étudier la localisation et le devenir des cellules déficientes pour les gènes d'intérêt.

Les résultats obtenus seront comparés avec ceux d'une population d'animaux témoins.

Pour cela, le projet prévoit le recours à 900 femelles gestantes (180 animaux par an) provenant d'élevages autorisés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum nécessaire compatible avec l'utilisation de tests statistiques adaptés à notre étude.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ainsi que les méthodes expérimentales ont été choisis et validés par une équipe vétérinaire afin d'éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Toutefois, l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience, et des critères d'arrêt ont été définis pour prendre en compte d'éventuels effets inattendus.

1824- L'exploitation des gisements pétroliers profonds se développe depuis plusieurs années. Au cours de l'accident de la plateforme pétrolière Deep-Water Horizon dans le golfe du Mexique des dispersants chimiques ont été utilisés à grande profondeur (1500m de fond) pour limiter la formation de nappes de pétrole en surface ; or il n'existe aucune donnée sur les effets des dispersants chimiques sur des organismes susceptibles d'être exposés à d'importantes pressions hydrostatique comme peuvent l'être les espèces de fond ou les nombreuses espèces effectuant des migrations verticales dans la colonne d'eau.

L'objectif de ce travail est d'analyser en pression les effets d'une formulation commerciale de dispersant en présence d'un fuel de référence (Brut Arabe Léger, BAL) sur la capacité d'une espèce de poisson modèle, le turbot *Scophthalmus maximus*.

Les animaux seront exposés à une plongée simulée en caisson hyperbare (100 bars, l'équivalent de 1000 m de profondeur). Puis l'effet d'une contamination par hydrocarbure dispersé sera évalué à travers leur consommation d'oxygène. 360 turbots ont été utilisés dans le précédent projet APAFIS 1001. Lors de la réalisation de cette expérimentation, l'obtention de concentrations en hydrocarbures stables et reproductibles en pression et en présence d'animaux s'est avérée extrêmement difficile : c'est pourquoi le présent avenant nécessite d'utiliser 330 animaux supplémentaires afin de compléter l'étude précédente.

Les expérimentations seront réalisées dans le respect de la règle des 3R :

- Il s'agit d'une étude écophysiologique des effets métaboliques et intégrés au niveau de l'organisme pour laquelle le remplacement est impossible.

- néanmoins, le nombre d'animaux utilisés est limité au minimum permettant une étude statistique cohérente.
- Le raffinement est respecté au niveau des conditions d'hébergement des animaux et au niveau des procédures d'euthanasie.

1825- Le but de ce projet est de tester de nouvelles molécules permettant de moduler le métabolisme du glucose dans le cadre d'un traitement pharmacologique de la glycogénose de type 1. Cette maladie rare se caractérise par une absence de production de glucose par l'organisme. Les patients souffrent donc d'hypoglycémies sévères et de pathologies associées à l'accumulation de glycogène et de lipides dans le foie et les reins. Nous disposons d'un modèle de souris viables présentant toutes les caractéristiques de la pathologie hépatique de la glycogénose de type 1. Ce modèle animal est unique et nous permettra de tester l'efficacité de deux nouvelles molécules qui ciblent le métabolisme du glucose. Pour analyser leur effet thérapeutique, ces molécules doivent être injectées chez l'animal avant de proposer de nouvelles perspectives de traitement des patients atteints de glycogénose de type 1. La non toxicité de ces molécules a été vérifiée préalablement in vivo chez des souris non transgéniques.

Ce projet nécessite l'obtention de 48 souris transgéniques présentant la pathologie hépatique de la glycogénose de type 1. L'étude sera réalisée sur 12 mois au maximum, selon la disponibilité en souris transgéniques. Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir de nos connaissances de la pathologie dans ce modèle animal. Les molécules seront injectées par voie intraveineuse ou en sous cutanée de façon hebdomadaire pendant 15 semaines.

Dans un souci de raffinement des méthodes, les souris seront hébergées par groupe de 4, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les animaux sont manipulés régulièrement, observés quotidiennement et pesés toutes les semaines pour suivre leur prise de poids. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever les organes d'intérêt.

En conclusion, ces expériences réalisées in vivo pourront permettre de proposer de nouvelles approches thérapeutiques dans le cadre de la glycogénose de type 1a.

1826- Les rongeurs sont régulièrement utilisés pour la recherche pre-clinique dans le domaine de la santé humaine. Ils sont notamment inclus dans des études de biocompatibilité ou d'évaluation de la résorption locale d'un produit d'intérêt médical dont le but est de déterminer la réponse de l'organisme au niveau du site d'administration (évaluation des réactions locales et/ou suivi de la résorption du produit).

En tant que sous-traitant de l'industrie pharmaceutique, nous proposons à nos clients de réaliser la phase expérimentale de leurs études.

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

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

Chaque prélèvement et administration se fera sous anesthésie générale et leur nombre sera toujours réduit au minimum.

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

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés par groupe de 2 ou 3 dans des cages comprenant de la litière et du matériel d'enrichissement (ex: tubes, bois à ronger...). Toute intervention sur l'animal (prélèvement sanguin ou administration) se fera sous anesthésie générale. Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place pour l'observation générale des animaux et la détection précoce pour une prise en charge rapide d'éventuels effets secondaires (observation de l'état de santé général, consommation alimentaire...).

1827- Les nouveaux médicaments ou substances chimiques susceptibles d'affecter la santé humaine doivent, conformément à la loi, être testés sur des animaux. Ces tests de sécurité fournissent des informations cruciales pour planifier les essais sur l'homme et ne représentent qu'une part infime du processus de développement pour un nouveau médicament.

Les tests de toxicité aiguë sont les premiers tests de sécurité: on administre aux animaux une dose unique du composé à l'essai. L'objectif est de définir l'intervalle entre la dose qui ne provoque aucun effet indésirable et la dose mortelle. Parmi ces tests, on trouve la dose maximale tolérée (DMT) qui est la dose qui provoque un effet toxique minime mais qui n'affecte pas la survie des animaux.

Le but de cette étude pilote est de déterminer in vivo la DMT de deux composés thérapeutiques. Pour ce faire nous utiliserons pour chaque composé : 18 souris scindées en 6 sous groupes de 3 animaux, pour un total de 36 souris C57BL6.

Ce projet se fait selon le respect de la règle des 3 R. La toxicité des deux composés a dans un premier temps été testée in vitro sur des cellules sanguines saines et de patients (principe de remplacement). Le nombre d'animaux (3 souris\*12 groupes) répond aux exigences de la réglementation qui préconise d'utiliser un nombre d'animaux limité (principe de réduction). Les

procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux en assurant des soins et une médication appropriée (principe de raffinement)

1828- Le primate est un modèle de choix pour l'étude de nombreuses pathologies, comme par exemple les fièvres hémorragiques ou encore le SIDA. Dans le cadre de ces études, l'accès à des données physiologiques comme la température et l'obtention d'échantillons biologiques sont primordiaux. En revanche, le confinement biologique nécessaire à l'étude de ce type de pathologies rend toute manipulation des animaux difficile.

Dans le cadre de la démarche des 3Rs, l'implantation de sondes de température et de cathéters à demeure avec chambre sous-cutanée représenterait un raffinement des techniques déjà utilisées améliorant considérablement le bien-être des animaux (animaux non contraints pour le suivi continu de la température, réduction importante de la douleur induite par des injections ou des prélèvements multiples) mais serait également une amélioration des conditions de travail des manipulateurs.

Cette demande d'autorisation de projet concerne les procédures d'implantation de sondes de température et de cathéters à demeure avec chambre sous-cutanée pour 60 primates/an sur 5 ans.

1829- La diarrhée est une quantité de selles émises dans un volume plus important que la normale (plus de 300 grammes par jour) et avec une plus grande fréquence (plus de trois selles par jour). Les selles sont généralement liquides, mais parfois simplement molles, accompagnées de glaires ou de sang et d'un cortège de symptômes variables dépendant de la cause de la diarrhée. Il est même possible dans certains cas que ce ne soit que de l'eau ou un liquide transparent. Les diarrhées sont généralement accompagnées de douleurs et de crampes aux intestins qui peuvent rendre le sujet mal à l'aise, ainsi que de frissons et de sueurs froides dans certains cas. Les diarrhées sont la seconde cause de mortalité infantile dans les pays du tiers monde (après les pneumonies), et sont responsables de 18 % des morts d'enfants de moins de 5 ans.

Les causes de la diarrhée peuvent être d'origines différentes : infection digestive virale (gastroentérite), intolérance alimentaire (lactose, sorbitol, gluten...), anxiété ou émotion intense (terreur ou stress), effet secondaire de certains médicaments (antibiotiques), résultante d'une maladie (colopathie, maladie de Crohn, rectocolite hémorragique, syndrome du côlon irritable...), certains traitements (radiothérapie, chimiothérapie),...

Parmi les médicaments permettant de traiter la diarrhée figure le loperamide, plus connu sous le nom d'imodium. Il agit en modifiant le fonctionnement des nerfs de l'intestin en vue de diminuer la quantité de matières fécales produite, ralentir la fréquence des selles en agissant sur la motilité intestinale, rendre les excréments plus solides en limitant la réabsorption d'eau, et atténuer les crampes. Mais ce médicament ne peut pas être prescrit pour toutes les causes à l'origine de la diarrhée, pour les personnes souffrant d'allergie à ce médicament ou à l'un de ses ingrédients, et il peut présenter des effets secondaires plus ou moins importants.

L'intérêt est donc le développement de produits naturels sous forme d'extrait de plantes ou de compléments alimentaires ayant des effets anti-diarrhéiques avec une bonne tolérance et sans effets secondaires.

L'objet de ce projet est donc d'étudier les effets du produit naturel LR, dont nous avons déjà démontré les effets anti-diarrhéiques avec une dose-dépendance, administré à 2 doses ayant démontré ces effets, sur la motilité intestinale et sur la réabsorption d'eau au niveau de l'intestin chez des rats mâles Wistar adultes, en comparaison avec des molécules de référence, l'atropine et le loperamide. Cette étude nécessite l'utilisation d'animaux car aucun modèle in vitro n'existe pour étudier les effets anti-diarrhéiques de substances (remplacement).

Un total de 64 rats est nécessaire pour ce projet, répartis en 2 séries de 32 rats chacune, chaque série étant divisée en 4 groupes de 8 rats chacun, correspondant au nombre d'animaux minimum (réduction) permettant une analyse statistique des résultats obtenus (raffinement). Les animaux sont placés à 2 par cage pour les 2 séries expérimentales et ils sont mis à jeun la veille au soir de la réalisation du test.

Pour la série sur la motilité intestinale, le jour du test les animaux sont traités avec une administration orale du produit naturel LR aux 2 doses testées, d'atropine (produit de référence diminuant la motilité intestinale) ou d'eau (produit sans effet), et une heure plus tard ils reçoivent, toujours par administration orale, une solution de charbon de bois. Une heure après traitement avec la solution de charbon de bois, l'ensemble des animaux est mis à mort par dislocation cervicale sous anesthésie gazeuse. L'abdomen est ouvert pour ligaturer l'intestin grêle au niveau de l'estomac et du caecum. L'intestin grêle est prélevé et la longueur totale de l'intestin grêle est mesurée entre les 2 ligatures et la distance parcourue par le charbon de bois dans l'intestin grêle depuis l'estomac est également mesurée.

Pour la série sur l'accumulation des fluides (méthode appelée "enteropooling"), le jour du test les animaux sont traités avec une administration orale du produit naturel LR aux 2 doses testées, de loperamide (produit de référence diminuant la réabsorption d'eau au niveau intestinal) ou d'eau (produit sans effet), et une heure plus tard ils reçoivent, toujours par administration orale, de l'huile de ricin. Une heure après traitement avec l'huile de ricin, l'ensemble des animaux est mis à mort par dislocation cervicale sous anesthésie gazeuse. L'abdomen est ouvert pour ligaturer l'intestin grêle au niveau de l'estomac et du caecum. L'intestin grêle est prélevé, il est pesé plein, puis il est vidé de son contenu intestinal dont le volume est mesuré, et l'intestin grêle vidé est à nouveau pesé.

L'expérimentation étant de très courte durée, sur 2 heures, les seuls points limites identifiés pourraient être des convulsions, tremblements ou paralysie des animaux suite à l'administration orale des produits à tester, nécessitant la mise à mort des animaux qui serait effectuée en conformité avec les recommandations éthiques.

1830- L'incidence du cancer vulvaire a augmenté en Europe de 10% en 10 ans en raison du vieillissement de la population et de l'augmentation du taux d'infection par HPV oncogènes. Le pronostic de ce cancer est lié au stade de découverte de la

maladie. Le diagnostic des tumeurs précancéreuses de la vulve constitue un véritable enjeu dans la prise en charge des patientes. Il n'existe à ce jour, pas d'outil diagnostique spécifique de ces tumeurs.

Objectif : Le projet a pour objectif, à partir d'un modèle de cancer vulvaire implantée chez la souris, d'évaluer la faisabilité et la fiabilité du diagnostic photodynamique (PDD) avant le passage en essai clinique. Le principe du PDD consiste à mesurer l'intensité de fluorescence de la portoporphyrine IX (PpIX) produite par les cellules cancéreuses suite à l'administration de molécules à base de 5-ALA (prodrogues). Cette technique est utilisée en clinique pour le diagnostic du cancer de la vessie et de certains cancers cutanés non mélaniques. La mesure de l'intensité de fluorescence se fera sur la durée (de 0 à 12 heures) après l'application de la prodrogue. A la fin de la procédure, les animaux seront mis à morts.

Avantages : le PDD est une méthode non invasive pour laquelle l'expérimentation animale permettra d'évaluer l'intensité de fluorescence au niveau de la tumeur et de la peau saine. Il sera ainsi possible de comparer la spécificité tumorale de plusieurs dérivés du 5-ALA en fonction du temps après leur application topique. La xénogreffe en intradermique de cellules cancéreuses vulvaires humaines est le modèle le plus proche possible des néoplasies intraépithéliales vulvaires observées en clinique.

Dommages escomptés : la greffe des cellules cancéreuses nécessite l'injection de cellules cancéreuses en intradermique (geste invasif).

Nombre et type d'animaux : un maximum de 64 souris immunodéprimées (nude) est prévu pour 4 prodrogues à base de 5-ALA étudiées à 2 concentrations différentes (8 souris maximum par groupe).

Exigence de remplacement : Le PDD est évalué au préalable in vitro sur deux lignées cellulaires de cancer vulvaire pour lesquelles la production de PpIX est établie en fonction de la prodrogue étudiée. Cela permet de sélectionner les dérivés de 5-ALA les plus pertinents pour la réalisation du PDD in vivo.

Exigences de réduction : Le choix, sur la même souris, de la peau saine comme témoin par rapport à la tumeur permet de réduire le nombre de sujets.

L'objectif de l'étude est d'utiliser le moins d'animaux possible tout en respectant une démarche statistique fiable. C'est pourquoi un modèle statistique séquentiel sera appliqué avec, dans un premier temps, 4 souris évaluées pour chaque condition de traitement. Lorsque 3 animaux sur 4 ne donnent pas de résultats significatifs sur la tumeur par rapport à la peau saine, l'expérimentation est arrêtée.

Exigences de raffinement : Aucune expérimentation ne sera faite sur animal vigile. Le PDD est une technique non invasive. Aucune douleur n'est attendue dans ces conditions. Un recours aux antalgiques est prévu si certaines prodrogues produisent une irritation cutanée.

1831- - Raison du projet : Les infections à Streptococcus suis sont fréquentes en élevage et sont responsables de pertes économiques importantes. Le diagnostic différentiel des signes habituels de cette pathologie (ex.: arthrite) est large ce qui rend l'établissement d'un modèle expérimental spécifique au germe nécessaire de manière à cibler l'efficacité de traitements ou de prophylaxies médicales sur ce germe (conditions contrôlées) selon les impératifs réglementaires.

- Objectif du projet : vise à reproduire expérimentalement l'infection à S. suis chez le Porc ainsi qu'à évaluer l'efficacité, l'innocuité et la pharmacocinétique de médicaments sur animal malade.

- Bénéfice attendu du projet : caractérisation du modèle expérimental et réalisation d'études réglementaires nécessaires au dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché de médicaments vétérinaires.

- Animaux : Le porc est l'espèce sensible. Des animaux au sevrage et en début de croissance seront utilisés, correspondant à l'épidémiologie de la pathologie sur le terrain. Le nombre d'animaux utilisé sera optimisé et calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec un niveau de significativité adéquat. Le nombre de groupes pourra varier selon les objectifs spécifiques de l'étude. Généralement, s'agissant d'études comparatives, 2 à 5 groupes seront constitués, le nombre d'animaux par groupe sera de l'ordre de 6 à 20, soit un effectif maximum de 100 animaux par étude. Considérant que le nombre moyen d'études envisagées par an est de 1, nous tablons sur un nombre "enveloppe" de 500 animaux maximum sur la période de 5 ans.

- Dommages attendus : La souffrance attendue est sévère et correspond à la pathologie induite par l'inoculation S. suis (hyperthermie, arthrites multiples, convulsions). Aux doses utilisées dans ces modèles, et en l'absence de traitement, le pic d'infection est attendu en 24h après l'inoculation de la bactérie. Les symptômes ne régressent habituellement pas. Des points limites sont donc implémentés (voir 3.4.13) au delà desquels les animaux seront euthanasiés pour raison éthique par injection létale d'un euthanasique.

- Application des 3Rs :

. remplacement : aucune méthode alternative à l'utilisation d'animaux vivants n'est susceptible de répondre aux objectifs du projet.

. réduction : le nombre d'animaux utilisé sera optimisé et calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec un niveau de significativité adéquat.

. raffinement : l'hébergement sera adapté aux besoins physiologiques des animaux et permettra l'expression de leur gamme normale de comportements. La contention visera à minimiser le stress et le bien-être sera évalué bi-quotidiennement par le personnel en charge des animaux (animaliers et vétérinaires).

1832- La transplantation d'organes connaît certaines limites du fait du faible nombre de donneurs d'organe par rapport au nombre important de patients nécessitant une transplantation. Dans le cas de patients présentant une atteinte pulmonaire en attente de greffe, une solution pour palier à ce manque d'organe, est le reconditionnement ex vivo de poumons dits "marginiaux". La "qualité" d'un greffon pulmonaire est donnée par le rapport PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> mesurée chez le donneur juste avant le

prélèvement, c'est-à-dire la capacité d'oxygénation de ce greffon. On considère qu'un greffon est "limite" pour la greffe lorsque le rapport PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> est inférieur à 300 (la valeur normale pour un sujet sain est de l'ordre de 500). Cependant, la transplantation d'un greffon "limite" accroît le risque de dysfonction primaire de ce greffon et aggrave de ce fait le pronostic précoce de l'intervention. Le but de cette réhabilitation ex vivo à l'aide de dispositifs médicaux et de solutions spécifiques, est une amélioration du rapport PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, permettant à l'organe de récupérer des capacités d'oxygénation suffisantes pour minimiser le risque de mortalité précoce après transplantation.

Ce nouveau protocole de réhabilitation pulmonaire, expérimenté dans de nombreux centres et déjà opérationnel dans divers établissements de santé français et étrangers, nécessite la formation et l'entraînement du corps médical, avant de pouvoir être mis en place et d'en faire bénéficier les patients de notre établissement. Ainsi ce projet vise à la formation de personnel médical dans des conditions physiologiques et anatomiques similaires à celles observées chez l'homme. Ce projet consiste donc en un enseignement du personnel soignant, à la réhabilitation de greffon pulmonaire ex vivo sur un modèle porcin.

Le nombre maximum d'animaux prévus est 15 sur une période de 5 années. Dans un souci de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous prévoyons la formation de 8 à 10 personnes par séance utilisant un porc à la fois. Dans un souci de limiter le stress et la douleur, toute la procédure sera réalisée chez ces animaux sous anesthésie générale, et un traitement antalgique adapté sera mis en place en amont de l'intervention.

1833- L'hémostase regroupe l'ensemble des mécanismes physiologiques qui assurent le maintien du sang à l'intérieur des vaisseaux, et en particulier, ceux qui déterminent l'arrêt du saignement lors d'une lésion vasculaire. Un dérèglement de ces mécanismes physiologiques peut conduire à la thrombose (occlusion des vaisseaux). La plaquette sanguine est une cellule du sang qui joue un rôle fondamental dans ces mécanismes hémostatiques. Ainsi, étudier les événements qui contrôlent l'activation des plaquettes sanguines et qui conduisent à la thrombose est essentiel afin de développer de nouvelles voies thérapeutiques pour réduire ces risques thrombotiques. En effet, lors d'une lésion vasculaire, les plaquettes en circulation entre en contact avec la paroi lésée du vaisseau. Elles vont alors adhérer à la lésion et s'activer. En sécrétant les granules qu'elles contiennent, elles vont recruter de nouvelles plaquettes en circulation qui vont d'agréger entre-elles et ainsi colmater la brèche vasculaire. Ce mécanisme de sécrétion des plaquettes est essentiel pour un bon recrutement de nouvelles plaquettes et un arrêt du saignement. Dans des conditions pathologiques, si cette sécrétion est trop importante ou qu'elle intervient sans qu'il y ait lésion du vaisseau, les plaquettes vont s'agréger entre-elles de façon importante et conduire à une obstruction du vaisseau: c'est la thrombose.

Comprendre les mécanismes impliqués dans la sécrétion plaquettaire est donc essentiel pour envisager de nouvelles cibles thérapeutiques afin de réguler au mieux la sécrétion plaquettaire. Parmi les acteurs impliqués dans la machinerie de sécrétion, la kinésine-1 joue un rôle essentiel. Actuellement, seules des études menées avec des inhibiteurs chimiques ont montré de rôle de la kinésine-1 dans la sécrétion dans d'autres types cellulaires (globules blancs), mais aucune étude n'a abordé son rôle dans la fonction plaquettaire. Par ailleurs, les inhibiteurs utilisés dans ces études ne sont pas spécifiques, donc ils inhibent également d'autres fonctions cellulaires. Ainsi seul un modèle murin dont le gène est invalidé pour la kinésine-1 permettra de définir le rôle spécifique de cette protéine dans la sécrétion plaquettaire et d'envisager le développement d'inhibiteurs ciblés pour contrôler la sécrétion plaquettaire notamment en conditions pathologiques. Par ailleurs, le recours à l'animal est essentiel pour comprendre les interactions entre les cellules du sang, notamment les plaquettes, avec son environnement (le vaisseau sanguin). En effet, il existe une étroite collaboration entre les plaquettes et le vaisseau dans le développement de la thrombose. Ainsi un modèle animal est essentiel pour étudier ces interactions qui ne peuvent être reproduites à l'heure actuelle in vitro.

Les procédures utilisées se font dans le cadre adapté d'un hébergement agréé, respectent au maximum le bien-être des animaux avec un enrichissement du milieu (morceaux de bois à ronger, filaments de papier kraft pour faire un nid), en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. Tout au long des procédures, les animaux seront suivis par des personnes habilitées et expérimentées pour travailler avec les animaux. Pour limiter au maximum le nombre d'animaux, les animaux utilisés dans des procédures peu invasives comme la prise de sang seront, après une période de repos, inclus dans les procédures de purification de plaquettes. En effet, les plaquettes sanguines sont des cellules qui n'ont pas de noyau et donc elles ne peuvent pas être produites in vitro ou mises en culture, d'où le besoin d'avoir recours à des plaquettes issues directement du sang. Par ailleurs, pour déterminer le nombre d'animaux nécessaires à l'ensemble de l'étude, nous avons calculé le nombre d'animaux nécessaires pour chaque expérience pour avoir une réponse statistiquement analysable. Ainsi le nombre de souris prévu pour ce projet est de 320 souris.

1834- Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent qui représente la première cause de mortalité des femmes par cancer de par le monde. La forte mortalité associée au cancer du sein est essentiellement liée au développement des métastases qui ne peut pas s'étudier in vitro et nécessite le développement et l'utilisation de modèles animaux. En effet, les phénomènes qui conduisent à la formation des métastases sont complexes et font intervenir de multiples paramètres et propriétés tels que l'invasion de la matrice extracellulaire, la survie et la distribution dans la circulation lymphatique/sanguine, la migration trans-endothéliale et la colonisation d'organes cibles à distance de la tumeur primaire.

Une dérégulation de l'activité et de l'expression de certains canaux ioniques contribue au phénotype néoplasique en contrôlant notamment la migration/invasion cellulaire et la propagation métastatique. Les canaux calciques TRPV et Orai sont deux cibles émergentes dans le cancer. Ces canaux participent en effet à la migration des cellules tumorales du cancer du sein et représentent de ce fait une piste thérapeutique prometteuse pour prévenir l'apparition des métastases. Toutefois, il n'existe pas encore à ce jour d'inhibiteurs sélectifs de ces deux canaux ioniques. Le projet proposé ici a donc pour finalité de

découvrir de nouveaux composés pharmacologiques modulant spécifiquement l'activité des canaux Orai et TRPV en terme d'influx calcique et bloquant de ce fait la migration et l'invasion des cellules tumorales.

Les molécules seront d'abord évaluées pour leur tolérance in vivo sur souris saines afin de déterminer la dose à utiliser. La procédure de tolérance en administration unique permettra de déterminer la dose maximum tolérée, la procédure en administration répétée permettra d'évaluer une éventuelle toxicité suite à l'administration cumulative des molécules. Au maximum, on testera 6 molécules par an (72 souris en tolérance aiguë, 144 en tolérance répétée).

Les meilleurs candidats seront ensuite évalués pour leur propriété antimétastatique sur un modèle de tumeur mammaire (36 souris par molécule, 3 molécules maximum par an soit 108 souris/an)

L'ensemble du projet nécessite 1620 souris au maximum sur 5 ans.

Afin de répondre à la règle des 3 R, les souris sont suivies quotidiennement selon une grille de score permettant d'évaluer le degré de douleur et d'y remédier avec un traitement analgésique approprié. L'apport de l'imagerie permet de réduire le nombre d'animaux utilisés et de faire un suivi longitudinal pour chaque souris, de mieux évaluer l'état d'envahissement tumoral. Par ailleurs les souris sont groupées à 5 par cages avec des petits morceaux de papiers leur permettant de faire un nid.

1835- En novembre 2010, le plan VIH/IST 2010-2014 a été publié. Ce plan novateur souhaitait infléchir la dynamique de l'épidémie VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine); réduire la morbi-mortalité liée au VIH et au SIDA (syndrome de l'Immuno-Déficience Humaine). Une des mesures détaillée dans ce plan national est le recours à un traitement précoce et continu des personnes infectées. Plus de 35 millions de personnes sont infectées dans le monde et en France, on compte environ 7000 nouvelles infections par an. Ce projet s'inscrit dans cette thématique, proposant la validation préclinique non-réglementaire et réglementaire d'un candidat vaccin thérapeutique visant à pallier, notamment, au déficit immunitaire induit par l'infection par le VIH. Des études précliniques ont déjà validé l'intérêt du peptide à l'origine de ce candidat vaccin et permettant son évaluation actuelle dans des essais cliniques chez l'Homme.

Le développement d'un candidat vaccin chez l'Homme répond à des exigences réglementaires sur la sécurité et la qualité des produits biologiques administrés. Des études sur l'activité biologique (pouvoir immunogène) des candidats vaccins sont menées pour vérifier au cours du temps l'activité et la qualité du produit biologique étudié.

La modélisation expérimentale in vitro d'une réponse immunitaire est rendue difficile par la complexité du système biologique reconnaissant et discriminant le « soi » du « non soi ». C'est pourquoi, le projet aura recours à l'expérimentation animale sur le rongeur pour modéliser la réponse induite par la vaccination chez l'Homme et valider le pouvoir immunogène du candidat vaccin.

Le rongeur, et plus particulièrement la souris (BALB/cByRj femelles) est l'un des modèles les plus pertinents et les mieux décrits dans la littérature pour la modélisation de la réponse vaccinale chez l'homme, le recours à des animaux de plus grande taille n'est pas requis pour ce type d'études. Ce modèle animal murin, utilisé dans les études vaccinales depuis de nombreuses années, permet de caractériser les réponses immunes induites par l'injection du candidat vaccin (production d'anticorps). Ces réponses sont évaluées in vitro, par des tests de bioanalyse (ELISA) réalisés à partir du sang prélevé chez les animaux injectés. Le projet déposé prévoit le recours à 3192 animaux répartis sur les différentes étapes d'évaluation des candidats vaccins étalées sur une période de 5 ans.

Deux types d'études seront réalisées : 1) la validation de l'activité biologique du candidat vaccin qui nécessitera 3192 animaux, et 2) l'étude de son efficacité à induire une réponse immune prolongée qui nécessitera 504 animaux réutilisés dans les groupes de validation de l'activité biologique.

Les études de validation de l'activité biologique seront réalisées sur des groupes de 24 animaux (test statistique). La stabilité de l'activité biologique de chaque lot de candidats vaccins sera évaluée sur une période de 36 mois avec des mesures effectuées en accord avec la réglementation. Sept points de mesure de stabilité seront effectués (0, 3, 6, 12, 18, 24, 36 mois) après la production de chaque lot de candidat vaccin. Les candidats vaccins étant conservés à 5°C, la validation de l'activité biologique du composé vaccinal à 25°C, à compter du temps 12 mois, permettra de valider l'hypothèse d'un doublement du temps de stabilité du composé conservé à 5°C. Ceci réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés lors des études de stabilité à 24 et 36 mois, en effet dans ce cas, deux groupes de 24 animaux seront vaccinés au lieu de trois groupes. Deux lots de candidats vaccins pourront également être testés dans la même expérience réduisant également le nombre d'animaux utilisés (1 seul groupe de référence).

Les études d'efficacité à induire une réponse immune prolongée seront réalisées sur des groupes de 6 animaux réutilisés à partir des groupes des études d'activité biologique ce qui constitue un autre point de réduction du nombre d'animaux utilisés dans ce projet.

Ce projet utilise des procédures de classe légère et sans réveil. Les animaux seront hébergés en groupe (cages de 6 animaux).

1836- L'objectif des recherches de notre laboratoire est de mettre en place des stratégies thérapeutiques pour traiter les dystrophies musculaires progressives, en particulier la dystrophie musculaire de Duchenne et les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD pour Limb Girdle Muscular Dystrophies). Ces myopathies sont progressivement invalidantes et conduisent à la perte de la marche. La myopathie de Duchenne de transmission liée à l'X touche un garçon /35000. La prévalence de toutes les LGMD récessives réunies est estimée à 5 à 6 personnes sur 1 million. Aucun traitement curatif n'est actuellement disponible pour ces myopathies d'origine génétique.

Dans ce projet, nous souhaiterions savoir si l'injection d'un vecteur viral apportant le gène déficient va contribuer à corriger la pathologie dans des souris modèles.



Afin de respecter la règle des trois R, tous nos vecteurs auront été préalablement testés en culture cellulaire et seuls ceux ayant montré une expression optimale seront utilisés in vivo. Cette étape est estimée pouvoir réduire le nombre d'animaux nécessaire de 20 à 30 %.

Dans ce projet, 1002 animaux seront utilisés, ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études. Le degré de contrainte que subiront ces animaux sera modéré. L'état de santé des animaux sera surveillé, aucun animal en souffrance ne sera laissé sans soin. En particulier, nous nous attacherons dans un souci d'application de ces principes, à faire en sorte d'optimiser l'utilisation des animaux entre procédures chaque fois où cela s'avère possible.

1837- L'objectif est de tester l'ingestibilité des foins issus des prairies remarquables du Parc Naturel Régional de Lorraine en vue de la mise en place d'une filière à destination des animaleries grand public (lapin et petits rongeurs). Ce travail impliquera autre que le PNR Lorraine et deux laboratoires de recherche également un groupe d'étudiants dans le cadre de leur programme de formation. Trois types de foins récoltés au PNR Lorraine seront comparés (trois types de groupement végétaux se différenciant par le niveau d'humidité du sol et la composition botanique). Le protocole de mesure des niveaux de consommation sera réalisé avec des lapins. Cette espèce constitue en effet le modèle le plus pertinent par rapport à la finalité de l'étude (utilisation du foin en animalerie). Le dispositif envisagé est un carré latin 3 x 3 avec 5 répliquats par groupe afin de réduire le nombre d'individus nécessaires pour contenir la variabilité individuelle de la variable étudiée. Ainsi, les 3 foins seront testés sur tous les animaux, ce qui entraîne un besoin de 15 animaux. Les lapins seront acclimatés aux conditions de logement dans l'animalerie pendant une semaine. Ensuite, les suivis de consommations seront réalisés sur une période de 5 jours, après une période d'acclimatation au foin à tester de 2 jours. La durée totale de l'expérimentation est donc de 28 jours. Au cours de l'expérimentation, les animaux recevront quotidiennement un aliment de commerce et une des trois foins à tester. Chaque jour, le foin distribué et le foin non consommé par l'animal depuis la dernière distribution sont mesurés. Les animaux seront pesés une fois par semaine afin de pouvoir exprimer l'ingestion par kg de poids corporel. La mesure de l'ingestion du foin à l'échelle de l'individu nécessite de placer les animaux en cage individuelle.

1838- Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer les effets de différents produits sur les paramètres respiratoires en utilisant la pléthysmographie de corps entier chez le rongeur vigile. La pléthysmographie est une technique permettant de mesurer la respiration sur des animaux vigiles par mesure des variations de pression générés par les mouvements respiratoires de l'animal placé dans une enceinte ventilée.

Au cours de chaque étude, on administre aux animaux (en général 8 par groupe) le candidat-médicament testé à différentes doses, le véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée et éventuellement un produit de référence (en général un total de 5 groupes par étude, soit un total de 4800 animaux sur 5 ans).

Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la fonction respiratoire. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'un candidat médicament. A ce jour, le rongeur est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à des procédures peu invasives
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

1839- - Raison du projet : Les maladies respiratoires sont un problème de santé majeur dans les élevages bovins, porcins et ovins particulièrement dans les grandes unités d'élevage où les productions ont été spécialisées et intensifiées. De nouveaux produits sont constamment en développement par l'industrie pharmaceutique vétérinaire pour prévenir et/ou traiter ces pathologies. C'est pourquoi, des modèles infectieux réalisés en station expérimentale sont nécessaires afin d'évaluer l'efficacité de ces produits in vivo dans des conditions contrôlées. De plus, ces modèles doivent être régulièrement réactualisés en fonction de l'évolution des souches pathogènes sur le terrain (apparition de résistances aux antibiotiques).

- Objectif du projet : Le projet vise à reproduire expérimentalement des infections respiratoires chez le veau, le porc et le mouton:

- Infection à *Pasteurella multocida* chez le porc
- Infection à *Mannheimia haemolytica* chez le veau et le mouton
- Infection à *Actinobacillus pleuropneumoniae* chez le porc

Le projet a également pour but de tester l'efficacité, l'innocuité et la pharmacocinétique de produits (pharmaceutiques ou non) chez l'espèce cible.

Les études d'efficacité sont nécessaires au dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché de tout médicament vétérinaire.

- Bénéfice attendu du projet : Ce projet permettra d'étudier les infections respiratoires induites par *Pasteurella multocida* ou *Actinobacillus pleuropneumoniae* chez le porc et *Mannheimia haemolytica* chez le veau et mouton: caractérisation du modèle expérimental (voie d'administration, inoculum, souche bactérienne, modulation des paramètres zootechniques, signes cliniques, lésions à l'autopsie...).

Cela permettra de tester dans des conditions contrôlées l'efficacité, l'innocuité ou la pharmacocinétique de produits vétérinaires (préventifs ou curatifs).

- Animaux : L'espèce et l'âge des animaux d'étude seront définis de façon à se rapprocher de l'épidémiologie (jeunes bovins et porcins généralement).

Dans le cas des études d'efficacité, l'espèce choisie sera l'espèce cible du produit testé.

Le nombre d'animaux utilisé sera optimisé et calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec un niveau de significativité adéquat. Le nombre de groupes pourra varier selon les objectifs spécifiques de l'étude. Généralement, s'agissant d'études comparatives, 2 à 5 groupes seront constitués, le nombre d'animaux par groupe sera de l'ordre de 6 à 15, soit un effectif maximum de 75 animaux par étude. Considérant que le nombre moyen d'études envisagées par an est de 2, nous tablons sur un nombre "enveloppe" de 750 animaux maximum sur la période de 5 ans.

- Dommages attendus : La souffrance attendue est sévère et correspond à la pathologie induite par l'inoculation de bactéries vivantes (tel que la fièvre, la toux, des écoulements nasaux, des difficultés respiratoires, l'anorexie). Aux doses utilisées dans ces modèles, et en l'absence de traitement, le pic d'infection est attendu 24 à 48h après l'inoculation de la bactérie. Les symptômes perdurent généralement 2 à 3 jours. En cas de dépassement des points limites (voir 3.4.13), les animaux seront traités (si les objectifs de l'étude le permettent) ou euthanasiés pour raison éthique par injection létale d'euthanasiques (avec sédation préalable pour les bovins et ovins).

- Application des 3Rs :

. remplacement : Aucune méthode alternative à l'utilisation d'animaux vivants n'est susceptible de répondre aux objectifs du projet.

. réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera optimisé et calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec un niveau de significativité adéquat.

. raffinement : Les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées aux besoins physiologiques de ces derniers et leur permettront d'exprimer le plus possible leur gamme normale de comportements. La contention des animaux visera à limiter au maximum le stress des animaux.

Le bien-être des animaux sera évalué bi-quotidiennement par le personnel en charge des animaux: animaliers et vétérinaires

1840- Le but de ce projet sera d'évaluer la toxicité de nanoparticules de carbone chez deux espèces d'amphibiens modèles : une grenouille (le xénope *Xenopus laevis*) et un triton (le pleurodèle *Pleurodeles waltl*) représentatives des écosystèmes aquatiques et dont la pertinence d'utilisation est reconnue depuis plusieurs années.

En effet, du fait de leurs applications dans des domaines aussi variés que l'électronique, la science des matériaux ou la médecine, les nanoparticules ont connues et connaissent encore un développement extrêmement important au niveau industriel.

L'intégration de ces nanoparticules dans les produits de la vie quotidienne est une réalité et on peut s'attendre dans les années à venir à retrouver ces contaminants au sein des écosystèmes. Les écosystèmes aquatiques, qui sont les réceptacles finaux majeurs des pollutions, pourraient être impactés par le relargage de ces nanoparticules au cours du cycle de vie des produits qui en contiennent (production, utilisation, fin de vie des produits).

Plusieurs études se sont intéressées aux effets de ces nanoparticules au niveau in vitro ou in vivo chez les modèles murins (rats et souris). L'ensemble de ces études est très intéressant d'un point de vue des modes d'action mais n'est pas représentatif des réalités environnementales. De plus depuis une trentaine d'années on assiste à un déclin global des populations d'amphibiens à travers le monde. Ce déclin semble multi-factoriel et les causes impliquées sont diverses (maladies, changement climatique, pollutions). Dans ce contexte, l'évaluation systématique de la toxicité potentielle des polluants émergents apparaît donc comme nécessaire et complémentaire aux autres formes de pollution (pesticides, métaux, etc.). Ainsi, selon les résultats obtenus dans le présent projet, des préconisations d'emploi des nanoparticules pourront être données.

Les procédures mises en oeuvre impliqueront des individus adultes de Xénopes et des larves de Xénopes et Pleurodèles. Les Xénopes adultes seront uniquement utilisés à des fins de reproduction (stimulation hormonale de la ponte) et ne seront jamais mis à mort mais réintégrés à l'élevage: utilisation de 32 adultes reproducteur pour l'ensemble du projet.

Les têtards (larves) des deux espèces d'amphibiens seront exposés à différents types de nanoparticules pendant des durées variables (24h à 21 jours) et différents aspects seront étudiés : cassures de l'ADN, métamorphose, croissance, comportement.

De plus et afin de se rapprocher le plus possible du milieu naturel, des expérimentations seront menées en étudiant l'effet de ces nanoparticules au niveau de chaînes alimentaires recréées en laboratoire.

Comportement mis à part, l'ensemble des études sera mené chez des larves préalablement euthanasiées par surdose d'anesthésique afin de limiter la souffrance des animaux.

Enfin, les conditions d'élevage et d'exposition des différents animaux seront strictement contrôlées en fonction des besoins physiologiques adaptés à chaque espèce et stade de développement.

Pour l'ensemble des procédures 3315 têtards de Xénopes et 1422 têtards de Pleurodèles seront utilisés. Le nombre total d'animaux impliqués dans des procédures sera donc égal à 4769 (32 adultes reproducteurs de grenouille + 3315 têtards de grenouille + 1422 têtards de triton).

1841- Le cortex préfrontal médian et l'hippocampe sont des aires cérébrales majeures dans les processus neurobiologiques de la mémoire. Les interactions entre ces deux structures sont essentielles lors de la consolidation pérenne de la mémoire. Les connaissances anatomiques montrent que l'hippocampe projette densément sur le cortex préfrontal médian. Mais de façon

surprenante, le cortex préfrontal médian n'a pas de projection directe en retour sur l'hippocampe. Le noyau Reuniens du Thalamus médian lui, envoie et reçoit des connexions de ces 2 structures. Ce noyau thalamique est donc particulièrement bien placé pour assurer la communication neuronale entre l'hippocampe et le cortex préfrontal médian lors de la consolidation de la mémoire. Le but de ce projet est donc d'enregistrer *in vivo*, sous anesthésie, l'activité électrique des neurones du noyau du Reuniens et de déterminer sa résonance avec l'activité de l'hippocampe et du cortex préfrontal médian. Les animaux utilisés seront des rats mâles de souche Long Evans, âgés de 2,5 mois, pour un total de 120 rats pour les 5 ans. Pour respecter au mieux la règle des trois R, les rats, animaux grégaires, seront hébergés à 3 par cage; au maximum le nombre de rats utilisés sera minimisé au augmentant le nombre d'enregistrement, toujours sous anesthésie, par animal; par contre cette approche est réalisée *in vivo*, car l'étude des réseaux de structures cérébrales qui fonctionnent en résonance ne peut être abordée *in vitro*, ni même modélisée car c'est un noyau du cerveau sur lequel nous avons encore trop peu d'information.

D'un point de vue fondamental, il s'agit de comprendre l'influence du traitement de l'information par le noyau Reuniens dans les processus qui sous-tendent la mémoire. D'un point de vue médical, ces recherches permettront de mieux comprendre, pour pouvoir les traiter, les déficits de mémoire qui s'expriment lors d'accident vasculaire cérébral au niveau du thalamus, ou encore de maladie neurodégénérative comme la maladie d'Alzheimer.

1842- La maîtrise du moment de l'ovulation permet d'optimiser l'insémination des poulinières et représente un intérêt économique important pour les éleveurs. Notre projet a pour objectif de mesurer l'effet du Nerve Growth Factor beta ( $\beta$ -NGF) qui vient d'être identifié comme le facteur d'induction d'ovulation (OIF) chez l'alpaga (espèce à ovulation provoquée). Le  $\beta$ NGF est une protéine majoritaire du sperme d'alpaga et il est aussi retrouvé dans le sperme d'étalon. Des études réalisées *in vivo* chez la brebis ont montré que le NGF augmentait la sécrétion de LH chez des brebis en anoestrus. Des approches expérimentales conduites *in vitro* sur des cultures de neurones à GnRH (Gonadotropin Releasing hormone : hormone qui contrôle la sécrétion de LH) de souris (espèce à ovulation spontanée) montrent que le  $\beta$ NGF stimule l'activité des neurones à GnRH responsables du déclenchement de l'ovulation dans cette espèce. L'ensemble des résultats montre que ce mécanisme pourrait être conservé chez les espèces à ovulation spontanée. Chez la jument, le contrôle hormonal de l'ovulation fait appel à des mécanismes différents de ceux connus chez d'autres mammifères comme la brebis. En particulier, on n'observe pas de pic de LH avant l'ovulation, mais une augmentation de la sécrétion de GnRH. Notre hypothèse est que le  $\beta$ -NGF pourrait être un élément impliqué dans l'augmentation de l'activité des neurones à GnRH. Par ailleurs, le  $\beta$ -NGF est connu pour avoir des récepteurs au niveau des follicules ovariens. Notre objectif est de savoir si le  $\beta$ NGF a un effet sur la sécrétion de GnRH et est capable de déclencher l'ovulation.

Le projet revêt un double aspect : fondamental et appliqué. L'objectif fondamental est de mesurer l'impact du  $\beta$ -NGF sur les sécrétions endocrines GnRH, LH et FSH grâce à l'adaptation d'une méthode peu invasive de cathétérisme du sinus sous-hypophysaire. L'aspect appliqué est de mesurer l'effet du  $\beta$ -NGF dans un protocole d'induction de l'ovulation chez la jument. La possibilité de cathétériser le sinus caverneux sous-hypophysaire est une particularité anatomique des équins. L'espèce équine est donc à la fois ici l'espèce cible et l'espèce modèle. La méthode de cathétérisme réputée non invasive par les auteurs l'ayant précédemment utilisée sans imagerie reprend les méthodes utilisées en médecine humaine. Pour ce projet, cette pose de cathéter sera faite sous imagerie médicale. Le nombre d'animaux prévus pour le projet est de 24 ponettes. Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales (paille et foin de qualité, soins quotidiens) et nous choisirons des animaux sociables, habitués aux manipulations. La procédure de cathétérisme est réalisée sous anesthésie locale et tranquillisation de l'animal.

1843- L'objet des études de notre unité est de cibler des molécules (peptides ou petites molécules chimiques), capables d'influencer le cours d'une maladie de manière bénéfique. Ces molécules sont générées sur la base de cibles thérapeutiques que nous caractérisons au travers d'études moléculaires et cellulaires chez l'homme et/ou la souris. Le potentiel d'un peptide a été évalué et est aujourd'hui en essai clinique avancé chez des patients atteints de Lupus Erythémateux Disséminé. Grâce à ces études, nous avons pu valider un modèle murin (souris femelles MRL/lpr de 6-8 semaines) qui représente un modèle se rapprochant du lupus érythémateux disséminé humain, et présentant des défauts dans le processus de l'autophagie. Nous avons également pu valider un protocole pour ce peptide, qui a démontré son intérêt thérapeutique dans les études réalisées sur ce modèle murin.

Nous désirons aujourd'hui poursuivre cette démarche et tenter de tester ce peptide dans une autre pathologie auto-immune chronique, la polyarthrite rhumatoïde, où l'autophagie est potentiellement impactée. Pour se faire, nous souhaitons mettre en place un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde chez des souris C57BL/6 de 8 semaines. Ce modèle introduit depuis près de 20 ans et bien validé depuis lors se rapproche en effet de la polyarthrite rhumatoïde humaine.

Pour réaliser cette étude, nous utiliserons un total de 40 animaux : 10 animaux traités, 10 animaux non traités, et 2x10 animaux pour deux analogues de notre peptide). Les souris seront maintenues à une température de 22°C, dans une atmosphère dont le taux d'humidité est de 80% et un cycle éclaircissement/obscurité de 12h/12h, conformément aux conditions optimales demandées par la législation. Elles auront accès à la nourriture et à l'eau de boisson *ad libitum*.

Afin de respecter au mieux la règle des 3R, nous allons:

-Réduire: Nous n'utiliserons que 10 animaux par bras de l'étude et nous utiliserons un test statistique non paramétrique, le test de Mann et Whitney, adéquat pour les petits effectifs.

-Raffiner: Enrichir l'environnement des animaux, former des groupes sociaux.

-Par contre, nous ne pouvons pas « remplacer ». En effet, les études ne peuvent en aucun cas être réalisées ex vivo car il s'agit d'études précliniques qui nécessitent l'animal entier.

1844- L'objet des études de notre unité est de cibler des molécules (peptides ou petites molécules chimiques), capables d'influencer le cours d'une maladie de manière bénéfique. Ces molécules sont générées sur la base de cibles thérapeutiques que nous caractérisons au travers d'études moléculaires et cellulaires chez l'homme et/ou la souris. Le potentiel d'un peptide a été évalué et est aujourd'hui en essai clinique avancé chez des patients atteints de Lupus Erythémateux Disséminé. Grâce à ces études, nous avons pu valider un modèle murin (souris femelles MRL/lpr de 6-8 semaines) qui représente un modèle se rapprochant du lupus érythémateux disséminé humain, et présentant des défauts dans le processus de l'autophagie. Nous avons également pu valider un protocole pour ce peptide, qui a démontré son intérêt thérapeutique dans les études réalisées sur ce modèle murin.

Nous désirons aujourd'hui poursuivre cette démarche et tenter de tester ce peptide dans une autre pathologie auto-immune chronique, la maladie de Crohn, où l'autophagie est potentiellement impactée.

En effet, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin touchent 2,5 millions de personnes dans le monde, et constituent l'un des problèmes majeurs de la gastroentérologie. Leur prévalence est en constante augmentation. Il n'existe pas de traitement permettant de guérir la maladie de Crohn. La seule utilité des traitements actuels est de limiter l'inflammation, ce qui a pour effet de soulager la douleur, la diarrhée et les autres symptômes.

Pour se faire, nous souhaitons mettre en place deux modèles murins de colite induite chez des souris BALB/c de 7-9 semaines. Ces deux modèles de colite induite (DSS et TNBS) se rapprochent en effet d'une maladie de Crohn humaine.

Nous utiliserons pour cette étude un total de 80 animaux (40 animaux par modèle comprenant chacun 10 animaux traités par notre peptide et 10 animaux contrôles, et deux fois 10 animaux pour deux analogues de notre peptide).

Les études ne peuvent en aucun cas être réalisées ex vivo car il s'agit d'études préliminaires qui nécessitent l'animal entier.

Afin de respecter au mieux la règle des 3R, nous allons:

-Réduire: Nous n'utiliserons que 5 animaux par bras de l'étude

-Raffiner: Enrichir l'environnement des animaux, former des groupes sociaux

Enfin, nous utiliserons un test statistique non paramétrique, le test de Mann et Whitney, adéquat pour les petits effectifs.

1845- Comme beaucoup d'autres animaux marins à sang chaud, les éléphants de mer austraux (*Mirounga leonina*) sont confrontés à des périodes contrastées en terme de balance énergétique. Ils alternent en effet des périodes de recherche alimentaire en mer avec des périodes de jeûne à terre sur leur colonie, où ils viennent se reproduire ou muer.

Lors de la mue, une phase coûteuse en énergie, les éléphants de mer sont observés en groupes, les individus étant agrégés plus ou moins densément selon les conditions climatiques locales. Ce comportement et les bénéfices associés, sont étudiés pour la première fois chez les éléphants de mer dans ce projet. Cette étude implique de fait des animaux suivis en conditions naturelles. Nous supposons que les adaptations comportementales et physiologiques liées aux agrégations plus ou moins denses des éléphants de mer au cours de leur mue pourraient être influencées par leur condition corporelle ainsi que les contraintes climatiques.

Nos principaux objectifs sont ainsi de déterminer 1) comment se comportent les éléphants de mer pendant la mue et 2) comment ils font face au stress énergétique de la mue en fonction de leur comportement d'agrégation et des conditions climatiques. Cette étude nous permettra de mieux comprendre comment et à quel point les organismes sont capables de s'adapter, à travers des réponses comportementales et physiologiques, à leurs contraintes environnementales.

Ce projet regroupe 4 procédures, qui nous permettront de capturer et d'équiper d'enregistreurs des individus en phase de mue, alors que ceux-ci seront laissés en liberté sur leur colonie, libres de leurs mouvements. Les individus suivis seront observés et les appareils dont ils seront équipés nous permettront de recueillir des données physiologiques. Les appareils seront récupérés au bout de 20 jours, à la fin de leur mue. Une étude sur 54 individus (prévus pour 4 procédures) nous permettra de mieux comprendre la relation entre les groupements et leur impact énergétique sur les individus en fonction de leur stade de mue et des conditions environnementales. Les individus choisis seront des femelles (adultes ou jeunes), celles-ci ayant été mieux étudiées auparavant et plus facilement manipulables.

Le personnel de terrain effectuant les captures et recaptures est formé pour la contention et la manipulation, qui n'ont par ailleurs posé les années précédentes aucun problème (2012 : 22 individus équipés, 2014 : 30 individus équipés, 2015 : 7 individus équipés). Les individus, après la capture, sont anesthésiés pour une courte durée.

Aucun signe de dérangement des animaux n'a été noté les 3 sessions précédentes. Les animaux étant à terre, en mue, l'équipement posé sur la tête ou le haut du dos ne leur pose pas de problème pour se déplacer. En fonction des conditions de terrain (conditions climatiques, personnel disponible, animaux disponibles en début de mue), le nombre d'individus équipés pourra être inférieur. Les données seront analysées au retour de la campagne de terrain, après déséquipement des appareils enregistreurs récupérés sur les animaux.

1846- La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une des maladies auto-immunes les plus courantes (jusqu'à 0.5 à 1% de la population mondiale). Elle conduit à la destruction irréversible des articulations et est donc responsable d'un handicap important. Le traitement des formes graves est fondé depuis 10 ans sur des médicaments biologiques qui inhibent toutes les voies de l'inflammation. Ces médicaments coûteux et non spécifiques de la maladie peuvent être responsables d'effets secondaires sévères. Il est donc extrêmement important de disposer de modèle de pathologie à long terme pour évaluer les risques de ces traitements et ainsi le bénéfice associé.

Le progrès récent le plus important dans la physiopathologie de la PR a été la découverte d'anticorps (Ac) dirigés contre les protéines citrullinées (Cit-P) chez 75% des patients. Ces anticorps sont présents dès le début de la maladie, souvent avant les signes cliniques et avec une spécificité spectaculaire de 98%. Ainsi, il est probable que les Cit-P soient les antigènes principalement responsables de la maladie.

Les modèles rongeurs sont inutilisables pour tester cette hypothèse car la présence d'une réponse immunitaire contre Cit-P n'y existe pas. En revanche, cette réponse est présente chez le primate non-humain (PNH). Le modèle existant de PR chez les PNH a été obtenu par une immunisation au collagène très agressive qui se caractérise par une sévérité aiguë qui ne reflète pas le développement à long terme de la maladie chez l'être humain. Il faut donc un nouveau modèle.

L'objectif primaire de ce projet est donc de proposer un nouvel outil pour évaluer des traitements spécifiques de la PR.

Les objectifs secondaires sont :

- 1) la mise en place d'un modèle préclinique d'évolution non-aiguë de poly-arthrite rhumatoïde induite par la réponse anti-Cit-P chez le macaque;
- 2) la qualification d'une méthode innovante de traitement par la dé-sensibilisation des animaux vis à vis des protéines citrullinées.

De telles études ne peuvent être réalisées que sur des organismes entiers, le modèle animal est donc nécessaire pour réunir le maximum d'informations avant la réalisation d'essais cliniques chez l'homme.

Le modèle animal retenu pour ce projet est le macaque, choix guidé par la grande similarité de la nature de la réponse immune entre ce modèle et l'Homme. Le nombre d'animaux dans chacun des quatre groupes expérimentaux (une étude pilote de deux animaux, un groupe témoin de 6 animaux et deux groupes expérimentaux constitués de 20 animaux chacun) a été réduit le plus possible tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non-paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies afin d'éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administrations et prélèvements sous anesthésie, limitations des volumes de sang prélevés). La durée de la phase d'induction sera réduite au maximum en fonction de l'étude pilote (6 semaines au total), alors que l'ensemble des analyses biochimiques et immunologiques s'étalera sur trois ans.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 48 animaux provenant d'élevages autorisés. Les animaux seront hébergés en groupes ou en paires. 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 alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

1847- L'imagerie intravitale permet de réaliser le suivi spatiotemporel d'évènements biologiques à l'échelle de la cellule ou du tissu sur animal vivant. L'analyse d'un tissu au sein d'une chambre dorsale implantée chez la souris apporte des informations qualitatives et quantitatives sur les modifications vasculaires et structurales ainsi que sur les interactions cellulaires et moléculaires au cours du temps. C'est un outil technologique d'imagerie in vivo haute résolution qui a des applications potentielles dans de multiples domaines notamment en cancérologie. En effet, le tissu qui est placé dans la fenêtre de la chambre dorsale peut être observé (après anesthésie de l'animal) grâce à différents types de techniques microscopiques de pointe.

Nous avons mis en place un modèle, très bien toléré par l'animal, qui permet de suivre les processus biologiques (sains ou pathologiques) sur plusieurs semaines. Toutefois, les greffes tumorales en chambre dorsale sont actuellement réalisées sans prendre en compte le microenvironnement naturel de la tumeur. Ainsi, pour s'approcher au mieux de la réalité biologique, nous nous proposons de développer un modèle de greffe pseudo-orthotopique par lequel un fragment du tissu sain de la même origine tissulaire sera greffé simultanément aux cellules cancéreuses. Les interactions cellulaires/moléculaires entre tumeur et stroma permettront d'étudier les processus physiopathologiques à l'origine de la dissémination métastatique et la capacité d'envahissement des tumeurs. C'est par une meilleure compréhension de ces processus complexes que de nouveaux traitements pourront être proposés aux patients.

Cette étude se fera chez la souris immunodéficente, de façon à ne pas rejeter les greffes de cellules humaines.

Les souris, suite à l'implantation d'une chambre dorsale, vont recevoir une injection intradermique de cellules tumorales humaines conjointement au stroma de l'organe dans lequel la tumeur s'est développée. La croissance tumorale et les modifications du microenvironnement seront suivies par micro et macroscopie pendant une durée limitée par la croissance tumorale c'est à dire jusqu'à ce que l'exploitation des images obtenues reste possible.

Les processus physiopathologiques du développement du cancer découlent d'interactions vasculaires, tissulaires, cellulaires et moléculaires entre la tumeur et son microenvironnement. Le modèle animal permet de prendre en compte leur complexité et leurs interactions. Afin de pouvoir interpréter les résultats de manière satisfaisante, le calcul du nombre d'animaux implantés a dû prendre en compte la variabilité interindividuelle de la pousse tumorale et la morbidité due à la chirurgie. Pour proposer ce modèle à la communauté scientifique, il est important d'étudier les types tumoraux les plus pertinents pour nos thématiques à savoir les cancer du sein, de la vessie, de la prostate et du colon. Le nombre d'animaux sains prélevés pour leur stroma a été évalué en prenant en compte le volume du tissu prélevé et la conception de l'étude a été faite de manière à minimiser le nombre d'animaux utilisés (nombre minimum nécessaire et suffisant). Il a été déterminé que 375 souris seraient nécessaires au maximum pour mener ce projet à bien.

La chirurgie sera pratiquée sous anesthésie générale (isoflurane), de la lidocaïne sera administrée localement par voie sous-cutanée avant l'incision de la peau et de la Tolfédine (4mg/kg) sera injectée par voie sous-cutanée à la fin de la chirurgie, avant le réveil. Compte-tenu des contraintes d'hébergement, de l'enrichissement sera ajouté dans la cage au moment du change. De la nourriture gélinifée sera mise à disposition après la chirurgie afin de favoriser la récupération. Les animaux

seront surveillés quotidiennement et pesés a minima une fois/semaine. Leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress. L'imagerie des animaux se fera sous anesthésie générale, 2 fois par semaine afin de visualiser les modifications anatomiques et vasculaires tout en respectant un temps de récupération suffisant entre 2 périodes d'acquisition d'images.

1848- L'insuffisance cardiaque est une maladie fréquente, touchant un million de personnes en France et dont la fréquence d'apparition a doublé en 10 ans. Elle correspond à l'incapacité du cœur à pomper suffisamment de sang pour répondre aux besoins de l'organisme. L'objectif général du projet est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la survenue de l'insuffisance cardiaque. Un dysfonctionnement du myocarde, organe hautement oxydatif, entraîne des conséquences dramatiques telles que des troubles métaboliques incluant la production, le transport et l'utilisation de l'énergie. Ce projet vise à caractériser les cascades de signalisation intracellulaire impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique cardiaque et des déficits énergétiques liés à la pathologie. Deux voies seront étudiées au cours de ce projet. Le but de ces travaux est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer à plus long terme des thérapies nouvelles. L'utilisation d'animaux est indispensable pour l'évaluation de la fonction cardiovasculaire et ne peut être remplacée par des cultures cellulaires (les cellules cardiaques ne se divisent pas). De plus l'évaluation de la fonction cardiaque est à réaliser sur l'animal entier adulte afin de s'approcher le plus possible de la pathologie humaine. Afin de réduire un maximum le nombre d'animaux, certaines expériences seront réalisées sur des cultures primaires. Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement). Une planification minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude, et en conservant une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Les fonctions cardiovasculaires sont étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux. Les animaux sont euthanasiés en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés entre les domaines explorés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. L'insuffisance cardiaque est induite en respectant au maximum les procédures de bien-être animal et en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'ils ne subissent aucun stress. Afin d'améliorer leurs conditions d'hébergement de l'enrichissement sera ajouté dans leurs cages. Un total de 2418 souris est nécessaire pour le projet.

1849- Le concept d'immunosurveillance postule que des tumeurs naissantes sont éliminées par le système immunitaire. L'émergence de tumeurs montrent néanmoins que celui-ci n'est pas toujours efficace dans le contrôle des tumeurs. L'échappement tumoral est généralement associé à des événements de régulations négatives du système immunitaire affectant principalement les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques sont les sentinelles du système immunitaire, présentes dans les tissus elles ont pour fonction de capturer les antigènes puis de migrer vers les ganglions drainants où elles présenteront ces antigènes aux cellules T. Si les cellules dendritiques sont bien activées, elles induiront l'activation et la différenciation de cellules T en cellules effectrices capables de contrôler des tumeurs. Inversement, si celles-ci ont reçu des signaux négatifs liés à l'environnement tumoral elles induiront principalement des cellules T capables de réguler négativement le système immunitaire.

A ce jour les mécanismes contrôlant le recrutement des cellules dendritiques vers les tumeurs sont encore inconnus. De même l'effet de l'environnement tumoral sur le recrutement et la fonctionnalité des cellules dendritiques est encore peu compris. Nos objectifs sont, d'une part, de définir les mécanismes de mobilisation des cellules dendritiques vers une tumeur solide et vers les ganglions drainants afin d'identifier des acteurs moléculaires qui favoriseraient cette migration. D'autre part nous cherchons à mieux comprendre comment l'environnement tumoral modifie la fonctionnalité des cellules dendritiques.

L'utilisation de modèles expérimentaux intégrés est essentielle à ce projet. En effet, l'environnement tumoral et l'organisation tri-dimensionnel de la tumeur sont des paramètres clés qui réguleront le recrutement et la mobilité des cellules dendritiques. A ce jour cette complexité ne peut être reproduite in vitro. De même les différents acteurs du système immunitaire, cellules dendritiques et cellules T patrouillent par voie sanguine l'ensemble de l'organisme et leur recrutement dans la tumeur est défini par l'anatomie de la tumeur. Aussi nous utilisons différents modèles de tumeurs transplantées chez la souris. La souris est un modèle de choix car elle reproduit assez fidèlement la physiopathologie humaine et, par ailleurs de nombreux modèles de souris transgéniques ou déficientes pour certaines molécules permettent de préciser les mécanismes impliqués.

La caractérisation des mécanismes de mobilisation des cellules dendritiques vers et dans les tumeurs pourrait permettre d'identifier de nouvelles stratégies d'immuno-intervention pour contrôler des tumeurs et métastases.

Globalement, l'ensemble des expériences est planifié pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisé par des expériences « preuve de concept » in vitro, par des expériences pilotes sur petit groupe d'animaux et par l'utilisation de modèles expérimentaux permettant des suivis longitudinaux sur un même animal.

Le nombre de souris nécessaire à la conduite de ce projet est estimé à 1900 pour les 5 années.

1850- La thérapie génique est une stratégie thérapeutique consistant à introduire du matériel génétique (gène) dans les cellules d'un organisme pour y corriger une anomalie à l'origine d'une pathologie. Il s'agit souvent d'apporter un gène normal et fonctionnel dans une cellule où le gène présent est altéré. Ce matériel génétique est le plus souvent transporté dans les cellules du patient grâce à un vecteur viral. Les vecteurs dérivés de virus adéno-associés, ou AAV (pour adeno associated virus) jouissent d'une popularité croissante dans le domaine de la thérapie génique et promettent d'apporter un traitement

pour de nombreuses maladies génétiques dont la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), la sclérose latérale amyotrophique, l'hémophilie de type B, l'amaurose congénitale de Leber.

Dans le cas de maladies neuromusculaires, où l'ensemble des muscles sont affectés, la voie d'administration des vecteurs la plus optimale est la voie systémique afin d'obtenir une distribution du vecteur dans l'ensemble des muscles du corps.

Ainsi suite à une injection intraveineuse de vecteurs AAVs, avant de pénétrer dans les cellules des différents tissus, les vecteurs interagissent avec les protéines du sang lesquelles peuvent changer la biodistribution et/ou affecter l'efficacité des vecteurs. Les conséquences de ces interactions jouent un rôle crucial dans toutes les étapes de la pénétration des vecteurs dans les cellules-cibles in vivo: le temps où le vecteur reste dans la circulation sanguine, l'efficacité de son passage à travers la barrière endothéliale et son entrée dans les cellules. Par conséquent, les études in vitro ne permettent pas de prédire le comportement des vecteurs AAVs in vivo.

Récemment nous avons montré que les protéines sériques peuvent diminuer ou augmenter l'efficacité des vecteurs rAAV (rAAV-6) in vivo. Les vecteurs destinés pour le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) sont les vecteurs rAAV-8 et rAAV-9. Afin de prédire leur efficacité in vivo, nous avons réalisé une étude in vitro et nous avons trouvé que la protéine Platelet Factor 4 humaine (HuPF4) interagit avec les rAAV-8 et rAAV-9.

Pour définir le rôle de cette protéine dans l'efficacité/biodistribution des vecteurs rAAV-8 et rAAV-9, nous avons à notre disposition un modèle murin qui n'exprime plus la PF4 murine et un modèle murin exprimant la PF4 humaine. Afin d'étudier le rôle de la PF4 humaine ces souris seront injectées avec les vecteurs et l'efficacité et la biodistribution des vecteurs seront analysées par les méthodes appropriées. Le nombre de souris nécessaires, estimé en fonction de nos connaissances actuelles ainsi que sur un calcul de taille d'échantillon permettant une analyse statistique des résultats s'élève à 504 souris.

1851- Le virus de l'immunodéficience humain (VIH) est l'agent pathogène responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Le SIDA est l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Selon la dernière estimation de l'OMS, plus de 34 millions de personnes vivent aujourd'hui avec le VIH. L'incidence de l'infection par le VIH est particulièrement élevée dans les pays en voie de développement. Les femmes en sont les premières victimes car elles ne contrôlent pas les modes de protection. En l'absence d'un vaccin préventif, développer des moyens de prévention efficace demeure une priorité pour limiter la propagation du virus dans cette population féminine fortement exposée.

De nombreux efforts sont aujourd'hui mis en œuvre pour développer une stratégie préventive utilisant des microbicides à usage vaginal. Les microbicides vaginaux sont des préparations qui s'appliquent directement sur la muqueuse vaginale et qui sont capables d'inactiver les virus. L'utilisation de microbicides vaginaux permettrait de limiter la transmission sexuelle du VIH et de fournir à la femme la maîtrise de sa protection contre le VIH.

L'objectif de ce projet est d'évaluer la sécurité, la pharmacocinétique et l'efficacité d'un nouveau candidat microbicide, un polyphénol naturel, chez le macaque cynomolgus. L'efficacité de ce candidat microbicide sera évaluée en association avec d'autres candidats microbicides. Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche européen dont l'objectif est de développer une préparation de microbicides vaginaux capable de procurer une protection optimale contre l'infection par le VIH. Les résultats de ce projet pourraient conduire à la mise en place d'essais cliniques chez la femme.

Le candidat microbicide proposé a été évalué dans des systèmes expérimentaux in vitro. Il possède une forte activité antivirale contre le VIH. Les études précliniques dans les modèles animaux sont nécessaires pour évaluer la faisabilité, l'efficacité et la toxicité de toutes molécules candidates dans la complexité des tissus cibles. L'utilisation de modèles animaux permet ainsi d'apporter le maximum d'informations avant la réalisation d'essais chez l'Homme. Le modèle choisi pour ce projet est le macaque cynomolgus. Ce modèle est le plus pertinent pour corrélérer les paramètres pharmacocinétiques de toutes molécules administrée in vivo à ceux qui seront obtenus chez l'Homme et est, à l'heure actuelle, le seul modèle animal mimant l'infection par le VIH.

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. Le projet prévoit d'utiliser au maximum 56 animaux provenant d'élevages reconnus.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administration des préparations microbicides/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.

1852- Ce projet a pour objectif l'évaluation de l'activité des immunosérums produits sur animaux et destinés à être utilisés chez l'homme, selon les normes d'efficacité / activité, d'innocuité et de sécurité réglementaires. Les immunosérums sont utilisés pour le traitement de personnes exposés à la rage, au tétanos et à certains venins et sont dans la plupart des cas « life saving products » c'est-à-dire permettant de sauver des vies. Les tests d'activité incluent également la fabrication et la calibration/validation des solutions antigéniques utilisées pour la séroneutralisation des sérums, en accord avec les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).

Ces tests d'activité consistent à administrer à des souris le sérum testé, préalablement mélangé à une quantité fixe d'une solution antigénique (virus, venin, toxine), afin de réaliser une séroneutralisation in vitro. Après administration du mélange, les animaux sont ensuite hébergés pendant la période nécessaire pour observer les effets cliniques afin de déterminer le niveau de protection des animaux contre les effets de l'antigène.

Ce projet représente l'ensemble des essais menés systématiquement sur chaque lot de produits fabriqués. Suite à l'injection du mélange séroneutralisé les animaux peuvent présenter des signes cliniques. Dans certains cas des points limites

spécifiques sont définis à partir desquelles les animaux sont euthanasiés de façon anticipée. La prise en charge d'un animal présentant des signes cliniques de maladie non attendus est réalisée sous la responsabilité d'un vétérinaire.

Le degré de sévérité de ce projet est considéré comme modéré à sévère.

Ce projet peut nécessiter l'utilisation de 231 000 souris pour une durée de 5 ans.

Ce projet contribue au contrôle de lots de produits afin d'assurer leur fiabilité et leur conformité aux spécifications et aux textes de référence en vigueur et d'autre part, d'assurer le niveau de formation / qualification du personnel requis pour chacun de ces tests conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication.

Suite à l'atteinte du point limite ou en fin de test, la majorité des animaux utilisés est euthanasiée selon les méthodes recommandées par la réglementation, par la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux et approuvées par le Comité d'Ethique. Une petite partie des animaux peuvent être réutilisés pour des besoins de formation dans le respect des exigences réglementaires.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement : Ces tests sont en cours de remplacement progressif par des tests in vitro de type ELISA.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés au total est calculé au plus juste de façon à répondre aux exigences réglementaires et aux besoins de tests sur la période. Le nombre d'animaux par groupe est défini par la réglementation ou par une étude statistique. Il ne peut être réduit au-delà.

Raffinement : Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des enrichissements dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires (ETS 123), et suivis par un personnel spécifiquement formé. En cas de signes cliniques, dans les meilleurs délais, les animaux bénéficient des soins vétérinaires ou sont euthanasiés selon les méthodes recommandées.

1853- Ce projet a pour objectif l'évaluation de l'activité des vaccins et des médicaments immunogènes destinés à l'être humain, selon les normes d'innocuité et de sécurité réglementaires. Ce projet inclut également la calibration/validation des solutions antigéniques utilisées dans ces tests et requise par les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).

Ces tests consistent à vacciner ou immuniser les animaux avec les produits à tester et à les héberger durant la période nécessaire au développement de l'immunité. Une épreuve infectieuse est ensuite réalisée afin de déterminer le niveau de protection des animaux contre les effets de la toxine ou du virus.

Ce projet représente l'ensemble des essais menés systématiquement sur les lots de produits fabriqués. Les espèces employées sont la souris et le cobaye.

Suite à l'épreuve infectieuse les animaux peuvent présenter des signes cliniques. Des points limites spécifiques sont alors définis.

La prise en charge d'un animal ayant des signes cliniques de maladie non attendus est réalisée sous la responsabilité d'un vétérinaire.

Ce projet peut nécessiter l'utilisation de 540500 souris et 201305 cobayes pour une durée de 5 ans.

Les bénéfices attendus de ce projet sont d'une part de contribuer à la libération de lots de produits conformes aux spécifications et aux textes de référence en vigueur et d'autre part, d'assurer le niveau de formation / qualification du personnel pour chacun de ces tests conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication.

Suite à l'atteinte du point limite ou en fin de test, la majorité des animaux utilisés est euthanasiée selon les méthodes recommandées par la réglementation, par la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux et approuvées par le Comité d'Ethique. En l'absence de signes cliniques, des animaux peuvent être réutilisés pour des besoins de formation dans le respect des exigences réglementaires.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Les tests d'activité des vaccins et produits immunogènes sont réalisés sur animaux lorsque la réglementation l'impose. Certains de ces tests sont en cours de remplacement par des tests in vitro de type ELISA.

Réduction :

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

Le nombre d'animaux par groupe est défini par la réglementation ou par une étude statistique. Il ne peut être réduit au-delà. En revanche, une optimisation visant à réduire le nombre de groupes témoins est pratiquée aussi souvent que possible.

Raffinement :

Pour certains tests d'activité, des tests d'immunogénicité sont en cours de développement lorsqu'il n'est pas possible de supprimer l'utilisation de l'animal.

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

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

1854- De nombreuses maladies sont dues à un déficit (absence, mutation) d'un ou plusieurs gène(s). La thérapie génique est une stratégie qui consiste à apporter une version corrigée du gène en utilisant un vecteur dérivé de virus. Cependant, cette approche, particulièrement adaptée étant donnée la capacité naturelle des virus à infecter nos cellules, doit faire face à un obstacle majeur. En effet, notre système immunitaire s'est spécialisé pour se protéger contre le « non-soi »; ainsi, les vecteurs



viraux, bien que ne pouvant pas causer de maladie, ainsi que la protéine médicament, sont détectés par le système immunitaire comme étranger et dangereux. Ces réponses immunitaires vont fortement compromettre l'efficacité du traitement et il apparaît donc nécessaire aujourd'hui de mieux les comprendre.

Certaines maladies de l'œil ont comme origine un défaut génétique, comme par exemple l'amaurose de Leber, qui constitue l'une des principales causes de cécité chez l'enfant puisqu'elle est retrouvée chez environ 10 à 20% des enfants aveugles. Néanmoins, des essais très prometteurs de thérapie génique ont été menés depuis 2007, suite auxquels les patients traités ont retrouvé la vision de l'œil traité. Cependant, aucune étude approfondie n'a été menée afin de caractériser les réponses immunitaires induites, à la fois dans l'œil, mais aussi dans le reste de l'organisme.

Le projet vise donc à caractériser les réponses immunitaires induites envers la protéine médicament, à la fois dans l'œil et dans le reste de l'organisme, après l'injection de vecteur thérapeutique novateur dans l'œil. A terme, cela a pour but de mieux identifier l'impact de ces traitements innovants sur l'organisme afin d'en assurer la sécurité et le bon déroulement.

Il s'agit donc d'une étude systémique, à l'échelle de l'organisme entier (œil, rate, ganglions, sang) qui ne peut pas être remplacée par des expériences in vitro. Dans ce contexte, afin de respecter le bien-être animal, la règle des "3R" va être appliquée selon plusieurs axes :

-Remplacement : Toutes les productions de vecteurs seront testées sur lignées cellulaires afin de vérifier leur infectiosité avant de les injecter aux animaux.

-Réduction : le nombre d'animaux utilisé (582 souris) a été calculé par des bio-informaticiens à partir d'outils statistiques (test de puissance) permettant de réduire le nombre d'animaux tout en gardant des résultats robustes, ainsi qu'à partir de nos connaissances sur ce type d'étude.

-Raffinement : pour optimiser l'expérimentation, toutes les procédures seront planifiées de manière à obtenir un maximum d'informations de chacune des expériences. Par exemple, certaines seront regroupées, ce qui permettra de n'utiliser qu'un groupe de souris contrôle au lieu de deux. Plusieurs points limites seront définis et les animaux seront anesthésiés avant tout acte douloureux. Par ailleurs, dans la mesure du possible et du réalisable, les procédures seront réalisées en double aveugle. Enfin, les procédures ne seront réalisées que si la procédure précédente est concluante. A l'inverse, le projet sera arrêté.

1855- Ce projet a pour objectif d'évaluer la pathogénicité des agents infectieux (virus/toxine) entrant dans la fabrication de vaccins destinés à l'Homme. Ces tests de contrôle qualité assurent la mise sur le marché de lots de vaccins conformes aux normes d'innocuité et de sécurité définies réglementairement.

Les tests de contrôle de pathogénicité consistent à administrer un produit à des animaux, les héberger pendant la période nécessaire à la vérification de l'absence d'effet indésirable, par exemple lié à la présence d'un agent infectieux mal inactivé ou à la persistance d'un effet toxique, et d'étudier sa virulence. Ce projet représente l'ensemble des essais menés systématiquement sur chaque lot de vaccins produits.

Les évaluations sont faites sur des souris et des cobayes. Suite à l'injection du produit testé les animaux peuvent présenter des signes cliniques. Dans certains cas des points limites spécifiques sont définis. La prise en charge d'un animal ayant des signes cliniques de maladie non attendus est réalisée sous la responsabilité d'un vétérinaire. Le degré de sévérité est considéré comme modéré pouvant aller jusqu'à sévère pour les souris. Il est sévère pour les cobayes.

Ce projet pourra engendrer l'utilisation d'au maximum 69500 souris et 50 cobayes sur une période de 5 ans. Les bénéfices attendus de ce projet sont d'une part de contribuer à la libération de lots de produits conformes aux spécifications et aux textes de référence en vigueur et d'autre part, d'assurer le niveau de formation / qualification du personnel pour chacun de ces tests conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication.

Suite à l'atteinte du point limite ou en fin de test, la majorité des animaux utilisés est euthanasiée selon les méthodes recommandées par la réglementation, par la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux et approuvées par le Comité d'Ethique. Une petite partie des animaux peuvent être réutilisés pour des besoins de formation dans le respect des exigences réglementaires.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Il n'existe pas à ce jour de méthode alternative au recours à l'animal selon les exigences réglementaires de tous les pays de destination pour les tests (procédures) du présent Projet.

Réduction :

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

Raffinement :

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

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

1856- L'anesthésie générale des chevaux présente un risque important, à raison d'un accident pour 100 anesthésies. Le maintien de la fonction cardiovasculaire ainsi que la qualité du réveil sont essentiels afin de diminuer ce risque. Dans le domaine de l'anesthésie des Chevaux, le nombre de molécules accessibles et autorisées est réduit. L'introduction sur le marché de molécules permettant une induction et un réveil rapides serait très appréciée des vétérinaires praticiens qui exercent au quotidien au contact des chevaux. Notre équipe cherche à démontrer l'intérêt, en anesthésie vétérinaire équine,

de l'utilisation d'une molécule déjà utilisée chez l'Homme et d'autres espèces animales. Avant de tester la molécule chez le Cheval, nous nous sommes assurés que cette molécule a les effets pharmacologiques recherchés. Cependant, chez le Cheval, certains des mécanismes d'action restent à étudier de façon à confirmer l'intérêt et la sécurité du recours à cette molécule. Les propriétés de cette molécule semblent donc très intéressantes pour le patient équin mais aussi pour le vétérinaire soumis à l'exposition chronique massive des vapeurs anesthésiques. Notre équipe doit donc montrer dans un premier temps que la molécule permet de maintenir l'anesthésie générale chez le cheval et que la quantité nécessaire de produit est compatible avec un coût abordable en pratique vétérinaire. Il n'est pas possible d'obtenir ces renseignements autrement qu'en utilisant un animal vivant, car les phénomènes physiologiques que nous observons sont complexes. Notre objectif scientifique nous porte à choisir l'espèce cible de notre molécule le Cheval. Un cheval sera utilisé pour ce projet, qui est une étude préliminaire. C'est le nombre minimal nécessaire pour déterminer la faisabilité de cette anesthésie innovante et l'intérêt de cette molécule. En fonction des résultats, un autre projet sera soumis pour une demande d'autorisation. Le Cheval utilisé sera anesthésié dans un Centre Hospitalier Vétérinaire spécialisé dans les Chevaux. Il sera maintenu sous anesthésie, sans aucun stimulus douloureux pendant toute la durée de l'expérience. Il sera particulièrement suivi dans la phase de réveil pour éviter toute blessure.

1857- Les maladies métaboliques (diabète, dyslipidémie, obésité...) sont un problème de santé publique qui touche de plus en plus de personnes dans le monde. Des traitements existent mais ils sont contraignants et souvent non satisfaisants. Ces maladies et leurs conséquences (neuropathie, néphropathie, troubles cardiovasculaires etc...) sont en constante augmentation et représentent un enjeu thérapeutique de taille pour les chercheurs. Les mécanismes du développement de ces pathologies ne sont pas encore connus, c'est pourquoi une recherche active de nouvelles thérapies, de nouveaux procédés d'administration, de biomarqueurs et de nouvelles cibles thérapeutiques est nécessaire. Cette recherche peut se faire grâce à des modèles animaux de ces troubles métaboliques (modèles pathologiques). La composante génétique jouant un rôle important dans ces maladies, des souris transgéniques pourront être utilisées comme modèles pathologiques et/ou mécanistiques de ces troubles.

L'objectif de ce projet est d'une part, d'étudier les altérations métaboliques et leurs conséquences physio-pathologiques par l'observation de biomarqueurs en biochimie et/ou imagerie, consécutives à un régime alimentaire gras de quelques semaines à plusieurs mois chez la souris, et d'autre part de tester de nouvelles approches thérapeutiques (petites molécules, siRNA, anticorps, peptides...). En effet, les souris pourront être soumises à des administrations répétées d'agents thérapeutiques simultanément ou à la suite d'un régime gras.

Dans le cadre du processus de développement des médicaments, les études *in vivo* sont pratiquées seulement pour les meilleurs produits identifiés *in vitro*, et ceci afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés. Seul le recours à des tests *in vivo*, sur un modèle approprié, permet de valider dans un organisme intégré "complexe" l'activité du produit. Les techniques d'imagerie permettent des études longitudinales du développement d'une pathologie et/ou de l'efficacité d'un traitement thérapeutique en réduisant le nombre total d'animaux nécessaires à leurs validations. Les études réalisées au sein du Centre de Recherche sont encadrées par des consignes établies et validées par le Comité d'Éthique, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (l'hébergement, les soins, la manipulation, les expérimentations), et ayant toutes pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal. Par ailleurs, chaque procédure impliquant l'utilisation d'un animal est soumise à approbation par le Comité d'Éthique, avant toute intégration des animaux dans les études. Un support en bio-statistiques est apporté au Comité d'Éthique par des experts de la spécialité, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées, et réduire ainsi le nombre d'animaux utilisés dans les études. Enfin, les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques fondamentaux. Ce projet couvre l'utilisation d'un maximum de 4200 souris pour 5 ans.

1858- L'angiogenèse est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins indispensable au cours de nombreux processus physiologiques normaux comme le développement embryonnaire. L'angiogenèse intervient également dans le processus de cicatrisation. Une angiogenèse insuffisante peut compromettre la cicatrisation des plaies comme par exemple chez le patient diabétique. Le ralentissement de la cicatrisation représente un risque majeur de complications tel que l'ulcère d'un membre inférieur chez ces patients qui peut conduire à l'amputation.

Notre recherche est concentrée sur de nouvelles voies mécanistiques pour identifier de nouvelles molécules qui stimulent l'angiogenèse pour traiter les pathologies associées à un retard de la cicatrisation. Le but de notre étude est d'évaluer l'efficacité de ces molécules sur des modèles de blessures chez la souris diabétique après leur validation sur des modèles *in vitro*. Les tests *in vitro* permettent d'identifier l'activité stimulatrice en particulier sur les cellules endothéliales (prolifération, formation de vaisseaux) et déterminer certains mécanismes de la molécule. Par contre, ils ne peuvent pas refléter le contexte multifactoriel d'un organisme vivant qui influence l'angiogenèse comme l'inflammation en particulier dans des contextes pathologiques comme le diabète. Les molécules seront testées sur un modèle de blessure largement publié utilisant des souris diabétiques (type I et type II) pour être représentatif de la diversité du diabète chez l'homme et sur des souris non diabétiques en référence. Les essais chez l'animal seront limités au strict minimum pour valider l'efficacité de la molécule. Le nombre d'animaux lors d'une expérimentation est réduit au maximum en gardant la taille de groupe permettant d'obtenir une significativité des résultats sur la base d'un calcul statistique. Pour réduire le nombre de lots, l'étude de plusieurs molécules sera regroupée avec un seul groupe contrôle. Pour réduire le nombre d'animaux de moitié, 2 blessures seront faites par animal ce qui permettra de délivrer 2 valeurs, une économie réalisée de 50% d'animaux. Le nombre total d'animaux utilisés dans nos études de ces 5 prochaines années est de 300. Ce nombre a été réduit de plus de 80% avec le

remplacement par des tests in vitro sur l'ensemble des molécules candidates et le regroupement d'expérimentations. Le nombre de souris est limité à 2 maximums par cage pour le confort des animaux.

1859- En dépit des efforts réalisés ces dernières années dans la validation de nouvelles cibles pour le traitement du cancer, les échecs en clinique des thérapies innovantes sont encore trop nombreux en raison en particulier de l'acquisition de résistance secondaire.

Il existe donc aujourd'hui un consensus selon lequel l'amélioration de nos systèmes d'évaluation passe par la mise au point de modèles in vivo mieux caractérisés et plus proches des pathologies cancéreuses étudiées. Les greffes de tumeurs humaines chez la souris permettent de conserver les caractéristiques des tumeurs humaines et constituent donc des modèles d'étude adaptés.

Les thérapies ciblées ont connu un grand succès dans de multiples indications. Cependant, la cellule tumorale acquiert une résistance à ces thérapies ciblées et la maladie progresse habituellement dans les 5-7 mois. La compréhension des mécanismes qui régissent la résistance acquise à ces thérapies constitue donc un enjeu majeur.

Un projet clinique a été mis en place sur l'étude des mécanismes de résistance aux thérapies ciblées. Ce projet est divisé en deux sous parties:

-Une composante clinique ou à l'aide des technologies à haut débit nous étudierons les mécanismes de résistances d'un point de vue génétique.

-Une composante préclinique qui a pour but de développer des modèles de résistances acquises aux thérapies, pour une validation fonctionnelle et d'identifier de nouvelles thérapies.

Une première phase est en cours où nous développons des modèles de tumeurs humaines greffées sur souris. Nous estimons pouvoir développer une centaine de modèles avec une résistance acquise aux thérapies ciblées. Pour chacun de ces modèles établis, des lignées cellulaires seront développées pour réaliser un dépistage de médicament dirigé par les résultats de génétiques. Nous validerons par la suite les résultats obtenus in vitro par des tests pharmacologiques sur nos modèles de souris. Cette première étape in vitro permettra de sélectionner les composés les plus efficaces et cela aura pour conséquences de réduire le nombre d'animaux.

L'expérience se déroule en deux parties.

La première partie consistera en la validation des modèles. Cette étape est indispensable pour vérifier que les modèles obtenus ont gardés leur résistance à une thérapie. Cette étape sera effectuée in vitro et in vivo. Nous allons comparer l'efficacité du composé en question versus son placebo. Pour cette étape nous utiliserons 2 000 souris au maximum. Le nombre dépendra du nombre de modèles tumoraux obtenus.

La deuxième partie sera une étude pharmacologique. A l'aide des résultats de biologie moléculaire et in vitro, les 2 composés ayant la meilleure efficacité et/ou le plus de pertinence clinique pour un modèle donné seront évalués in vivo. Les deux médicaments seront évalués en monothérapie et en combinaison. Le nombre de souris utilisé pour cette étape est de 6 000 souris au maximum.

Les résultats que l'on va obtenir à partir des données générées par l'analyse moléculaire à haut débit vont nous permettre de limiter le nombre d'animaux utilisés dans cette procédure. En effet l'objectif est de pouvoir sélectionner les thérapies suivant les modifications génétiques observées (médecine personnalisée). Il s'agit donc d'un point de réduction.

Pour le bien être animal, et le raffinement des expériences, nous prévoyons pour tout actes pouvant engendrer un stress ou une douleur, l'utilisation d'anesthésie et/ou d'analgésique. Afin de réduire le stress de l'animal, l'environnement sera enrichi avec du coton leur permettant de se protéger et de créer un nid. Les animaux recevront de l'aliment type Diet gel energy en cas de problème lié à l'alimentation.

Avant de pouvoir tester les médicaments sur l'être humain, il est indispensable de faire cette évaluation sur un organisme complexe afin de confirmer les résultats obtenus in vitro. Il n'existe donc pas de méthode alternative de remplacement permettant d'éviter l'utilisation de l'animal. Les techniques de biologie moléculaire vont nous permettre d'émettre des hypothèses qui seront validées dans un premier temps in vitro puis in vivo. Ainsi pour répondre à toutes ses questions, nous aurons besoin de 8 000 souris au maximum pour ce projet. Le nombre dépendra du nombre de modèles tumoraux obtenus et a été calculé en utilisant des méthodes de calcul de puissance, et en retenant le nombre minimum nécessaire et suffisant pour obtenir les résultats (autre point de réduction).

1860- En France, l'élevage des oies et des canards est principalement destiné à la production de foie gras. Le système de production du foie gras est basé sur la capacité spontanée des palmipèdes à l'hyperphagie, à la synthèse et au stockage des graisses dans le foie ; phénomène probablement lié au comportement migratoire de leurs congénères sauvages qui ont la capacité naturelle à surconsommer des aliments pour stocker l'énergie avant de longues migrations. Les producteurs ont développé des programmes d'alimentation spécifiques pour profiter de ce phénomène naturel. Cependant, aujourd'hui la production de foie gras est sujette à certaines controverses. Il y a un manque de compréhension et d'acceptation du système de production, concernant notamment la pratique du gavage qui est considérée comme étant préjudiciable au bien-être des animaux.

Dans la pratique, le programme d'alimentation des palmipèdes en croissance a pour objectif de préparer les oiseaux pour le gavage, en assouplissant l'oesophage et en améliorant la capacité d'extension de ce dernier. Mais actuellement l'appréciation du niveau de préparation des animaux au gavage ne peut se faire que par l'intermédiaire d'enregistrements de niveaux moyens de consommation alimentaire par lot d'animaux durant la phase de pré-gavage ou par contrôle après dissection sur quelques individus.

Nous proposons une mesure in vivo individuelle du volume de l'œsophage qui ne nécessite pas la mise à mort des animaux. Tout en se basant sur le principe du gavage, cette méthode consiste à mesurer le volume de l'œsophage en introduisant via un embuc de gavage un ballonnet (préservatif) dans l'œsophage. Ce ballonnet est ensuite gonflé à pression constante (70 mm de mercure ; pression mesurée à l'aide d'un tensiomètre médical) et le volume d'air introduit est mesuré par déplacement d'une colonne d'eau qui ré-aspire l'air injecté dans le ballonnet. Cette méthode nécessite statistiquement 25 animaux par modalité testée. On considère que cette procédure sera effectuée au maximum sur deux essais par an, pendant cinq ans, avec un maximum de 4 modalités par essais : soit au maximum 1000 animaux. A la suite de cette mesure, les animaux seront placés en salle de gavage et suivront la pratique agricole du gavage.

1861- Dans le cadre de la production et du développement de médicaments à usage humain ou vétérinaire, l'obtention d'anticorps spécifiques est indispensable pour répondre aux enjeux de la santé humaine. En effet, les spécialités issues de cette production contribuent à la fabrication et au développement de médicaments nécessaires à la protection contre des maladies infectieuses.

Afin de produire ces anticorps, les chevaux sont immunisés de manière répétée afin d'obtenir une quantité élevée d'anticorps dans leur sang. L'immunisation est réalisée par des injections d'antigènes, comme par exemple des vaccins.

A l'issue de la phase d'immunisation, des prélèvements sanguins sont réalisés sur les chevaux.

Les animaux peuvent présenter des inflammations locales liées aux injections répétées et à la nature des antigènes injectés. Dans de rares cas, des effets secondaires plus importants peuvent être observés. Des mesures vétérinaires sont alors immédiatement mises en place. (traitements, arrêt temporaire ou définitif du protocole).

280 chevaux sont concernés pour la durée du projet (5 ans). A la fin du projet les chevaux sont, pour leur grande majorité, et replacés en tant que chevaux de loisir.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

L'état de la science ne permet pas de fabriquer d'anticorps polyclonaux autrement qu'en ayant recours à l'animal.

Dans le cas de certaines maladies, des anticorps monoclonaux peuvent être synthétisés (production industrielle sans animaux) mais les résultats de protection obtenus à ce jour avec de tels anticorps ne sont pas satisfaisants.

Réduction :

Le nombre d'animaux est proportionnel à la demande de produits thérapeutiques mis à la disposition des patients humains ou animaux.

Le nombre d'animaux utilisé est limité au maximum. Pour ce faire, les globules rouges leur sont restitués en partie, ce qui permet de répéter les prélèvements et d'obtenir des quantités importantes d'anticorps avec le moins d'animaux possible, sans nuire à l'état général des donneurs.

Raffinement :

Les chevaux sont hébergés en groupes stables de 15 à 30 individus dans des parcs disposant d'un abri paillé, d'un paddock stabilisé et d'une pâture. Ils sont observés quotidiennement. Les prélèvements sont réalisés sur des animaux en parfaite santé. Des examens sanguins sont très régulièrement effectués afin de détecter précocement toute éventuelle anémie. En cas de problème de santé, un vétérinaire effectue le suivi clinique et prescrit un traitement. Il peut décider à tout moment de la réforme d'un cheval s'il la juge nécessaire. Dans ce cas, le cheval reçoit les soins prescrits, avant d'intégrer le circuit d'adoption mis en place par la société.

1862- Notre projet a pour but de mieux comprendre la physiopathologie des syndromes hémophagocytaires d'origine héréditaires par la caractérisation de différents modèles murins invalidés pour des gènes responsables de cette pathologie chez l'homme. Pour cela, nous induirons la pathologie en infectant ces différents modèles par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV, souche WE), et nous suivrons différents paramètres immunitaires suite à l'infection. D'autre part, nous regarderons l'effet de différents traitements thérapeutiques sur cette pathologie.

Chez l'homme, le défaut de l'activité cytotoxique des lymphocytes tueurs est associé à différentes pathologies immunitaires d'origine héréditaire. Toutes ces affections sont caractérisées par l'apparition d'un syndrome lymphoprolifératif avec activation macrophagique ou syndrome hémophagocytaire (SH). Il semble que les événements responsables du déclenchement du SH soient la persistance des cellules présentatrices d'antigène et la sécrétion d'IFN $\gamma$ . Notre hypothèse de travail est qu'en modulant la sécrétion d'IFN $\gamma$ , nous puissions traiter le SH.

Afin de tester différentes approches thérapeutiques, les modèles murins des SH héréditaires sont les meilleurs modèles animaux qui permettent de reproduire la pathologie humaine. 2 traitements pharmacologiques capables de neutraliser l'IFN $\gamma$  ou d'inhiber la voie Jak1-2 seront utilisés sur des souris qui ont été préalablement infectées par le LCMV afin d'initier le SH. Les différentes manifestations cliniques et biologiques du SH (hypothermie, cytopénie, hyper-cytokinémie, hémophagocytose, infiltration des organes par les lymphocytes et macrophages activés) seront alors regardées au cours de l'infection (numération sanguine) puis après euthanasie de l'animal. Cette étude, prévue sur 5 ans nécessitera au total 528 souris.

Les différents protocoles expérimentaux ont été consciencieusement élaborés afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats interprétables et statistiques. Le protocole de l'infection par le LCMV permettant d'induire le SH a été déterminé par un précédent projet et permet donc de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Nous nous attachons à réduire au maximum la souffrance des souris. Une courbe de poids est établie pour chaque souris. Si une souris perd plus de 30% de sa masse corporelle, cela entraîne l'euthanasie anticipée de l'animal.

Ce projet devrait permettre de mieux comprendre la physiopathologie du SH chez l'homme et de proposer de nouvelles thérapeutiques pour traiter le SH chez l'homme.

1863- Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer les effets bénéfiques de candidats-médicaments dans un modèle animal mimant certains aspects du syndrome de stress post-traumatique, syndrome rencontré chez l'homme suite à des événements traumatiques majeurs (soldats revenants de conflits, agressions ...).

Pour cela, au cours de chaque étude, des souris seront soumises à un stress (par deux contacts de 5 min chacun avec leur prédateur naturel, le rat), puis leur anxiété et leur activité locomotrice seront évaluées jusqu'à 7 jours après le stress (en général 6 groupes avec n=12 animaux/groupe, soit un nombre prévisionnel de 2160 souris et de 300 rats sur 5 ans). Le candidat médicament sera en général administré après le stress (pour mimer la situation clinique), l'objectif étant de détecter des molécules permettant de réduire l'état anxieux des souris. A la fin de chaque étude, des prélèvements de sang et/ou de tissus pourront être effectués.

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur l'anxiété. Or avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'un candidat médicament. A ce jour, la souris est l'espèce qui est la plus réceptive au stress induit par le prédateur.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à des procédures peu invasives
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

1864- Ce projet s'inscrit dans une série de tests et de stratégies réglementaires permettant l'évaluation de la toxicologie génétique des substances d'essai.

Les altérations génétiques dans les cellules somatiques peuvent s'accumuler et conduire au cancer ou à des dégénérescences tissulaires. Dans les cellules germinales, ces altérations peuvent conduire à des avortements spontanés, de l'infertilité ou des anomalies génétiques transmises à la descendance.

Le test du micronoyau in vivo est un test de toxicologie génétique qui permet de mettre en évidence le potentiel d'une substance à induire des lésions cytogénétiques. Ces lésions peuvent être de type structurale lorsque la substance induit des cassures chromosomiques conduisant à la perte de fragments de chromosomes (substance interagissant directement avec l'ADN), ou numérique lorsqu'elle induit la perte de chromosomes entiers (substance interagissant avec l'appareil mitotique). Dans les 2 cas, les cellules subissent des altérations importantes et irréversibles de leur intégrité génétique. En effet, les fragments de chromosomes ou chromosomes entiers ne sont alors pas répartis équitablement dans les cellules lors de la mitose. Comme ils ne sont pas intégrés au noyau principal, ces fragments ou chromosomes entiers forment des micronoyaux dans les cellules interphasiques.

Lorsqu'un érythroblaste se transforme en érythrocyte immature (parfois désigné sous le terme d'érythrocyte polychromatique, ou de réticulocyte), le noyau principal est expulsé et les éventuels micronoyaux qui se sont formés peuvent subsister dans le cytoplasme. La visualisation ou la détection des micronoyaux dans ces cellules est facilitée par l'absence de noyau principal.

Le test est pratiqué chez des mammifères. Le rat et la souris sont les espèces les plus couramment utilisées et recommandées par la ligne directrice OCDE No. 474 décrivant la réalisation du test.

Les animaux sont exposés à la substance d'essai habituellement par gavage ou par injection intraveineuse.

La détection des lésions cytogénétiques résultant de l'action d'une substance d'essai est permise par l'analyse des érythrocytes prélevés dans le sang périphérique ou la moelle osseuse des animaux euthanasiés au(x) moment(s) approprié(s) après le traitement.

Les érythrocytes micronucléés nouvellement formés sont identifiés et dénombrés, une fois colorés, par examen visuel au microscope ou par analyse automatique. Un accroissement de la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés chez les animaux traités est le signe d'une lésion chromosomique structurale ou numérique induite.

En raison de la complexité que représente un organisme vivant (notamment les facteurs du métabolisme in vivo, la pharmacocinétique et les processus de réparation de l'ADN), il n'existe pas à ce jour de méthode alternative in vitro pouvant remplacer ce test à l'identique.

Le nombre d'animaux utilisés est déterminé a minima afin d'obtenir des résultats robustes d'un point de vue statistique et ainsi d'atteindre tous les objectifs de l'étude.

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

Le nombre d'animaux utilisé dans le cadre de ce projet peut être estimé à un total de 4000 sur 5 ans. Cette procédure expérimentale peut parfois être incluse au sein d'une étude de toxicologie chronique, ce qui réduit fortement le nombre d'animaux utilisé.

1865- L'Observatoire National des Anomalies Bovines a permis de détecter l'émergence d'une anomalie génétique dans la race Montbéliarde : le Syndrome d'Hypoplasie Généralisée Caprèoliforme. Les animaux atteints présentent notamment un retard de croissance, une altération de la coloration des poils, et une tête allongée dite « de chevreuil ». Ces symptômes rappellent ceux associés à certaines pathologies humaines, comme le syndrome de Seckel. La mutation responsable de cette anomalie a été identifiée et se trouve sur le gène CEP250 qui code pour une protéine du centriole, centre organisateur de la division cellulaire. Cependant, cette mutation n'explique pas à ce jour les désordres observés sur les animaux. De plus, des mutations identifiées sur d'autres gènes codant pour des protéines centriolaires ont été mises en évidence dans le cas de microcéphalie primaire héréditaire et de syndrome de Seckel, sans là non plus, expliquer l'aspect clinique.

Pour ces raisons, l'analyse plus approfondie de ces anomalies est intéressante mais les études sur l'espèce bovine se heurtent à plusieurs types de difficultés :

- le maintien des animaux atteints de cette anomalie génétique dans les unités expérimentales ainsi que leur retard de croissance engendrent un surcoût financier,
- le temps de génération ainsi que la faible prolificité de l'espèce bovine sont également des facteurs défavorables pour travailler sur cette espèce animale.

Par ailleurs, notre objectif étant d'étudier les anomalies multiples (problème de reproduction, de développement...) qui affectent différents organes/tissus, le recours à l'animal vivant est indispensable. L'utilisation de lignées cellulaires ne permettrait pas d'étudier l'ensemble des symptômes attendus.

La modélisation de cette pathologie sur modèle souris a donc été entreprise, et la création de lignées transgéniques mimant la mutation bovine a été réalisée à cette fin.

Deux lignées transgéniques et une lignée contrôle seront indispensables à ce projet, et à raison de 90 animaux par lignée, nous aurons recours à un minimum nécessaire de 270 animaux. Ce nombre a été défini de manière à se limiter aux seules expériences indispensables, statistiquement exploitables, et en prenant compte les aléas de reproduction de la lignée de laboratoire utilisée. Les mâles comme les femelles seront utilisés afin de réduire le nombre d'animaux produits.

Ces animaux seront surveillés tout au long de l'expérience de manière à intervenir immédiatement en cas de souffrance. Ils seront hébergés dans une animalerie pour rongeurs en essayant de respecter leur comportement naturel (pour exemple, des papiers mouchoirs seront disposés dans les cages pour que les souris puissent faire leur nid).

Ce projet vise à caractériser finement le phénotype des animaux, en étudiant :

- La reproduction dans ces lignées (durée de gestation beaucoup plus courte que chez le bovin, avec une taille moyenne des portées plus élevée),
- Les défauts éventuels de développement (poids à la naissance et croissance des souriceaux, anomalies de squelette, de coloration du pelage...) et de vieillissement.

La compréhension des mécanismes biologiques liant le génotype au phénotype, outre accroître nos connaissances cognitives, devrait potentiellement avoir des retombées positives tant en santé animale qu'en santé humaine.

1866- La campylobactériose est la zoonose la plus fréquemment rencontrée chez l'Homme au sein de l'Union européenne avec plus de 210 000 cas déclarés en 2013. Cependant, les campylobactérioses ne font pas l'objet d'une déclaration obligatoire, le nombre réel de cas est donc estimé à environ neuf millions chaque année au sein de l'UE.

La source principale des infections humaines est l'ingestion d'aliments contaminés, en particulier les viandes crues ou insuffisamment cuites. La viande de poulet serait, à elle seule, responsable de 20 à 30 % du total des cas chez l'homme. La prévalence de ce germe dans les élevages, l'abattoir et sur les produits au niveau de la distribution est très élevée, puisque elle est supérieure à 70 % en France et en Europe. La contamination de la viande par *Campylobacter* est directement liée à la contamination des volailles à l'élevage via le processus d'abattage et la contamination des carcasses à l'étape d'éviscération principalement. Réduire la présence de *Campylobacter* chez les poulets avant l'abattage pourrait réduire le risque de campylobactériose de 50 %.

L'objectif de ce projet est d'évaluer les différences de capacité de colonisation du poulet de chair de différentes souches de *Campylobacter*. Une meilleure compréhension de la colonisation du poulet de chair par *Campylobacter* permettra de proposer des moyens de lutte appropriés pour limiter cette contamination. De plus, ce projet apportera des informations sur le pouvoir de colonisation de la bactérie et permettra de faire un lien entre ses capacités et les caractéristiques génétiques et moléculaires de *Campylobacter*.

La capacité de différentes souches de *Campylobacter* parfaitement caractérisées sera aussi évaluée.

La procédure mise en œuvre consiste à comparer la contamination, au niveau quantitatif et qualitatif, de différents organes des poulets (intestin, caecum mais également foie, rate et ovaire si femelle) infectés par différentes souches de *Campylobacter*. L'infection des animaux se fait par voie orale et les animaux seront nourris *ad libitum*. Les prélèvements seront effectués après 27 ou 28 jours d'élevage et nécessitent l'euthanasie des animaux. 15 animaux seront utilisés par souche de *Campylobacter* testée. Ce nombre a été déterminé pour estimer la moyenne de la contamination des différents organes par *Campylobacter* tout en tenant compte de la variabilité interindividuelle. Cinq souches de *Campylobacter* seront testées par procédure soit un total de 90 animaux par procédure avec le groupe témoin. Compte tenu de la durée de la procédure, des

disponibilités d'utilisation des isolateurs de l'établissement ainsi que du nombre de souches à tester (60 souches maximum), 1080 animaux seront utilisés au maximum pour les 5 années prévues de l'étude.

A ce jour, aucune méthode *in vitro* ne permet de mimer la colonisation de *Campylobacter* chez le poulet, mais une veille scientifique sera réalisée et ces méthodes seront mises en place dès que possible, le cas échéant. *Campylobacter* fait partie de la flore naturelle du poulet, le portage est donc asymptomatique et n'engendre aucune souffrance ou douleur aux animaux. Par ailleurs, les animaux seront élevés dans le respect des règles du bien-être animal et des critères zootechnique de l'espèce.

1867- Le diabète de type 2 est un véritable problème de santé publique et est décrit comme la première « épidémie » non infectieuse. Chaque année voit l'apparition de nouveaux cas, en 1985 on recensait 30 millions de diabétiques dans le monde et les prévisions sont à 300 millions en 2025. Cette pathologie, qui touche des individus de plus en plus jeunes, est complexe et multifactorielle. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement du diabète de type 2 est conditionnée par une connaissance parfaite de sa physiopathologie.

La dysfonction de la fonction pancréatique conduisant progressivement à un défaut de sécrétion insulinaire est l'étape clé vers la progression d'un diabète de type 2 sévère. Le modèle de rongeurs traités à la streptozotocine est un modèle unique de diabète de type 2 ne ciblant que les cellules bêta pancréatiques. La streptozotocine est un agent chimique affectant la fonction mitochondriale qui induit une destruction spécifique des cellules bêta pancréatiques productrices d'insuline. La perte en cellules bêta est variable et dépend des doses et de la fréquence d'administration de la streptozotocine. Il est donc possible d'induire chez le rongeur un diabète plus ou moins marqué provoqué par une disparition progressive des cellules bêta productrices d'insuline. C'est un modèle de choix qui permet de s'affranchir des autres composantes de la physiopathologie du diabète de type 2 telles que l'insulino-résistance périphérique. Par ailleurs, le fond génétique du modèle utilisé peut également avoir un impact significatif sur ce traitement streptozotocine. Ce projet s'inscrit dans le cadre de la recherche d'un antidiabétique efficace à long terme. Cette recherche fait appel à de nombreux tests *in vitro* permettant de sélectionner grâce à des critères stricts les meilleures molécules dont l'efficacité sera déterminée *in vivo* dans des modèles précliniques de diabète de type 2. L'utilisation du modèle de diabète chez le rongeur induit par injection de streptozotocine s'adresse plus particulièrement aux projets de recherche ciblant spécifiquement la cellule bêta pancréatique.

L'effet à long terme sur le métabolisme glucidique ne peut être détecté qu'après un traitement chronique de plusieurs semaines chez l'animal et requiert la physiologie qui intègre toutes les interactions hormonales et neuronales, ce qui n'est pas le cas sur des cellules ou organes isolés. Il n'y a donc pas de méthode alternative. Le projet fait appel à des animaux sains (contrôle) ou pathologiques (ayant reçus une injection de streptozotocine). Etant donné que ces animaux seront diabétiques, un soin particulier sera apporté à leur bien-être (apport hydrique, change de litière, maintien en groupe, surveillance fréquente du poids et de l'état général). Afin de le réduire au maximum, le nombre d'animaux utilisés pourra si besoin être réajusté suite à une estimation de la variabilité statistique des paramètres mesurés sur quelques études pilotes. On estime à 50 le nombre d'animaux par étude (souris et rat) et on pense réaliser 4 études par an soit environ 200 souris et/ou 200 rats par an pour toute la durée du projet.

1868- La Fièvre de la Vallée du Rift (FVR) est une infection virale due à un Phlebovirus (Famille de Bunyaviridae), et transmise par des moustiques (principalement genres *Aedes* et *Culex*). Le virus de la FVR est classé niveau III, et appartient au groupe des virus des fièvres hémorragiques, selon le CDC (Centers for Disease Control and Prevention). La maladie a été décrite pour la première fois en 1931 au Kenya ; puis dans plusieurs pays d'Afrique Subsaharienne, et récemment aux Comores et à Mayotte (2007).

Les animaux les plus sensibles à la FVR sont les bovins et les petits ruminants (chèvres, moutons), chez qui la maladie se manifeste par des avortements et des fortes mortalités, spécialement chez les jeunes. L'homme se contamine principalement par manipulation d'animaux infectés, à l'origine d'un pseudo-syndrome grippal non-spécifique la plupart du temps, mais peut aussi causer des méningo-encéphalites ou la mort. L'hypothèse de la persistance et de la circulation du virus de la FVR dans la faune sauvage se pose. A ce jour, aucune étude exhaustive du rôle potentiel de la faune sauvage dans la FVR n'a été conduite dans un écosystème donné. La réalisation à Mayotte, un écosystème insulaire où la FVR est présente, permet de délimiter les espèces à étudier, et de mieux cerner le cycle épidémiologique de la maladie.

Cette étude a pour objectif d'étudier le rôle potentiel des espèces de mammifères sauvages dans le cycle épidémiologique de la FVR à Mayotte. Pour cela, nous recherchons des traces d'infections anciennes, récentes, ou actives de la FVR ; dans les populations de mammifères sauvages terrestres présentes à Mayotte :

1. Les lémuriens : *Eulemur fulvus* (lémur brun)
2. Les chiroptères : *Pteropus seychellensis comorensis* (roussette), *Chaerephon pusillus* et *Chaerephon leucogaster* (microchiroptères)
3. Les micromammifères *Tenrec ecaudatus* (tanguie) et *Suncus madagascariensis* (musaraigne)
4. Les rongeurs : *Rattus rattus* (rat noir) et *Mus musculus* (souris)
5. Les carnivores : *Viverricula indica* (civettes)

Pour faire de telles analyses, il faudra prélever du sang (ou des organes) chez ces animaux. Le nombre d'animaux à prélever sera de maximum 140, pour les populations 1 à 4 citées ci-dessus. Cette taille d'échantillon vise à réduire le nombre d'animaux à inclure, tout en gardant une taille d'échantillon suffisamment importante pour pouvoir calculer des prévalences significatives. Pour les civettes (groupe 5), un maximum de 30 animaux sera prélevé (hors calcul échantillon), car cette espèce a été très peu capturée, et notre projet en constitue une phase exploratoire. Au total, un maximum de 590 animaux seront prélevés.

Des procédures de capture et de maintien de animaux en captivité viseront à réduire le stress, la douleur ou l'inconfort des animaux. Pour les lémuriens, des soins additionnels seront portés pendant l'anesthésie qui sera nécessaire pour les prises de sang (e.g. réhydratation, contrôle des fonctions vitales).

Enfin, cette étude se positionne dans un projet sur la FVR à Mayotte (2014-18), où de façon synchrone, des données sur les autres acteurs du cycle épidémiologique (bovins, ovins, caprins et moustiques) sont collectées.

L'impact de ce projet est de mieux comprendre les différents facteurs impliqués dans la ré-émergence du virus de la FVR à Mayotte, et de quantifier l'interface faune sauvage/animaux domestiques/humains. Il pourra servir comme modèle pour la FVR dans d'autres écosystèmes et pourra être utilisé comme cadre d'étude pour d'autres maladies arbovirales zoonotiques, ayant potentiellement un cycle dans la faune sauvage.

1869- L'une des principales recommandations pour « bien vieillir » consiste à prendre en charge précocement les maladies ou les troubles qui sont susceptibles d'entraîner une incapacité. Ce projet est en parfaite adéquation avec cette stratégie et vise à améliorer la qualité de vie et le vieillissement. En effet, la maladie de Parkinson (MP) se caractérise par une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques localisés dans la substance noire compacte perturbant le fonctionnement d'un ensemble de structures sous corticales constituant les ganglions de la base. La conséquence est, entre autres, l'apparition de la triade classique des symptômes moteurs de la maladie de Parkinson, à savoir rigidité, akinésie et tremblement de repos. Le problème majeur de cette maladie est que ces symptômes moteurs n'apparaissent qu'à partir d'un seuil critique d'environ 60-80 % de dénervation de ces neurones dopaminergiques. En d'autre terme, les symptômes moteurs n'apparaissent que très tardivement, lorsque la majorité des neurones dopaminergiques a déjà disparu. Dans un contexte clinique où les traitements disponibles sont uniquement symptomatiques sans permettre de soigner la maladie, et entraînant fréquemment de nombreux effets secondaires, il semble crucial d'identifier des stratégies de détection précoce, avant l'apparition des premiers symptômes moteurs, afin d'intervenir rapidement pour ralentir son évolution et préserver une meilleure qualité de vie pour ces patients sur une plus longue durée. C'est pourquoi, dans ce projet, nous proposons d'étudier l'état fonctionnel de structures sous-corticales sensorielles car nous considérons qu'étant sous l'influence directe du dysfonctionnement des ganglions de la base, ces structures devraient être les premières à subir l'influence des modifications fonctionnelles de ces structure. Des données préliminaires obtenues dans nos modèles animaux et chez le patient parkinsonien indiquent qu'elles représentent un sérieux potentiel de marqueur précoce de la MP qui nous semble important de tester et d'étudier à un stade pre-clinique chez le rat, puis à long terme, à un stade clinique chez le patient.

Le projet est composé de 8 procédures expérimentales différentes et requerra l'utilisation d'un maximum de 916 rats au total sur 5 ans.

Réduction : Ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

Raffinement : Le projet implique la mise en place d'un état pathologique chez le rongeur avec de la chirurgie lésionnelle de classe modéré. Cependant, l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permet de intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Remplacement : Ce projet a pour but de mesurer l'état fonctionnel de structures sous corticales du tronc cérébral, en particulier des réponses sensorielles de ces structures induites par des stimulations sensorielles naturelles telles que des flashes lumineux ou des sons. De ce fait, il est impossible de remplacer notre préparation in vivo par un modèle cellulaire ou une simulation computationnelle.

1870- Les angiomes caverneux ou CCM (Cerebral Cavernous Malformations; OMIM 116860) sont des malformations vasculaires localisées principalement dans le cerveau mais aussi dans la rétine. Cette pathologie touche de 0.1 à 0.5% de la population. Dans 20% des cas, la maladie est héréditaire, causée par la mutation d'un des 3 gènes identifiés précédemment et appelés « CCM1/2/3 ». Ces formes héréditaires sont très évolutives avec l'apparition de nouvelles lésions tout au long de la vie. Les angiomes caverneux peuvent entraîner des crises d'épilepsie et/ou des déficits neurologiques dus à des hémorragies cérébrales répétées. L'unique traitement possible aujourd'hui est l'ablation de l'angiome (neurochirurgie), qui se révèle impossible si la malformation est trop profonde en raison du risque vital. Les mécanismes responsables du développement de la maladie CCM sont encore largement méconnus. Il est indispensable de mieux comprendre ces mécanismes pour pouvoir définir des stratégies thérapeutiques non chirurgicales applicables à l'homme. L'accès aux tissus cérébraux de patients de leur vivant est impossible, même lors des procédures chirurgicales, qui induisent la destruction des tissus. Les études réalisées in vitro participent à la compréhension de la fonction des protéines CCM. Cependant, ces modèles ne constituent pas un modèle de la maladie CCM. La souris possède toute la complexité du réseau vasculaire cérébral trouvé chez l'homme et il existe aujourd'hui les outils nécessaires permettant d'induire une mutation dans l'un des gènes CCM. Nous avons développé et caractérisé 3 modèles CCM chez la souris, qui reproduisent fidèlement les malformations CCM du cerveau et de la rétine des patients. Des données récentes suggèrent l'implication de 2 voies de signalisation (c'est-à-dire de 2 systèmes de communication complexes, chacun constitué d'une cascade de signaux intra-cellulaires), bêta-caténine et TGFb/Bmp, dans le développement des lésions CCM.

L'objectif de notre projet est d'utiliser le modèle de la maladie chez la souris invalidée pour le gène CCM2 afin d'analyser en détail l'activation de ces 2 voies de signalisation candidates avant et pendant la formation des malformations vasculaires chez la souris.



Les deux procédures, de classe légère (injections), sont mises en œuvre par des personnes formées et déjà expérimentées. La procédure n°1 consiste en une injection unique d'un composé permettant d'invalider le gène CCM2 et de déclencher le développement de la maladie chez la souris. Elle concernera la totalité des animaux inclus dans ce projet (248 à 328 souris). Plusieurs approches expérimentales seront développées pour permettre un suivi de l'état d'activation des voies de signalisation au cours de la formation des lésions. La procédure n°2 (injection sur 6 jours consécutifs) concernera uniquement 8 lots d'animaux (44 à 56 souris sur la totalité des animaux inclus dans le projet). Cette procédure a pour but d'évaluer l'efficacité d'un agent inhibiteur de la voie béta-caténine sur la prévention du développement des lésions. Tous les animaux sont analysés à un stade où nous n'avons décelé aucun signe de souffrance lors de nos précédentes études. Ce stade est très bien caractérisé, ce qui nous permet de définir au plus juste le nombre d'animaux minimum nécessaire pour nos analyses. Nous veillons au bien-être de nos souris par des gestes simples (isolement des mères gestantes, mise à disposition de mouchoirs en papier pour la confection d'un nid, mise des gants dans la litière avant préhension des petits...). Notre projet s'inscrit dans le cadre d'un réseau ERA-Net (European Research Area Network). Nous sommes soutenus par l'Association de patients « Cavernomes Cérébraux France ». Nous leur présentons régulièrement l'avancée de nos recherches qui représentent pour eux l'espoir de voir dans un avenir proche une stratégie thérapeutique applicable à l'homme, notamment pour les patients non opérables.

1871- Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune rare caractérisée par la production d'autoanticorps (anticorps dirigés contre l'organisme) pathogènes et associée à une inflammation de plusieurs organes. Le développement de cette maladie semble parfois liée à des facteurs génétiques. Ainsi, une mutation du gène STING, conduisant à une hyperactivation de ce gène, a été décrite dans une famille comportant plusieurs membres atteints d'un syndrome inflammatoire systémique (appelé SAVI) associée à des symptômes proches d'un lupus. L'hyperactivation de Sting chez ces patients conduit à la production excessive d'interféron de type I (IFN-I), molécule importante dans le développement du LED. Afin de mieux comprendre les conséquences de cette mutation sur le développement d'une autoimmunité, nous avons produit un nouveau modèle transgénique murin (modèle Sting V154M), portant la mutation de sting équivalente à celle décrite chez les patients. Ce modèle va nous offrir l'opportunité d'effectuer des investigations impossibles chez l'Homme, notamment de comprendre les mécanismes du développement de l'inflammation et de l'autoimmunité en cas d'hyperactivation de Sting, et d'explorer les mécanismes de production d'autoanticorps.

Ce projet comprend 4 objectifs :

- I. Confirmer l'hyperactivation de Sting dans les animaux Sting V154M et étudier le phénotype des souris à l'état basal (phénotype des cellules immunitaires et développement d'une autoimmunité)
- II. Etudier la réponse anticorps
- III. Etudier les mécanismes de la production d'autoanticorps en cas de d'hyperactivation de Sting, en croisant le modèle Sting V154M avec un modèle transgénique murin (56R) permettant de suivre facilement les cellules produisant les autoanticorps
- IV. Etudier le rôle de l'IFN-I dans le phénotype observé chez les souris Sting V154M, en croisant les souris Sting V154M avec des souris déficientes pour le récepteur à l'IFN-I.

Afin de respecter la règle des 3R, une réduction du nombre d'animaux utilisés a été décidée. Pour répondre à ces 4 objectifs, et afin de pouvoir réaliser des tests statistiques, nous prévoyons d'analyser des groupes de 10 souris pour chaque question posée, soit 260 souris pour le projet global (voir procédures expérimentales).

Pour répondre à l'objectif de raffinement, les souris seront hébergées à plusieurs dans des cages de taille réglementaire, en ne dépassant pas le nombre maximal autorisé de souris par cage (souris rassemblées en groupes sociaux), et dans des cages comportant des enrichissements (nids). De plus, avant chaque prélèvement sanguin ou injection, les souris seront anesthésiées. Enfin, les souris seront observées régulièrement et les dispositions adéquates seront prises si la souffrance des animaux devait atteindre les points limites.

La règle du remplacement n'est pas applicable ici : en effet, nous devons avoir recours à un modèle in vivo afin d'étudier les réponses immunes et la production d'autoanticorps qui mettent en jeu des coopérations cellulaires multiples dans les organes lymphoïdes tels que la rate et les ganglions. Pour ces raisons, nous ne pouvons avoir recours à des modèles in vitro. En ce qui concerne les modèles in vivo, la souris est le modèle approprié afin d'étudier les fonctions du système immunitaire, car les connaissances chez la souris sont très développées dans le domaine de l'immunité et de l'autoimmunité.

Considérant le rôle important de l'IFN I dans la pathogénie du LED et d'autres interféronopathies (pathologies dues à une production excessive d'IFN-I), ce projet pourrait conduire à une meilleure compréhension des conséquences de la production excessive d'IFN I dans l'autoimmunité, et à l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces patients.

1872- Les troubles de l'anxiété tels que les phobies ou le syndrome de stress post-traumatique (SSPT) s'apparentent à des formes pathologiques de mémoire. Ils se caractérisent en effet par des associations exacerbées entre un événement émotionnellement négatif et l'environnement (contexte et/ou indices discrets) dans lequel cet événement a eu lieu. Une des approches les plus prometteuses pour traiter ces troubles vise à perturber ces associations entre événement traumatique et contexte lors d'une phase particulière de la mémoire appelée reconsolidation.

La mise en place de la mémoire à long terme se divise en effet en plusieurs phases. L'étape d'acquisition correspond à la phase initiale d'apprentissage. Elle est suivie d'une étape dite de consolidation qui permet la formation d'une trace mnésique stable. Lorsque la mémoire est réactivée (au moment du rappel du souvenir), cette trace mnésique va être déstabilisée et subir un processus de reconsolidation pour aboutir à une nouvelle trace stable mise à jour. D'un point de vue thérapeutique, la phase de reconsolidation offre donc la possibilité d'agir sur la trace mnésique déstabilisée et de provoquer ainsi une amnésie

sélective de l'évènement réactivé. Cette approche est déjà mise en pratique chez l'homme pour traiter le SSPT. Elle associe la thérapie comportementale (pour provoquer chez le patient le rappel du souvenir traumatique) et un traitement pharmacologique (un agent chimique capable de bloquer la reconsolidation du souvenir réactivé). Cependant, la molécule utilisée actuellement, un beta-bloquant connu pour perturber la reconsolidation, n'est que partiellement efficace. Il est donc important d'identifier d'autres systèmes neuromodulateurs capables d'interférer avec le processus de reconsolidation.

La nociceptine est un peptide neuromodulateur qui agit par l'intermédiaire de récepteurs situés entre autre dans les centres nerveux importants pour la mémoire. Elle est déjà connue pour avoir un effet inhibiteur sur les premières étapes de la mémoire (acquisition et consolidation). Au vu des similitudes entre les mécanismes de consolidation et de reconsolidation on peut supposer que la nociceptine pourrait être un nouveau moyen de bloquer la reconsolidation. L'objectif de l'étude est de tester cette hypothèse qui n'a jusqu'ici jamais été explorée.

Les expériences seront réalisées chez la souris C57Bl6. En effet, il est possible de reproduire chez cette espèce tous les phénomènes décrits plus haut chez l'homme: acquisition, consolidation et reconsolidation d'une mémoire émotionnelle négative, ainsi que la perturbation de la reconsolidation en traitant par un bêta-bloquant. Les animaux seront dans un premier temps conditionnés selon une procédure d'apprentissage pavlovien classique (conditionnement de peur). La mémoire sera ensuite réactivée pour induire la reconsolidation et les souris seront traitées par des molécules capables d'activer spécifiquement le système nociceptine. On évaluera ainsi la capacité de ces traitements à produire une amnésie sélective du conditionnement effectué. L'objectif du projet étant l'étude d'un comportement complexe, la reconsolidation de la mémoire aversive, l'expérimentation chez l'animal est nécessaire. La réalisation de ce projet nécessitera l'utilisation de 24 groupes de 10 animaux afin de tester différentes doses et voies d'administration et d'effectuer l'ensemble des contrôles permettant de garantir la validité des résultats. Le nombre de groupes expérimentaux a été défini de façon à limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés. Cependant il est important, afin d'assurer la validité des conclusions de l'étude, de tester plusieurs doses (limité à 3 pour l'expérience 1 puis à 2), de comparer au moins 2 molécules différentes et d'inclure des contrôles négatifs et positifs. Les expériences 3, 4 et 5 ne seront réalisées que si les résultats de l'expérience 2 sont positifs. De même les expériences 7 et 8 ne seront réalisées que si l'expérience 6 est positive. 10 souris mâles C57Bl6 seront utilisées par groupe, soit l'effectif minimal nécessaire pour obtenir une puissance statistique suffisante pour les comparaisons de 2 (test de Student) ou plusieurs (ANOVA à un facteur) groupes. Afin d'assurer un suivi optimal du bien être animal, suite à l'implantation de cannules pour les expériences 6-8, les animaux seront surveillés jusqu'au réveil puis quotidiennement à la recherche de signes d'infection ou de douleur (hyperactivité puis isolement et indifférence par rapport au milieu extérieur, diminution du comportement exploratoire, attitude prostrée avec dos voûté, expression faciale modifiée, poil hérissé, fuite ou défense à la manipulation, vocalises). Les animaux présentant de tels symptômes sont traités (anti-inflammatoires et/ou antibiotiques) puis euthanasiés si les symptômes persistent. En ce qui concerne la procédure comportementale proprement dite, elle ne dure que 3 jours ce qui exclut la possibilité d'inconfort prolongé. Cette étude pré-clinique devrait permettre de valider le ciblage thérapeutique du système nociceptine pour la prise en charge des mémoires pathologiques associées aux troubles de l'anxiété.

1873- Contexte : Notre modèle d'étude est le canard mulard, qui est élevé pour la production de foie gras et qui est un animal hybride dont le père est un canard de Barbarie et la mère une cane commune. Nous avons déjà observé lors d'une expérience préliminaire, une variation du poids du foie gras chez les canards mulards dont les mères avaient reçu un régime alimentaire restreint en méthionine. Ce régime a induit chez les descendants mulards mâles une augmentation du poids de foie gras de 60g. Pour la filière, l'intérêt est évident s'il s'avère qu'un faible taux de méthionine dans l'aliment des canes améliore les performances de gavage des canards mulards mâles sans dégrader la qualité du foie et du magret.

Objectifs : nous souhaitons par ce programme 1/ vérifier les premières observations zootechniques de variation du poids de foie gras et vérifier la qualité des foies et des magrets 2/ faire des prélèvements de tissus afin de pouvoir, plus tard, lors d'un prochain projet de recherche, identifier les métabolismes touchés, les gènes impactés et les mécanismes moléculaires impliqués.

Notons que la confirmation d'un gain de poids du foie gras déjà observé chez les descendants mâles pourrait à terme mener à une réduction du temps de gavage en élevage.

Dispositif animal : notre programme s'appuie sur un dispositif de 312 animaux au total. Nous avons prévu un nombre conséquent de descendants, mâles et femelles, de façon à assoir solidement les analyses statistiques et les effectifs des reproducteurs ont été calculés en conséquence. Nous élevons 12 pères Barbarie et 60 canes communes dont la moitié reçoit un régime alimentaire restreint en méthionine et nous produisons 60 descendants mâles et 60 descendants femelles pour chacun des deux lots de mères, soit un total de 240 descendants. Nous observerons l'effet de la nutrition maternelle sur les caractères zootechniques des canes elles-mêmes (croissance, consommation alimentaire individuelle, caractères de reproduction,...) et de leurs descendants (croissance, consommation alimentaire par lot, état d'engraissement corporel, poids du foie gras,...). Des prélèvements sanguins au cours de la vie des animaux et des prélèvements de tissus (sur les canes et sur les descendants mis à mort à 12 semaines d'âge, ou à 14 semaine d'âge après gavage) seront réalisés afin d'étudier les paramètres sanguins des métabolismes lipidiques et glucidiques et l'état de méthylation de l'ADN dans les différents tissus.

Quatre procédures expérimentales, de classe légère de sévérité, seront mises en œuvre au cours du projet :

1-mise en cages individuelles des 60 canes reproductrices (30 soumises au régime alimentaire témoin et 30 soumises au régime alimentaire restreint en méthionine)

2-régime alimentaire restreint en méthionine pour 30 canes reproductrices

3-mesure TOBEC (conductivité électromagnétique corporelle) pour les 120 descendants mâles

4-les 60 canes et leurs 240 descendants subissent 2 prises de sang.

Une observation journalière des animaux sera réalisée tout au long de la mise en œuvre du programme afin de s'assurer du bon état de chaque animal. Pour cela, des indicateurs précis seront pris en compte : 1/ Le suivi du poids des animaux permettra de s'assurer de leur bon développement 2/ L'emplumement, l'absence de boiteries, de malformations, de saignements dus à une ou des blessures seront vérifiés quotidiennement et seront traités en conséquence. 3/ Le comportement des animaux sera régulièrement surveillé, afin de vérifier que des comportements inhabituels n'apparaissent pas au cours du protocole ou des procédures expérimentales. Si c'était le cas, un aménagement des procédures pourra être envisagé. Une observation journalière des animaux sera réalisée tout au long de la mise en œuvre du programme afin de s'assurer du bon état de chaque animal. Pour cela, des indicateurs précis seront pris en compte : 1/ Le suivi du poids des animaux permettra de s'assurer de leur bon développement 2/ L'emplumement, l'absence de boiteries, de malformations, de saignements dus à une ou des blessures seront vérifiés quotidiennement et seront traités en conséquence. 3/ Le comportement des animaux sera régulièrement surveillé, afin de vérifier que des comportements inhabituels n'apparaissent pas au cours du protocole ou des procédures expérimentales. Si c'était le cas, un aménagement des procédures pourra être envisagé.

1874- L'anti-CTLA-4 est une immunothérapie proposée dans le traitement du mélanome, du cancer de la prostate, du rein et du poumon. Toutefois, il est à l'origine de toxicités, conséquences directes de l'activation des lymphocytes T. La plus fréquente est la colite (inflammation du colon). Elle atteint 21% des malades traités et impose l'arrêt du traitement anti-cancéreux. Les données récentes de notre laboratoire suggèrent que le développement de la colite chez les malades traités par anti-CTLA-4 pourrait être associé à la réponse anti-tumorale. Ce travail devrait aider à mieux décrire et comprendre les colites induites par l'anti-CTLA-4, le lien avec l'immunité anti-tumorale et donc à mieux anticiper/contrecarrer cet effet indésirable chez l'homme tout en conservant le traitement contre la tumeur.

Cette étude consiste à traiter des souris naïves ou porteuses de tumeur par un anti-CTLA-4 pour décrire et comprendre les déséquilibres immunitaires induits dans le compartiment digestif (ganglions mésentériques ; plaques de Peyer et colon) et en périphérie (sang, rate et foie). D'après nos données récentes, l'utilisation d'autres immunothérapies (anti-ICOS et agoniste d'ICOS) en association avec l'anti-CTLA-4 pourrait avoir un effet bénéfique anti-tumoral tout en prévenant le développement de colite.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris puisque ces molécules ont déjà été testées et développées pour une utilisation chez ces animaux.

De plus, pour étudier un dérèglement du système immunitaire après un traitement systémique, l'expérimentation sur animal vivant reste indispensable puisqu'il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire ex-vivo du fait de sa complexité (remplacement).

Il s'agit d'un projet sur 3 ans. 808 souris seront nécessaires à sa mise en œuvre. Le nombre de souris et la durée du projet se justifient par la diversité des traitements, des modalités de traitement, des mécanismes immunologiques étudiés et afin de s'assurer de la reproductibilité et donc de la fiabilité statistique des résultats obtenus. Dans le cas où une procédure ne donnerait pas d'effet notable, elle ne sera pas renouvelée. De plus, beaucoup de paramètres immunologiques seront étudiées au cours d'une même procédure afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduction).

Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au minimum l'inconfort et la souffrance des animaux: hébergement en groupe et logés dans des cages appropriées de taille adaptée au nombre d'individus, respect des points limites, anesthésie et analgésie. Les méthodes à l'état de l'art (comme le prélèvement sous-mandibulaire pour la prise de sang) seront toujours utilisées (raffinement).

1875- La compréhension du comportement alimentaire chez le chat et le chien implique de connaître le comportement masticatoire de l'animal (préhension, mastication et déglutition) afin de limiter l'apparition et le développement du tartre et de la plaque dentaire. Celle-ci se forme sous l'effet de l'accumulation de bactéries à la surface des dents. En se minéralisant, la plaque dentaire se transforme en tartre, ce qui favorise le dépôt d'une nouvelle plaque dentaire.

A terme, l'accumulation de plaque dentaire et de tartre entraîne l'apparition de la gingivite puis de la maladie parodontale. Prise en charge à un stade trop avancé, elle est responsable de douleurs et peut entraîner la perte des dents. Les conséquences se répercutent donc sur le bien-être et la santé de l'animal, qui s'alimente difficilement, voire plus du tout aux stades avancés de la maladie.

Différentes stratégies nutritionnelles et technologiques sont donc développées et évaluées pour limiter l'accumulation de la plaque dentaire et du tartre. Elles permettent d'améliorer la santé dentaire du chat et du chien.

La réalisation de ces mesures impliquera un maximum de 144 chiens et 72 chats sur l'ensemble de la durée du projet.

Les chats et chiens participants à ce projet suivent des programmes spécifiques d'entraînement, d'éducation, de socialisation et d'activités quotidiennes. Ces programmes, revue par le comité bien être, permettent d'optimiser le bien-être de nos animaux.

1876- 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 physiopathogéniques et étiopathologiques sous-jacents.

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

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

Raffinement : le stress appliqué aux animaux peut être qualifié de léger, en raison de sa brièveté, comparé à ce qui est pratiqué dans d'autres laboratoires. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu.

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

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

Les animaux non stressés sont hébergés en cage collective avec enrichissement du milieu (cabanes, smarthome® et tubes). Cette expérience s'intéresse à l'aptitude d'un modulateur du récepteur au GABA-A à reverser les effets du SCI sur les fonctions exécutives. Pour cela, 3 expériences différentes seront menées sur un total de 150 souris maximum (80-150).

1877- Le glioblastome multiforme (GBM) est la tumeur primitive du cerveau la plus fréquente et la plus agressive. Elle touche environ 250.000 personnes à travers le monde par an. Les traitements comprennent de la chirurgie (exérèse), de la chimiothérapie ou bien de la radiothérapie. Pour autant, dans la majorité des cas, le pronostic des patients atteints de ces tumeurs est réservé.

Les glioblastomes sont malheureusement pris en charge trop tardivement car les techniques actuelles ne permettent pas un diagnostic précoce. Cependant, avec l'émergence de nouveaux médicaments nommés anticorps thérapeutiques (utilisés notamment pour le traitement de certains cancers), de nouvelles perspectives apparaissent aussi bien pour une détection plus précoce de ces tumeurs cérébrales que pour la thérapie.

Notre laboratoire a entrepris de produire des anticorps contre des protéines exprimées en très grande quantité à la surface des cellules cancéreuses de glioblastome. Grâce à des expériences réalisées in vitro, nous avons pu démontrer que ces anticorps ciblent de manière spécifique des lignées cellulaires tumorales.

Pour autant, les modèles cellulaires tumoraux ne reflètent pas la complexité de l'évolution de la tumeur dans un organisme vivant ; et donc ne permettent pas de valider l'accessibilité des anticorps à la cible en conditions réelles. Il est donc essentiel de comprendre le comportement de ces nouveaux anticorps dans un système « biologique intégré » dans des modèles animaux comme les rongeurs.

De plus, afin d'être encore plus performant et de permettre leur détection par des systèmes d'imagerie in vivo, ces anticorps pourront être associés soit à des molécules fluorescentes soit à des molécules magnétiques. Différents formats d'anticorps seront ainsi obtenus.

En résumé, l'objectif de cette étude in vivo, réalisée sur un modèle rongeur, sera (1) de vérifier que nos différents formats d'anticorps ont conservé leur capacité à cibler spécifiquement des cellules tumorales de glioblastome, (2) de comprendre comment ils se comportent in-vivo (biodistribution), et (3) d'identifier d'éventuels effets secondaires.

Les animaux recevront une greffe de cellules de glioblastome puis seront traités par une dose unique d'anticorps. L'imagerie in vivo permettra de suivre le devenir des anticorps dans l'organisme de l'animal et de vérifier la liaison entre les cellules tumorales et les anticorps.

Les animaux utilisés pour cette étude sont nés et ont été élevés dans des établissements agréés. Leur nombre de 200 a été réduit au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences.

Ils sont hébergés en groupe selon les règles en vigueur dans l'animalerie et les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors de leur mise en œuvre (anesthésie). Dès l'apparition de signes cliniques compromettant l'étude et pouvant induire une douleur, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en place des traitements appropriés ou décider d'une euthanasie.

L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux garantiront leur bien-être.

1878- Depuis de nombreuses années le système nerveux intrigue de par sa complexité, son fonctionnement et son rôle dans l'organisme. Il est démontré aujourd'hui que le cerveau contrôle et coordonne la plupart de nos mouvements, notre comportement ainsi que l'homéostasie des fonctions internes. L'émergence de maladies telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la schizophrénie ou la sclérose latérale amyotrophique a contribué au développement de recherches permettant une meilleure compréhension du système nerveux dans le but de développer des traitements contre ces maladies. En effet, un Français sur deux est touché directement ou indirectement par une maladie du cerveau. Du fait de l'allongement de l'espérance de vie et de la sédentarisation de nos modes de vie, ces maladies sont une des préoccupations majeures de l'avenir.

Les recherches menées sur les maladies du système nerveux central suggèrent notamment qu'une dérégulation des modifications post-traductionnelles et/ou conformationnelles des protéines conduirait à l'apparition et l'installation de certaines pathologies neurologiques. En effet, les modifications post-traductionnelles et/ou conformationnelles des protéines sont un facteur déterminant de leur propre régulation au sein du neurone, puisqu'elles régulent leur activité, leur recyclage, leur dégradation... Une altération des modifications post-traductionnelles ou conformationnelles des protéines conduit ainsi à des aberrations touchant de multiples fonctions de la cellule et mettent en danger la survie neuronale.

D'après les données bibliographiques, l'induction d'une anesthésie générale accompagnée d'une hypothermie chez la souris entraîne des modifications de certaines protéines. Ces protéines modifiées chez la souris étant similaires à celles retrouvées dans certaines pathologies neurologiques chez l'homme, cette situation pourrait modéliser expérimentalement certains processus pathologiques. Le recours à un organisme entier est nécessaire pour observer une modification de l'état de phosphorylation des protéines impliquées dans les processus pathologiques.

Dans un premier temps, l'objectif de ce projet sera de mesurer l'impact d'une anesthésie générale et d'une hypothermie chez la souris sur la modification de protéines spécifiques impliquées dans certaines maladies neurologiques. Dans un second temps, nous évaluerons l'efficacité de molécules pouvant moduler l'état de ces protéines qui aura été au préalable modifié par l'anesthésie générale et l'hypothermie.

L'utilisation de souris transgéniques dans ce protocole apportera des informations supplémentaires sur l'activation des voies de signalisation mises en jeu ainsi que sur le mode d'action des molécules testées.

Une surveillance sera réalisée par les expérimentateurs pour vérifier l'état d'endormissement des animaux durant toute la durée de l'anesthésie générale.

La température corporelle des animaux anesthésiés sera surveillée par une prise régulière de leur température pendant toute la durée de l'anesthésie générale. Ces animaux seront placés sur une couverture chauffante afin d'éviter une trop grande baisse de leur température corporelle.

On peut estimer sur toute la durée du projet, une utilisation d'environ 1200 souris par année.

1879- La ciguatera est une intoxication alimentaire consécutive à la consommation de poissons coralliens ayant accumulé dans leur chair des ciguatoxines (CTX). Le syndrome clinique est dit polymorphe associant à la fois des signes cliniques digestifs, neurologiques, cutanés, cardio-vasculaires et respiratoires d'intensité variable. Les ciguatoxines (famille des polyéthers) ont pour cible le site 5 de la sous-unité alpha du canal sodium et leur fixation entraîne une augmentation de la perméabilité et de l'excitabilité membranaire, expliquant notamment les effets neurologiques qu'elles provoquent.

Le règlement 854/2004/CE précise que les contrôles doivent être effectués pour veiller à ce que [...] les produits de la pêche contenant des biotoxines, telles que les ciguatoxines ou d'autres toxines dangereuses pour la santé humaine, ne soient pas mis sur le marché. Toutefois, il n'existe pas de seuil réglementaire pour les ciguatoxines au niveau européen. L'European Food Safety Authority a rendu en 2010 un avis et n'a pas pu proposer de seuil de salubrité en raison du manque de données disponibles, aussi bien études toxicologiques chez l'animal que données épidémiologiques chez l'Homme.

La France est l'un des pays européens les plus touchés par la problématique de la ciguatera de part la présence de cas d'intoxications régulièrement rapportées dans certains DROM (Réunion, Guadeloupe notamment).

La seule méthode de référence pour la recherche de CTX dans les poissons est le bioessai sur souris. Cela consiste en l'injection intra-péritonéale d'un extrait de tissu à 2 souris OF1 de 20g ( $\pm 2$ g). L'évaluation de la toxicité de l'échantillon est basée sur le délai de survie des souris. La mort de 1 ou 2 souris dans les 24h est interprétée comme un résultat positif pour la présence de ciguatoxines (non comestible). La présence de symptômes typiques et/ou la perte de poids dans les 24h après injection permettent également de déclarer l'échantillon douteux. Les symptômes typiques sont : diarrhée, piloérection, troubles respiratoires, dyspnée et cyanose. Pour certains poissons comme les requins, la nature inconnue des toxines, nécessite l'injection des extraits à 3 souris par échantillon.

Le nombre de souris nécessaire est estimé à 1 970 pour 5 ans. Chaque année, nous analysons en moyenne 50 échantillons nécessitant 2 souris et 90 échantillons nécessitant 3 souris, ce qui correspond à 1 850 souris testées sur 5 ans. De plus, sont réalisés des contrôles internes (solution d'injection, blanc solvant, échantillons références positif et négatif), réalisés deux à trois fois par an, et intégrés aux lots de souris conformes pour le bioessai. Le nombre de souris nécessaire pour ces contrôles internes est estimé entre 16 et 24 souris par an (soit 120 au maximum sur 5 ans).

Cernant les conditions d'hébergement, les cages avec de la litière propre, enrichies avec un igloo, sont placées dans un environnement calme avec un maximum de 10 souris par cage. L'eau et la nourriture sont données ad libitum. D'autre part, une réflexion est actuellement faite pour remplacer ce test in vivo par un test in vitro (cytotoxicité sur Neuroblastome). Ils ne seront remplacés qu'après validation des tests alternatifs par l'European Food Safety Authority.

1880- Le syndrome d'apnées du sommeil (SAS) est le trouble respiratoire nocturne le plus fréquent dans la population et est un facteur de risque indépendant de la survenue d'événements cardiovasculaires fatals et non fatals. Le SAS a été récemment associé à l'apparition de neuropathies optiques, notamment la neuropathie optique ischémique antérieure aiguë (NOIAA), et l'occlusion veineuse rétinienne. Les modifications vasculaires liées au SAS (hypertension artérielle, artériosclérose, dysfonction autonome et endothéliale) n'ont pas été étudiées sur le plan de la microvascularisation oculaire chez l'homme ou l'animal.

Le traitement de référence actuel du SAOS n'empêche pas l'apparition de ces atteintes oculaires. Il apparaît essentiel de comprendre les mécanismes à l'origine de ces pathologies dans le but de proposer des alternatives thérapeutiques à ce traitement.

Ainsi, l'objectif du projet est d'identifier et caractériser les atteintes vasculaires de la rétine et du nerf optique chez le rat soumis à l'hypoxie chronique intermittente (HI), modèle animal de SAS.

Chez le rat soumis à l'HI, les atteintes tissulaires (rétine, nerf optique et artère ophtalmique) sont abordées par l'étude du système de l'endothéline 1 et du stress oxydatif (qPCR et immunomarquage). L'atteinte structurale du nerf optique et de l'artère ophtalmique est évaluée à l'aide d'une approche histologique en microscopie optique et électronique. L'étude fonctionnelle de l'artère ophtalmique est réalisée in vitro par myographie.

Nous avons choisi de travailler avec des rats Wistars (n = 190) exposés à la normoxie ou à l'HI pour plusieurs raisons. L'utilisation d'un modèle de rat HI est encouragé par nos travaux précédents dans lesquels nous avons reproduit les conséquences délétères du SAS et aussi parce que le travail sur les organes visuels (rétine, nerf optique et artère ophtalmique) nécessite d'obtenir une quantité suffisante de matériel biologique exploitable en biologie moléculaire. L'utilisation du rat permet de diminuer le nombre d'animaux utilisés par rapport à un modèle murin pour obtenir cette quantité de matériel biologique. De plus, le diamètre de l'artère ophtalmique du rat est dans les limites inférieures des vaisseaux pouvant être étudiés avec la technique de myographie artérielle.

Etant donné la complexité de l'organe visuel, nous ne pouvons pas envisager l'utilisation de lignées cellulaires pour répondre à la problématique du projet.

Tous les échantillons seront conservés de façon optimale dans le but de pérenniser notre matériel de travail.

Les animaux seront hébergés par groupe dans une animalerie adaptée et autorisée, avec enrichissement du milieu de vie et accès à l'eau et à la nourriture à volonté. Un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé. Le protocole mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, stress ou souffrance en dehors du stress bref et modéré lié aux premiers jours d'HI. Les sessions de mesure de la pression artérielle seront réalisées sous anesthésie générale fixe, les injections seront réalisées selon les bonnes pratiques vétérinaires. Les animaux seront placés sur un lit thermostaté, la fréquence respiratoire et cardiaque sera enregistrée en continu afin de contrôler le degré d'anesthésie et de l'ajuster si nécessaire.

1881- Touchant près de 10 millions de personnes en France, l'arthrose est une pathologie très répandue pour laquelle aucun traitement efficace n'existe.

L'utilisation de cellules souches dérivées du tissu adipeux, couplées à des bio-polymères, s'est avérée très prometteuse pour traiter cette pathologie.

Ce projet a pour objectif le développement d'un dispositif médical permettant le traitement de l'arthrose à partir de ces cellules.

A moyen terme, ce travail et l'expérience acquise chez l'animal permettront de monter une étude clinique chez l'homme.

Afin d'optimiser et de valider un tel procédé thérapeutique, nous utiliserons un modèle animal de lésion arthrosique que nous avons déjà validé (projet 01902.02) : modèle d'arthrose du genou chez le rat, obtenu après section chirurgicale du ligament croisé antérieur.

Une fois la lésion induite, différentes combinaisons cellules/polymères seront testées (injections intra-articulaires ; 9 conditions testées) et nous observerons l'évolution de la pathologie, d'une part en imagerie du petit animal (tomographie  $\mu$ CT), d'autre part en analyse histologique post-mortem (analyse plus fine permettant de vérifier la qualité des tissus articulaires). Aucun substitut in vitro ne peut reproduire la physiologie ostéo-articulaire et ne peut donc remplacer ces tests.

Parmi les 9 conditions de traitement : les cellules seront d'une part injectées seules (1 condition), d'autre part, 3 polymères préalablement sélectionnés lors de notre précédente étude pilote seront testés, en combinaison ou non avec des cellules (soit 6 conditions), un contrôle négatif d'injection de sérum physiologique sera également réalisé (1 condition) ainsi qu'un contrôle lésé non injecté (1 condition).

Pour valider les traitements potentiels, la procédure prévoit l'utilisation d'un maximum de 342 rats (Wistar Han). Les cellules seront issues de tissu adipeux de 3 patients et 6 pattes par patient par condition seront utilisées.

Ce chiffre est le minimum pour permettre une approche statistique fiable et finaliser cette étude préclinique.

La moitié des rats servira à tester les traitements préventifs (injection précoce afin de prévenir l'apparition de l'arthrose), et l'autre moitié servira à tester les traitements curatifs (injection à un stade avancé de lésion, dans le but de guérir cette pathologie).

Au préalable, afin de vérifier l'éventuel effet potentialisateur de l'immunosuppression sur ces traitements, un premier lot de 18 rats sera immunodéprimé au moyen de cyclosporine et injecté avec les cellules seules (3 patients) ou du sérum physiologique. S'il n'y a aucun bienfait de l'immunosuppression, le nombre de rats sera réduit de moitié.

Pour le respect du Raffinement, l'ensemble des chirurgies sera pratiqué sur animaux anesthésiés et la douleur postopératoire sera soulagée par l'injection sous-cutanée d'analgésique (buprénorphine), juste avant le réveil puis pendant 2 jours, en fonction des observations lors du suivi quotidien. Ce suivi permettra de vérifier l'état de santé général et objectiver tout signe

de douleur (donc adapter l'analgésie). De plus, les animaux seront hébergés dans un environnement calme, en accord avec la réglementation, et le change sera réalisé 2 fois par semaine pour maintenir un état de propreté optimal des cages et éviter les infections inopinées. L'accès à l'eau et à la nourriture sera facilité si les animaux présentent un handicap.

1882- Lors de leur administration par voie orale, de nombreux médicaments ont une biodisponibilité faible, c'est-à-dire que seule une faible quantité passe dans le sang et peut agir sur sa cible. En effet, l'intestin peut agir comme une barrière dans leur absorption, puis le foie peut en métaboliser une partie significative lors de leur premier passage ou « first-pass » hépatique.

La technique décrite ici consiste en la pose de cathéters simultanément dans la veine porte (sang portal) et l'artère carotide chez le rat, et permet le prélèvement de petits volumes de sang tout au long de l'expérience, dans lesquels pourront être dosées les molécules d'intérêt. Ainsi, dans le cas de la faible biodisponibilité d'un composé, la part relevant de l'intestin (absorption faible et donc concentration faible mais identique du composé dans le sang portal par rapport au sang systémique) de celle relevant du foie (métabolisme fort et donc concentration plus forte du composé dans le sang portal par rapport au sang systémique) pourront être discriminées dans la biodisponibilité d'un composé.

Ceci est particulièrement intéressant à connaître dans le développement d'un nouveau composé dont l'activité in vitro aura été prouvée au préalable, afin d'optimiser sa structure chimique et/ou sa formulation et ainsi améliorer sa faible biodisponibilité in vivo.

Cette technique a plusieurs avantages. Scientifiquement, elle permet d'avoir des profils individuels complets pour limiter la variabilité interindividuelle, et sa réalisation in vivo permet de prendre en compte toute la complexité de l'organisme entier dans l'ensemble des phénomènes régissant la biodisponibilité d'un composé, ce qu'une étude sur modèles in vitro (culture cellulaire par exemple) ne pourra pas faire. Et éthiquement, les prélèvements au cathéter sur l'animal vigile limitent le stress causé par l'anesthésie et les manipulations répétées des animaux. De plus, l'obtention de profils individuels complets permet de limiter le nombre d'animaux nécessaires afin d'avoir des résultats statistiquement fiables. Enfin, seuls les composés d'intérêt sélectionnés après des tests acellulaires et cellulaires et répondants à des critères prédéfinis seront testés chez le rongeur. Tout cela en fait une technique entrant parfaitement dans le cadre de la règle des 3R.

La cathétérisation est réalisée chez le rat car cette espèce possède un volume sanguin total autorisant les prélèvements multiples suffisants, et lors d'une étude, 4 à 6 animaux sont utilisés par dose et par composé, afin de prendre en compte la variabilité interindividuelle et pouvoir interpréter les résultats.

Des mesures sont prises pour prévenir la douleur lors du réveil (administration préopératoire d'analgésique) et pour limiter les contraintes lors de l'opération (anesthésie gazeuse pendant toute la durée de l'opération, planche chirurgicale chauffante pour limiter l'hypothermie lors de la chirurgie, gel ophtalmique placé sur chaque œil pour éviter le dessèchement de ceux-ci pendant l'opération).

Environ 200 animaux seront utilisés sur 5 ans.

1883- Les zoonoses, maladies partagées entre l'homme et l'animal, occupent la première place parmi les maladies infectieuses émergentes dans pratiquement toutes les régions du monde. Il existe plus de 550 arbovirus identifiés. Les arboviroses sont des maladies à transmission vectorielle très négligées au Mozambique alors que le caractère tropical du pays favorise la pullulation de vecteurs en particulier des moustiques. Très peu d'informations sont disponibles sur les arbovirus qui circulent et les vecteurs qui les transmettent, même si la dengue, le Chikungunya et la fièvre de la vallée du Rift ont été rapportés ou suspectés. L'impact de ces agents pathogènes est inconnu, ce qui fait obstacle à l'adaptation de la politique de santé aux besoins réels de la population. L'absence de système de surveillance et d'investigation des syndromes aigus fébriles au Mozambique tend à surestimer la place du paludisme et à sous estimer le rôle de toutes les autres maladies infectieuses, entraînant une prescription excessive de drogues antipaludiques et d'antibiotiques avec le risque que cette pratique induise l'émergence de résistance.

On a pu comptabiliser jusqu'à plus de 300 maladies infectieuses émergentes apparues depuis les années 40, la plupart d'entre elles étant causées par des virus. Plus de 60% sont d'origine animale et la plupart (72%) sont issues de la faune sauvage, comme les virus Ebola, Hendra, Nipah, West Nile, Fièvre jaune, Dengue, Rift Valley, etc. Dans ce contexte, les micro-mammifères et les chauves souris se sont révélés dans les écosystèmes les plus divers comme réservoirs majeurs à virus.

L'investigation des pathogènes viraux et bactériens associés à la faune sauvage et à ses ectoparasites est une composante incontournable à l'établissement d'un état des lieux et à l'évaluation des risques de transgression de la barrière d'espèce (passage de l'agent pathogène d'une espèce à une autre), phénomène qui conditionne l'émergence épidémique, notamment chez l'homme.

Ce projet se propose de réaliser l'inventaire des pathogènes à risque de transmission pour l'homme hébergés par les petits mammifères terrestres et les chauves-souris du Mozambique, considérant que l'Afrique de l'Est est reconnue comme un hot spot d'émergence de pathogènes zoonotiques.

Les agents infectieux présents dans 8 espèces de petits mammifères introduits et indigènes et 10 espèces de chauves-souris seront investigués, à raison de 40 individus par espèce (nombre d'individus minimum pour obtenir des résultats satisfaisant en terme épidémiologique). Ces espèces ont été choisies en fonction de leur répartition géographique et de leur capacité à vivre en étroite relation avec les populations humaines. Ainsi cette étude sera réalisée sur 320 petits mammifères terrestres et 400 chauves-souris.

1884- Les acouphènes subjectifs (les sensations de bruit pas liées à une source externe) sont souvent la conséquence d'une perte temporaire ou permanente de la fonction auditive (surdité). Ils causent des nombreuses gênes sévères avec un impact

sur la qualité de vie des patients comme les perturbations de la fonction auditive, les déficits de sommeil, l'anxiété, la dépression et peuvent conduire jusqu'à tentative de suicide.

Actuellement, aucun traitement ciblé et efficace n'est disponible pour les patients souffrant de telles pathologies. Nous travaillons à l'identification et au développement de traitements ciblés pour satisfaire ce besoin médical en santé publique. Ce projet répond aux demandes des autorités réglementaires liées au développement d'un composé déjà identifié mais aussi de futurs composés ayant une efficacité plus élevée et moins d'effets secondaires. Après avoir été testés dans des études in vitro, il est nécessaire que ces composés démontrent efficacité et sécurité in vivo chez l'animal avant passage chez l'homme. La capacité des candidats-médicaments à atteindre les cibles dans l'oreille interne et/ou le système nerveux central pour traiter les acouphènes ne peut être évaluée que chez l'animal avec un système auditif et un système nerveux central complet, capable de reproduire le fonctionnement et les symptômes observés chez le patient. De plus, pour soutenir le développement d'un candidat-médicament, il est nécessaire de bien établir la relation entre les doses efficaces et l'exposition au produit.

C'est pourquoi ce projet inclut 4 procédures : Les trois premières permettent de tester l'efficacité des candidats-médicaments sur les modèles pathologiques chez le rat, la dernière permet d'étudier la pharmacocinétique des candidats-médicaments chez le rat également. Il couvre l'utilisation d'au maximum 8088 rats sur 2 ans. Les études réalisées au sein du centre de recherche, par du personnel formé et compétent, sont encadrées par des recommandations internes, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (éthique, hébergement, soins, manipulation, expérimentations), et ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal (utilisation d'anesthésiques et d'antalgiques). Une analyse statistique en continue optimise les méthodes expérimentales employées, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés au strict nécessaire. Tous ces éléments assurent l'application maximale du principe des 3R.

1885- La glyco-génose de type 1a (GSD1a) est une maladie génétique rare du métabolisme du glucose. Les patients atteints de GSD1a sont incapables de produire du glucose en dehors des repas et souffrent d'hypoglycémies sévères. Avec le temps, ils développent une maladie chronique du rein qui progresse lentement, mais irréversiblement, vers une insuffisance rénale. A terme, cette pathologie nécessite une dialyse ou une greffe du rein. Malgré une prise en charge nutritionnelle stricte pour éviter les hypoglycémies, la pathologie rénale apparaît dès l'adolescence.

Afin de déterminer des cibles thérapeutiques et d'adapter les recommandations nutritionnelles pour traiter les patients atteints de GSD1a, il est essentiel de caractériser les différentes étapes de développement de cette pathologie. Pour cela, nous disposons de souris transgéniques atteintes de GSD1a spécifiquement au niveau du rein. Ces souris sont capables de réguler leur glycémie et développent au cours du temps toutes les caractéristiques de la maladie rénale des GSD1a (taille des reins augmentée, microalbuminurie, et à long terme une insuffisance rénale).

Dans cette étude, nous proposons d'étudier le développement de la maladie à 6, 9, 12, 15 et 18 mois dans nos modèles de souris afin de caractériser les voies moléculaires impliquées. Nous étudierons aussi l'effet de l'alimentation sur la progression de la pathologie pour adapter le régime des patients et proposer de nouvelles recommandations nutritionnelles. Il est important d'étudier l'effet de la consommation de graisses, de saccharose, de fructose, de galactose qui sont susceptibles d'aggraver le stockage du glycogène (réserve de sucre) ou de graisses dans les reins.

L'évolution de la pathologie sera suivie par mesure de différents paramètres plasmatiques (déchet azoté, albumine...) et urinaires (albumine, acide urique...). La maladie rénale peut aussi s'accompagner d'une élévation de la pression artérielle qui sera mesurée chez la souris par une méthode non invasive.

Les animaux seront élevés par groupe de 5 souris dans un environnement enrichi pour favoriser la nidation, avec accès libre à la nourriture et à l'eau de boisson. Les souris seront suivies quotidiennement. Une courbe de prise de poids sera réalisée au minimum tous les mois ou plus fréquemment si nécessaire. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les mesures seront réalisées tous les 3 mois. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole à 9, 12, 15 et 18 mois selon les procédures autorisées par la législation afin de prélever les reins.

Le nombre total d'animaux a été calculé au plus juste à partir de nos connaissances sur l'évolution de la pathologie dans ce modèle animal et sera limité à 255 souris sur une période de 4 ans.

1886- L'importance de la rythmicité circadienne dans la santé humaine et le bien-être est de mieux en mieux caractérisée. Les perturbations des fonctions circadiennes sont connues pour entraîner des troubles métaboliques (obésité, diabète) et cardiovasculaires (athérosclérose), et même certains cancers (par ex., cancer du sein chez les femmes en travail posté, et cancer de la prostate chez les hommes en travail posté).

Ce projet de recherche vise à comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-tendant les effets synchroniseurs des facteurs nutritionnels sur les horloges cérébrales suivantes :

- l'horloge circadienne principale, localisée dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus, mise à l'heure par la lumière et sensible à des facteurs métaboliques qui restent à identifier.
- l'horloge cérébrale secondaire située dans le cervelet, impliquée dans le comportement d'anticipation des repas, probablement via des signaux nutritionnels tels que métabolites ou hormones.
- les horloges secondaires de l'hypothalamus métabolique contrôlant le rythme journalier de prise alimentaire.

La régulation du cycle journalier de prise alimentaire impliquant plusieurs organes à la fois (notamment, cerveau, foie, pancréas, surrénales, muscles), l'investigation des interactions entre horloges cérébrales et nutrition nécessite l'utilisation de modèles animaux, en parallèle à des études ciblant un organe, ou une partie d'organe, menées in vitro.



Le nombre d'animaux proposé (n=6 par point-horaire pour 4 temps par 24h) est basé sur une évaluation de la puissance statistique qui prend en compte les moyennes et la dispersion des données comportementales recueillies dans des études antérieures (le test généralement utilisé sera une ANOVA à deux facteurs Temps x Traitement).

Pour valider la rythmicité circadienne d'une variable biologique donnée, nous utilisons en routine une régression non-linéaire sinusoidale (cosinor) qui permet non seulement de détecter l'effet du temps (comme on pourrait l'obtenir avec une ANOVA à un facteur), mais aussi de caractériser trois paramètres de la rythmicité (niveau moyen, amplitude et acrophase = maximum). Dans toute la mesure du possible, nous privilégions le suivi longitudinal des animaux, qui permet de limiter le nombre d'individus utilisés.

Les injections intra-cérébrales (intra-cérébro-ventriculaires = icv et intra-cérébelleuses = icb) seront systématiquement effectuées sous anesthésie gazeuse pour prévenir la douleur liée à l'injection.

Dans tous les protocoles impliquant une injection intra-cérébrale, nous proposons une répétition du traitement chez le même animal (en premier, pour l'approche comportementale, en second, pour l'étude des protéines dans l'horloge principale) afin de diviser par un facteur 2 le nombre d'animaux utilisés.

Les souris seront systématiquement stabulées en cages individuelles pour enregistrer les variables individuelles. Cependant, les cages seront ouvertes, de sorte que les animaux garderont des contacts olfactifs et auditifs avec leurs congénères maintenus dans la même pièce. En outre, la roue d'activité disponible en permanence dans la cage constitue un environnement enrichi pour la souris.

Ce projet impliquera un total de 1440 souris (Procédure n°1, n = 48 ; Procédure n°2, n = 576 ; Procédure n°3, n = 480 ; Procédure n°4, n = 96 ; Procédure n°5, n = 240 ).

1887- La formation initiale et continue des vétérinaires et la formation des soigneurs, des techniciens et des concepteurs qui utilisent des animaux à des fins scientifiques nécessite l'apprentissage de gestes techniques chez l'animal. Après avoir appris les bases par des méthodes alternatives comme les vidéos et les mannequins, les stagiaires ont besoin de pratiquer ces gestes chez un animal vivant pour acquérir un geste efficace sans stress ni pour l'animal, ni pour l'opérateur.

Nos programmes d'enseignement sont adaptés aux différents publics (étudiants, personnel ou vétérinaires en formation continue) : les espèces rongeurs, lapins et carnivores, porcs, ou volailles sont utilisées selon leur besoin de formation.

Les enseignements prévus par ce projet portent sur les procédures non ou faiblement invasives, telles que l'administration de substances, les prélèvements sanguins ou l'échographie. Les techniques enseignées respectent l'état de l'art, et en particulier les recommandations publiées par les associations professionnelles. Les enseignements sont réalisés avec un ratio enseignant/stagiaire élevé pour s'assurer que chaque geste est bien réalisé. Les animaux sont habitués à leur environnement et au personnel par une période d'acclimatation, et ils sont maintenus sous anesthésie pour chaque geste qui pourrait causer un stress.

Le nombre des animaux est réduit au minimum en adaptant aux objectifs de chaque formation. En formation seul un animal est nécessaire pour un public de 20 à 25 personnes. Pour des formation plus techniques nous prévoyons de 1 à 4 stagiaires par animal, tout en évitant une sur-utilisation grâce à une fiche de suivi des animaux et un examen clinique avant et après chaque séance. Au total sur 5 ans, tous programmes de formation confondus, nous estimons que nous utiliserons 1000 souris, 500 Rats, 100 Lapins, 20 chiens, 100 Gerbilles, 10 Furets, 25 Porcs et 500 Poules.

1888- La dépression est une maladie mentale qui affecte 11% de la population européenne et dont les traitements sont peu efficaces puisque 40% des individus ayant connu un épisode dépressif développeront un autre épisode dans leur vie. Les causes de la dépression ne sont pas encore bien identifiées. On sait que stress et anxiété favorisent l'apparition de la maladie. Il est impératif de comprendre ce qui, au niveau des cellules du cerveau, est dérégulé pour élaborer des stratégies thérapeutiques adaptées et efficaces pour lutter contre de la dépression. Notre laboratoire travaille sur une protéine qui pourrait être une piste intéressante pour la compréhension et le traitement de la dépression, notamment via son rôle possible dans la production de neurones au niveau d'une structure cérébrale régulatrice de l'état anxieux et dépressif : l'hippocampe. La protéine d'intérêt est modifiée par le stress chez la souris et cette modification pourrait conférer une résistance à la dépression voire potentialiser les effets de l'antidépresseur fluoxétine. Enfin, un des grands défis du traitement de la dépression est tout d'abord le diagnostic de la maladie. Nous envisageons que la modification de la protéine dans les cellules du sang peut servir de marqueur précoce de la dépression et présager de la réponse au traitement antidépresseur. C'est pour répondre à ces questions que nous proposons le présent projet.

Pour cela, nous utilisons des souris, modèle animal de choix compte tenu de la similarité de son organisation neuro-anatomique avec celle de l'Homme. Les souris utilisées dans ce projet et présentant les modifications de la protéine d'intérêt, sont issues de la transgénèse classique. L'utilisation de souris est indispensable pour étudier les effets des modifications de la protéine d'intérêt dans un organisme intégré. Nous utilisons des souris mâles car les hormones femelles interfèrent avec le comportement anxio-dépressif, les femelles étant plus résistantes à l'induction de la dépression par traitement chronique à la corticostérone.

Application de la règle des 3Rs :

Remplacement : afin de limiter au maximum l'utilisation d'animaux, des études in vitro seront effectuées en premier lieu sur des lignées cellulaires HEK239 et Neuro2A. Les cultures primaires de cellules souches à partir d'animaux seront réalisées comme preuve de concept. Par ailleurs, en plus des cultures souches, nous cultiverons, à partir des mêmes cerveaux, les cellules souches de la zone sous-ventriculaire pour les besoins d'un autre projet de recherche.

Réduction : le prélèvement de sang submandibulaire permet une étude dans la durée sur le même animal, et ne nécessite pas le sacrifice comme dans le cas du prélèvement intracardiaque. De plus, les animaux seront utilisés en culture cellulaire.

Raffinement : les injections sous-cutanées et intrapéritonéales de BrdU, de dexaméthasone et d'anesthésiant sont réalisées avec des aiguilles très fines (30 G) pour minimiser la douleur. Les conditions d'hébergement standards sont en accord avec le comité de bien-être des animaux de l'Institut, avec par exemple, des éléments de raffinement (coton, bout de bois) ajoutés dans les cages afin de limiter le stress des animaux. Les souris sont hébergées 6 par cage afin de ne pas induire de stress supplémentaire dû à l'isolement. L'administration de corticostérone et de fluoxétine dans l'eau de boisson est indolore. Les souris sont stressées de par le traitement à la corticostérone. Nous essayons de compenser en manipulant les animaux avec douceur et rapidité, dans un environnement calme et silencieux. Les souris sont régulièrement observées et mises à mort dans le cas d'une perte de poids supérieure à 20%, une altération très grave du pelage avec ulcération et risque d'infection de la peau, ou un comportement de prostration dans la cage, qui sont des effets secondaires du traitement avec la corticostérone. Lorsqu'un individu devient agressif (effet secondaire dû à la corticostérone), il est retiré de la cage et sacrifié.

5 procédures expérimentales seront utilisées dans ce projet

- 1) Induction de la dépression par administration de corticostérone et/ou de fluoxétine dans l'eau de boisson
- 2) Prélèvement du sang dans la veine sous-mandibulaire
- 3) Evaluation du volume de l'hippocampe par IRM
- 4) Injections sous-cutanées de BrdU pour marquer les cellules souches en prolifération
- 5) Perfusion intracardiaque pour fixation du cerveau et analyses histologiques

Le nombre total d'animaux prévu est de 425 pour l'ensemble des études.

1889- Le présent projet concerne l'évaluation d'un produit immunologique destiné à stimuler le système immunitaire des animaux d'élevage.

Il n'existe pas pour le moment de méthode in vitro, agréée par les autorités, d'évaluation de l'efficacité du produit immunostimulant concerné par la présente demande ; aussi l'efficacité de ce produit est-elle évaluée par un essai avec épreuve virulente chez la souris, qui n'est pas une des espèces de destination du produit.

Une première procédure concerne la validation de la souche d'épreuve utilisée dans la procédure suivante.

Une seconde procédure, répétitive, est décrite dans le présent projet : essai d'activité sur souris dans le cadre strict du contrôle qualité de chaque lot de fabrication de l'immunostimulant ou dans le cadre de Recherche et Développement de nouvelles générations de ce même produit.

Ce projet est conçu en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

- lorsque cela est possible, l'utilisation d'animaux témoins communs au test d'activité de plusieurs lots, de manière à réduire le nombre global d'animaux utilisés,
- la définition de points limites adaptés permettant la réduction de la souffrance chez les animaux.
- l'enrichissement apporté dans les cages des animaux.

Le nombre d'animaux envisagé sera au maximum de 5800.

1890- Le présent projet concerne l'évaluation de l'efficacité d'un produit immunologique destiné à la prévention d'une pathologie respiratoire chez un carnivore domestique.

Il n'existe pas pour le moment de méthode in vitro, validée par les autorités, d'évaluation de l'efficacité du produit par la présente demande ; aussi l'efficacité de ce produit est-elle évaluée par un essai avec épreuve virulente chez la souris.

Une première procédure concerne la validation de la souche d'épreuve utilisée dans les procédures suivantes.

Quatre procédures répétitives sont décrites dans le présent projet : essai d'activité sur souris dans le cadre strict du contrôle qualité de chaque lot de fabrication, d'une part, et essais dans le cadre de Recherche et Développement destinée à l'amélioration de ce même produit.

Ce projet est conçu en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

- Lorsque cela est possible, l'utilisation d'animaux témoins communs au test d'activité de plusieurs lots, de manière à réduire le nombre global d'animaux utilisés,
- la définition de points limites adaptés permettant la réduction de la souffrance chez les animaux
- et pour l'une des procédures, le remplacement d'un essai léthal par un essai non léthal de sévérité légère destiné à être utilisé en contrôle de routine.
- l'enrichissement apporté dans les cages des animaux.

Le nombre d'animaux envisagé sera de 5000 rongeurs pour l'ensemble du projet.

1891- Nous nous intéressons à deux protéines de la même famille, la BSP et l'OPN, et à leurs rôles dans la biologie de l'os. Nous avons généré des souris qui n'expriment aucune de ces deux protéines (souris "double KO"). Nous utiliserons des souris sauvages, des souris simple KO pour BSP ou simple KO pour OPN, ainsi que des double KO, dans lesquelles nous aspirerons la moelle osseuse du fémur. Les étapes de la régénération de la moelle seront ensuite étudiées par diverses techniques d'imagerie quantitative et de cytométrie. Le but de ce projet est d'analyser la complémentarité de fonction entre BSP et OPN dans la formation et le modelage de l'os, la régénération des vaisseaux et des cellules du sang.

Ce travail ne peut être réalisé que sur des organismes complets génétiquement modifiés, donc sur des souris. On utilisera au plus 300 souris sur 2 ans, avec des groupes expérimentaux de 6 souris, conserées entre 3 et 12 jours après l'opération,

minimum d'effectif et de temps nécessaire pour mettre en évidence les effets recherchés. Toutes les procédures d'analgésie et de suivi post-opératoire seront appliquées pour minimiser la souffrance et l'inconfort des animaux.

1892- Les oxazaphosphorines, tels que l'ifosfamide (IFO) ou le cyclophosphamide (CPM), sont des composés antitumoraux faisant partis de la classe des alkylants de l'ADN. Ces prodrogues nécessitent une activation enzymatique, qui a lieu principalement dans le foie. L'IFO étant transformé avec une faible hydroxylation, des « protocoles hautes doses » ont donc été développés et ont conduit à la mise en évidence de toxicités rénales et neurologiques.

Pour supprimer ces effets toxiques limitant l'utilisation clinique de l'IFO, des composés pré-activés de l'ifosfamide, pouvant former de nanoparticules, ont été développés. La vectorisation de ces molécules permettrait de diminuer les doses administrées (de 5 à 10 fois) en utilisation pré- et clinique en augmentant par ciblage leur activité ou en modifiant leur biodistribution.

Récemment, des études in vitro de cytotoxicité de ces composés pré-activés ont été réalisées sur différentes lignées tumorales. Des résultats très intéressants ont été montrés sur certaines lignées cellulaires humaines de rhabdomyosarcome et de sarcome d'Ewing. Les IC50 retrouvés pour ces produits en l'absence de matériel enzymatique ont montré une activité semblable à celle de l'ifosfamide métabolisé. Suite à ces résultats, une première étude préliminaire de l'efficacité in vivo de certain de ces composés a été menée et a montrée des résultats encourageants.

Notre objectif est donc d'étudier ce panel de composés développés par notre équipe au niveau de l'efficacité pharmacologique et de la pharmacocinétique.

Ces deux protocoles sont le minimum indispensable permettant d'étudier et de conclure sur un bénéfice de ces composés en comparaison avec l'IFO : composé de référence. Ce projet qui met en œuvre l'analyse de prodrogue nécessitant une bio-activation hépatique nécessite donc l'utilisation de modèles animaux, afin de mimer au maximum le métabolisme de l'homme et valider le concept d'augmentation de l'index thérapeutique et la diminution de toxicité de ces composés.

Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux est indispensable car l'étude de l'efficacité et du métabolisme ne peut se faire que sur des animaux vivants, mimant au mieux le métabolisme de l'homme.

Le nombre de souris nécessaire à cette étude a été déterminé afin de réduire au maximum le nombre d'animaux au sein de chacune des procédures expérimentales et permettant l'obtention de résultats exploitables. Du fait de l'utilisation de DMSO lors de l'injection et afin de minimiser au maximum la souffrance des animaux, l'injection s'effectuera après administration d'un antidouleur. De plus, une observation, une pesée et une mesure des tumeurs seront menés trois fois par semaines afin de prévoir et de diagnostiquer au plus tôt les points limites et les critères d'interruptions. Ainsi le nombre total de souris utilisées dans ce projet a été évalué à 990 souris.

1893- Le protocole vise à reproduire chez la souris l'apparition de cancers de la peau causés chez l'homme par l'exposition régulière au soleil (rayonnements UV-B). Les souris, appartenant à une souche dépourvue de poils, sont exposées vingt minutes par jour et pendant plusieurs semaines à un rayonnement UV-B dont l'intensité est mesurée et contrôlée. L'apparition des lésions cutanées, suivie par un examen clinique quotidien conditionne la durée et l'intensité de l'exposition aux UV-B de façon à obtenir le type et le degré de sévérité du modèle visé.

Une fois la pathologie en place, les animaux sont traités avec différents candidats médicaments dans le but d'évaluer leur efficacité et leur innocuité. L'évaluation sur l'animal s'avère être une démarche indispensable pour disposer de l'environnement biologique complet d'un être vivant. Néanmoins, toutes les molécules évaluées font l'objet au préalable de tests préliminaires d'activité in vitro pour ne retenir que les plus prometteuses dans le modèle in vivo décrit ici et réduire ainsi le nombre total d'animaux utilisés dans un programme de recherche. L'inclusion décalée d'animaux porteurs de lésions dont l'apparition est hétérogène dans le temps permet également de réduire l'effectif total de même que la recherche préalable des doses maximales tolérées chez la souris. Enfin, le choix d'une exposition aux UV-B quotidienne et de courte durée garantit l'absence de lésions inflammatoires cutanées du type « coup de soleil » et contribue au raffinement du modèle. Un effectif maximum de 900 souris sur 5 ans (180 par an) est nécessaire pour la conduite de ce programme.

1894- Dans l'Union Européenne et aux Etats-Unis, les maladies cardiovasculaires sont responsables de 40 % de la mortalité totale. Les maladies cardiovasculaires regroupent différentes pathologies telles que la maladie coronaire, les accidents vasculaires cérébraux, et l'insuffisance cardiaque. De nombreux mécanismes ont été identifiés et parmi eux, l'inflammation joue un rôle clé dans divers maladies cardiovasculaires. Les processus inflammatoires peuvent se produire dans un endroit différent du cœur, telles que les valves (endocardite), le péricarde (péricardite), et les artères coronaires (plaques d'athérome vulnérables). L'inflammation du myocarde se produit également dans divers pathologies telles que la myocardite infectieuse, et est un potentiel biomarqueur du remodelage cardiaque et de l'insuffisance cardiaque.

Le laboratoire porteur du présent projet a récemment mis au point une molécule radiomarquée, ou radiotracer. Ce radiotracer est spécifique d'une molécule impliquée dans les phénomènes inflammatoires. Suite à son administration par voie intraveineuse, des caméras dédiées (gamma-caméras) permettent de visualiser et de quantifier la distribution de ce radiotracer dans l'organisme. Sur un modèle murin d'athérosclérose, ce radiotracer a ainsi permis de visualiser, de manière non-invasive, le développement de plaques d'athérome aortiques.

L'hypertension est connue pour induire une hypertrophie et une fibrose cardiaque qui sont des facteurs de risque de l'insuffisance cardiaque. Le facteur mécanique joue un rôle essentiel dans le processus du remodelage cardiaque secondaire à l'hypertension. Cette hypertrophie est accompagnée à terme de phénomènes de fibrose qui vont peu à peu diminuer la

composante contractile du ventricule gauche. L'inflammation générée par cette hypertrophie va être à l'origine de la fibrose et donc de la rigidité myocardique.

L'objectif de la présente étude est d'évaluer chez un modèle de souris développant une hypertrophie myocardique, le potentiel de l'imagerie de l'inflammation dans le diagnostic de cette pathologie.

Au total, 32 souris C57Bl/6J seront incluses dans ce protocole. Tout au long des protocoles in vivo, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Le recours à un modèle animal est indispensable pour cette étude car actuellement aucun modèle alternatif (non animal) de remodelage cardiaque n'existe (Remplacer). Cependant, nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme indispensables chez l'animal (Réduire). Les animaux seront hébergés par groupe, avec enrichissement du milieu de vie. Un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé. Les éventuelles sessions d'imagerie seront réalisées sous anesthésie volatile (Isoflurane), supplémentée par un mélange Air - O<sub>2</sub>. Les animaux seront placés sur un lit thermostaté le temps de l'imagerie et la fréquence respiratoire sera enregistrée en continu afin de contrôler le degré d'anesthésie et de l'ajuster si nécessaire (Raffiner). De plus, des points limites adaptés seront utilisés pour limiter la douleur, souffrance ou angoisse légère induite par ces procédures expérimentales.

1895- L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, c'est à dire l'occlusion d'un vaisseau cérébral par un caillot sanguin, est la 3<sup>ème</sup> cause de mortalité et la 1<sup>ère</sup> cause de morbidité des pays industrialisés : 120 000 personnes en sont victimes chaque année en France. Le rtPA ou activateur tissulaire du plasminogène, seul traitement disponible permettant de détruire le caillot sanguin ne peut être administré que lors des 4.5 premières heures de survenue de l'AVC, ce qui limite considérablement son utilisation. Or, les lésions de l'AVC se poursuivent au-delà de la phase aiguë en raison de l'activation de cellules inflammatoires présentes dans le cerveau (microglie) ou bien provenant du sang (monocytes/macrophages). Deux types de réponses ont ainsi été identifiés, l'une neurotoxique pro-inflammatoire (M1) et l'autre neuroprotectrice anti-inflammatoire (M2). L'expression de l'hepcidine, hormone peptidique sécrétée par les monocytes en contexte inflammatoire, est augmentée dans l'infarctus du myocarde ou l'AVC expérimental. In vitro, l'hepcidine, diminue la production de cytokines pro-inflammatoires, favorisant ainsi la polarisation M1/M2 vers le versant anti-inflammatoire. Ces données placent donc l'hepcidine à l'intersection entre ischémie et immunité. Comprendre quels sont les régulateurs de cette réponse inflammatoire est indispensable pour proposer de nouvelles cibles thérapeutiques au-delà de la phase aiguë.

Notre projet repose sur des modèles murins wild-type (WT) (dont le gène codant pour l'hepcidine n'est pas modifié) transplantés avec la moelle osseuse d'animaux dont le gène codant pour l'hepcidine aura été invalidé (souris hepcidine knock-out ou KO). Ces animaux seront soumis à une ischémie cérébrale expérimentale. Les objectifs du projet sont 1) d'étudier l'effet de l'hepcidine, en termes de réduction du volume de l'infarctus cérébral, d'augmentation de la survie neuronale, de la neurogenèse et d'amélioration du déficit neurologique et 2) d'analyser la régulation de la réponse inflammatoire post-ischémique.

Les différents axes du projet impliquent 236 souris pour une période de 4 ans. Deux groupes de souris soumises à une ischémie expérimentale seront comparés : des souris dont la moelle osseuse est reconstituée avec la moelle de souris WT et des souris dont la moelle osseuse est reconstituée avec de la moelle de souris hepcidine KO (n=6-8 par groupe, calculé pour obtenir la puissance statistique nécessaire). Le traitement du cerveau incompatible entre certaines procédures (histologie, biologie moléculaire et cytométrie de flux) implique 3 séries en parallèle. Ces analyses seront réalisées à 5 temps. Les groupes ont été conçus de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Un soin particulier sera apporté au traitement contre la douleur avant et après les procédures chirurgicales et l'animal sera surveillé jusqu'à la fin de l'étude. Une analgésie par buprénorphine (0.1mg/kg en sous-cutané) sera réalisée 30 minutes avant le début de la chirurgie et renouvelée /12h pendant 48h. La souris est surveillée en couveuse puis remise en cage (5 souris par cage). Au cas où les douleurs persisteraient malgré les procédures entreprises, l'animal sera mis à mort.

Aucune approche in vitro ne permet de rendre compte de la complexité des interactions entre les organes lymphoïdes et le cerveau après ischémie cérébrale au cours du temps.

1896- L'être humain est soumis à l'alternance du cycle veille-sommeil.

L'éveil est un état permettant la réalisation d'activités diverses, durant cet état de vigilance le cerveau reçoit des informations, les analyse pour y répondre de manière adaptée. Le sommeil lent est un état comportemental de repos, au cours duquel l'absence d'activité motrice permet à l'organisme d'assurer les régulations végétatives dans des conditions de dépense énergétique minimale. Le sommeil paradoxal quant à lui, est un état permettant la réalisation des rêves.

Le sommeil a ses propres pathologies. Ses troubles affectent la qualité de vie et la santé de la population générale. L'objectif du laboratoire consiste à étudier les mécanismes centraux responsables du maintien de l'éveil et leurs troubles, notamment la narcolepsie, une affection neurologique grave caractérisée par :

- une somnolence excessive, un déficit du maintien de l'éveil,
- de la cataplexie ; une perte brusque du tonus musculaire provoqué par émotion,
- des passages directs de l'état d'éveil au sommeil paradoxal sans étape intermédiaire et un sommeil nocturne fragmenté avec des éveils fréquents.

Le protocole expérimental consiste à pratiquer une implantation chronique stéréotaxique d'électrodes corticales, musculaires et de canules intracérébrales. Les enregistrements polygraphiques continus ne peuvent être effectués qu'avec des électrodes implantées chirurgicalement.

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

### 1) Remplacement :

Le sommeil ne peut s'étudier que dans les conditions in vivo chez l'animal entier. Les mammifères sont les seuls animaux possédant un cycle veille/sommeil/rêve semblable à celui de l'homme. L'utilisation des animaux est donc indispensable à une meilleure compréhension des mécanismes neurophysiologiques régulant les états de vigilance (cycle veille-sommeil-rêve). La souris présente des rythmes circadiens très marqués, variables avec l'environnement et le patrimoine génétique.

### 2) Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre l'objectif du projet qui est de caractériser le cycle veille/sommeil de nos souris génétiquement modifiées et de les comparer à celui de souris sauvages.

Nous prévoyons d'utiliser 160 souris. Ce nombre d'animaux est nécessaire car nous allons étudier plusieurs lignées génétiquement modifiées sur lesquelles nous devons réaliser différents tests comportementaux et pharmacologiques. Ce nombre se justifie aussi par le fait que chaque souris ne pourra pas être soumise aux différents tests.

### 3) Raffinement

Les études sur le sommeil nécessitent des observations sur des animaux non anesthésiés vivants dans de bonnes conditions psychophysiologiques.

Le bien-être des animaux est donc une condition sine qua non de chaque étape de l'expérimentation. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

Durant les enregistrements l'animal est libre de ses mouvements.

L'implantation des électrodes se fait sous anesthésie générale par du personnel compétent. Après la chirurgie les animaux sont laissés au repos un mois, pendant lequel leur bien-être est surveillé quotidiennement.

1897- L'alcool-dépendance est une maladie chronique et hautement récidivante en dépit des thérapies existantes puisque 70% des patients rechutent après 12 mois de prise en charge (plus de 90% après 4 ans). Les mécanismes neurobiologiques impliqués dans la perte de contrôle sur la consommation d'alcool sont encore mal connus et trop peu de médicaments sont actuellement disponibles pour le traitement de l'alcool-dépendance. Certaines structures cérébrales ainsi que certains systèmes de neurotransmission ont tout de même été identifiés comme étant des acteurs clefs des addictions en général et de l'alcool-dépendance en particulier. Ces systèmes de neurotransmission sont le système dopaminergique et le système glutamatergique qui communiquent entre eux au travers de structures impliquées dans le circuit de la récompense (noyau accumbens, striatum dorsal, cortex préfrontal). Nous avons d'ores et déjà identifié un certain nombre de cibles moléculaires d'intérêt comme par exemple les récepteurs des systèmes dopaminergiques et histaminergiques, les récepteurs des opioïdes endogènes ou encore les récepteurs canaux au glutamate mais certaines nouvelles pourront se présenter à nous au cours de ce projet. Nous estimons devoir tester une dizaine de molécules au cours du projet décrit ici. Ainsi pour chacune des expérimentations prévues, nous envisageons donc de tester 10 molécules. Ces molécules seront testées en parallèle sur des rats non-dépendants et sur des rats dépendants. Nous avons choisi pour ce projet le modèle murin (rats Long Evans) qui est le plus utilisé dans le domaine de la recherche sur l'alcool et qui nous permettra d'étudier des comportements complexes dans un contexte d'auto-administration opérante. En fonction du type de procédure expérimentale le nombre de rats variera de 20 à 30 rats par groupe pour nous permettre d'obtenir une puissance statistique suffisante et ainsi observer des différences significatives entre les groupes. Un effort particulier dans le design expérimental est fait pour trouver un équilibre entre la non ré-utilisation de rats pour différentes molécules et la concentration de certaines procédures pour au final limiter le nombre d'animaux utilisés dans cette étude mais qui néanmoins nous permettent une interprétation correcte des résultats observés. Un total maximum de 4890 rats sera utilisé dans ce projet. Pour une partie des études, l'isolement des animaux et le non-enrichissement de l'environnement sera nécessaire à la mise en place du modèle de consommation excessive d'alcool. Quand cela sera néanmoins possible les animaux seront stabulés à 2 par cage avec un environnement enrichi (litière foisonnante et tube en carton). La souffrance des animaux sera évaluée suivant une grille de notation. En fonction des scores quotidiens obtenus nous pourrons diminuer les souffrances observées par l'administration de buprénorphine et dans les cas les plus graves, l'euthanasie immédiate sera appliquée.

L'objectif de ce projet global est de comprendre les mécanismes neurobiologiques, qui sous-tendent cette vulnérabilité à passer d'un usage contrôlé (non-dépendants) à un usage compulsif (dépendants). L'obtention de ces données constituerait une étape décisive dans la compréhension de la pathologie et l'identification de cibles thérapeutiques pertinentes. En général nos études visent aussi à fournir la preuve de concept avant de passer aux études de phase 1 en clinique.

1898- Les troubles anxieux et les troubles liés au stress sont particulièrement fréquents dans les pays industrialisés. Ainsi, on estime que 13 à 22% des habitants de ces pays développeront une pathologie anxieuse au cours de leur vie. Par ailleurs, le stress est impliqué dans l'apparition de pathologies d'ordre psychiatrique avec, au-delà de l'aspect individuel, un coût important pour la société. Par exemple, le trouble de l'adaptation avec anxiété est à l'origine d'environ 9% des consultations de médecine générale pour motif psychologique en France.

Au niveau des traitements, l'arsenal pharmacologique disponible concernant l'anxiété et le stress présente de nombreuses limitations de par les effets secondaires importants et/ou l'efficacité limitée de ces molécules. Dans ce contexte, la recherche de nouveaux produits plus efficaces représente donc un enjeu sociétal et économique majeur. La prévention de l'anxiété et du stress par exemple à l'aide de techniques de relaxation ou par des facteurs nutritionnels semble également une approche alternative prometteuse.

Le test de l'enfouissement défensif conditionné (EDC) est l'un des tests permettant d'évaluer l'anxiété chez le rongeur. Ce test est notamment connu pour sa sensibilité à la plupart des anxiolytiques (agents pharmacologiques qui réduisent l'anxiété) efficaces chez l'homme. C'est donc un outil de choix pour l'évaluation de nouveaux traitements. Les produits qui présentent des propriétés de type anxiolytiques réduisent la durée d'enfouissement suite au stress important imposé à l'animal qui ne peut pas être évité.

Dans cette situation, le rat est placé dans un environnement connu dans lequel un élément nouveau a été ajouté : une électrode qui délivre un seul et unique choc lors du premier contact de l'animal avec l'une de ses pattes. En réaction, le rat projette la sciure disposée sur le sol vers l'électrode. Ce comportement d'enfouissement est directement corrélé au niveau d'anxiété des rats. Ainsi, les produits qui présentent des propriétés de type anxiolytiques réduisent la durée d'enfouissement.

Le comportement des animaux dans ce test est sensible aux conditions d'applications du test. Les facteurs connus pour faire varier le comportement des animaux sont, de manière non exhaustive, la souche de rat, l'intensité du choc, le type de sciure, le protocole d'habituation...L'origine des rats (éleveur) et les conditions d'élevage et de stabulation peuvent également avoir un effet sur le comportement des rats, notamment l'enrichissement utilisé ou non. La maîtrise de ses facteurs est déterminante pour la qualité des études réalisées. Les effets de nouveaux traitements potentiellement peuvent ne pas être détectés si les animaux sont dans un état d'anxiété trop faible ou trop élevé, ou si leur comportement est trop variable.

Les fournisseurs et les laboratoires modifiant régulièrement les conditions d'élevage des rats pour des raisons de réglementation, d'amélioration de la qualité ou par souci éthique, une dérive progressive dans le comportement des rats dans le test de l'EDC a été observée. Une première étude a permis d'étudier la réponse comportementale des animaux de même souche, fournis par 2 éleveurs, suite à des chocs d'intensités variables. Les animaux d'un des deux éleveurs ont été choisis pour réaliser les études d'anxiété, il convient maintenant de tester le produit naturel anxiolytique habituellement testé au laboratoire afin de valider le modèle avec ces animaux provenant de ce nouvel éleveur.

Dans ce projet, 40 rats seront utilisés et répartis en 4 groupes de 10 animaux, comme suit :

- Groupe 1 : Véhicule,
- Groupe 2 : Produit X, 15 mg/kg,
- Groupe 3 : Produit X, 30 mg/kg,
- Groupe 4 : Produit X, 60 mg/kg.

Les animaux seront habitués à l'administration orale avec de l'eau de source et au dispositif expérimental pendant les 3 jours précédents le test. Le test de l'EDC sera effectué 1 heure après le traitement oral. Le comportement des animaux sera enregistré pendant 5 minutes pour étudier différents paramètres suite à la délivrance du choc électrique de faible intensité mais inévitable, suite à quoi le rat sera sorti du dispositif expérimental et mis à mort si aucune réutilisation des animaux n'est possible ou envisagée. Les animaux seront observés régulièrement tout au long de l'expérimentation et ceux présentant un comportement anormal (agressivité, cachexie, vocalises...) seront exclus de l'étude et mise à mort en conformité avec les recommandations éthiques.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets anxiolytiques de nouveaux produits car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) (remplacement). Les essais permettront de déterminer la dose du produit X donnant les meilleurs résultats, ce qui permettra à l'avenir de réaliser des calculs de puissance statistique pour déterminer le nombre optimal d'animaux à utiliser pour chaque étude. Cela évitera d'utiliser trop (réduction) ou trop peu (raffinement) d'animaux et de permettre ainsi l'exploitation des résultats.

1899- Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des maladies clonales de la cellule souche hématopoïétique (CSH) caractérisées par des cellules dysplasiques dans la moelle osseuse et des cytopénies périphériques et surtout l'anémie. Ce sont des maladies hétérogènes classées en SMD de risque faible et élevé. Les SMD de risque élevé ont une plus forte propension à se transformer en leucémies aiguës myéloïdes (LAM) définies par plus de 20% de blastes dans la moelle. Dans les SMD de haut risque, on distingue les AREB-1 et les AREB-2 en fonction du pourcentage de blastes médullaires (inférieur et supérieur ou égal à 10% de blastes). Chez ces patients, la priorité est de retarder le risque de transformation en LAM. Toute l'hématopoïèse qu'elle soit anormale ou normale se déroule dans la moelle osseuse au sein de l'os trabéculaire dans une niche composée de différents types cellulaires qu'on appelle microenvironnement médullaire. La grande majorité des cellules de ce microenvironnement proviennent d'une cellule progénitrice commune, la cellule souche mésenchymateuse (MSC). Des travaux récents suggèrent un rôle de plus en plus important de ce microenvironnement médullaire dans la physiopathologie des SMD. Il a été montré qu'en invalidant le gène codant pour la protéine DICER1 dans des progéniteurs ostéoblastiques, on pouvait recréer un SMD avec évolution vers une LAM. Une nouvelle molécule (GSK503) pourrait rétablir la fonction de DICER1 en inhibant une autre protéine EZH2. Cela a déjà été montré dans un modèle de cancer du sein.

Dans ce projet, nous réaliserons un modèle de xéno greffe de MDS en injectant dans le tibia de la souris des CSH et des MSC autologues provenant de patients atteints d'un SMD. Les souris seront réparties en 2 groupes: 1 recevra le GSK503 et l'autre non. L'ensemble de ces procédures pouvant s'accompagner d'une douleur/angoisse modérée, tous les efforts seront entrepris pour réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse ressentie par les animaux. C'est pourquoi nous surveillerons l'état de santé des animaux tout au long des expériences afin de pouvoir intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de douleur, de souffrance ou d'angoisse. De plus, le nombre d'animaux nécessaire à cette étude a été réduit au minimum, sur la base des besoins imposés par des tests statistiques que nous utiliserons. De fait, un nombre total de 26 souris sera nécessaire réparties en 2 groupes de 13 souris. Cette étude nous permettra de valider notre hypothèse et de bénéficier d'un nouvel agent thérapeutique innovant pour cette pathologie dont le pronostic reste actuellement sombre.

1900- Le TRALI (Transfusion-Related Acute Lung Injury) est un œdème lésionnel pulmonaire survenant quelques heures après une transfusion de produits sanguins labiles. Bien qu'il s'agisse d'un événement rare, il reste une des premières causes résiduelles de mortalité transfusionnelle. Le TRALI est provoqué le plus souvent par la présence d'anticorps dans les produits transfusés, dont certains sont spécifiques de molécules d'histocompatibilité de classe I (MHC I). En raison de sa rareté, les observations cliniques sont difficilement exploitables. Les mécanismes cellulaires participant au développement du TRALI sont complexes, aussi sa compréhension requiert des explorations expérimentales complémentaires in vitro et, in vivo dans des modèles animaux existants mais perfectibles. En effet, à ce jour deux modèles murins de TRALI ont été développés, lesquels présentent des insuffisances pour comprendre la pathologie humaine. En particulier, les plaquettes sanguines des souris, n'expriment pas de récepteurs aux immunoglobulines, contrairement à celles de l'homme, qui expriment le récepteur de faible affinité aux IgG, le CD32A. Or, la stimulation de ce récepteur entraîne une activation forte des plaquettes humaines, ou des souris transgéniques pour ce récepteur. Il est ainsi légitime de se demander si la présence du CD32A sur les plaquettes de souris pourrait entraîner une réponse pathologique particulière, suite à la transfusion d'anticorps.

Le projet consiste à comparer les effets à court terme (entre 10 min et 2h) de l'administration d'anticorps anti-MHC de classe I, dans des souris transgéniques ou non pour le CD32A qui auront au préalable été anesthésiées. Les mécanismes activés seront ensuite étudiés par l'analyse de tissus sur les animaux sacrifiés.

Réduire :

Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. A priori, le nombre d'animaux utilisés dans les expériences est fixé à 6 au maximum par condition au sein d'une expérience. Chaque type d'expérience pourra être réalisé trois fois. Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire et dans la mesure du possible, dans les expériences qui l'exigent, le sang et les tissus seront prélevés sur les mêmes animaux.

Raffiner :

Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, toutes les expériences sont réalisées sur des animaux anesthésiés;

Remplacer :

Cette étude évalue l'incidence de la transfusion d'anticorps sur la respiration pulmonaire, que l'on ne sait pas remplacer.

L'ensemble de ces expériences nécessitera 612 souris.