



**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 (28)

2801. Notre plateforme IRM réalise une palette de prestations très large, allant de la mise à disposition des équipements d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) à la réalisation, par la plateforme, d'expériences IRM selon les besoins du demandeur. Dans ce contexte, la plateforme est amenée à développer des outils d'imagerie à façon pour répondre aux questions scientifiques posées par ses utilisateurs. Dans ce projet, notre plateforme est sollicitée pour développer une technique d'imagerie capable de détecter et suivre l'évolution de la fibrose pulmonaire induite expérimentalement chez le rat. En clinique humaine, la fibrose pulmonaire est un effet secondaire fréquent de la radiothérapie du cancer du poumon. Elle est caractérisée par une phase inflammatoire aiguë suivie de la formation de tissu cicatriciel dans les sacs alvéolaires des poumons. La cicatrisation rend les poumons plus raides et affecte l'échange entre l'oxygène et le dioxyde de carbone, pouvant mener à une insuffisance pulmonaire et cardiaque précoces. Actuellement, des techniques expérimentales de radiothérapies moins délétères sont à l'étude de façon à réduire la formation de fibrose. Leur évaluation préclinique nécessite de suivre le développement de la fibrose au cours du temps. De nature non invasive et non irradiante, l'IRM est un outil de choix pour la recherche biomédicale. Sa grande précision spatiale, pouvant être inférieure au millimètre, ainsi que son excellent pouvoir de contraste tissulaire en font l'une des meilleures techniques d'imagerie anatomique. Il faut savoir que l'imagerie permet de réduire le nombre d'animaux utilisés car elle permet (i) de visualiser de façon non traumatique des lésions internes à l'animal, non visibles autrement, (ii) de constituer des groupes avec des lésions homogènes (en terme de taille ou caractéristique), (iii) de suivre les mêmes animaux au cours d'un traitement ou du développement d'une pathologie. L'enjeu de cette étude est de valider l'IRM du proton comme technique non-invasive de suivi du développement de la fibrose pulmonaire dans un modèle expérimental de fibrose induite par la bléomycine chez le rat. Ce modèle d'instillation intratrachéale choisi est très bien documenté et accepté dans la littérature. Il est cliniquement pertinent, ne nécessite pas d'acte chirurgical et induit une fibrose unilatérale spontanément résolutive après 4 semaines environ. L'étude sera menée chez 20 rats adultes. Ce nombre d'animaux a été déterminé grâce aux études antérieures dans le laboratoire en imagerie et sur ce modèle de fibrose, ce qui nous a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Les animaux seront imagés avant induction de la fibrose puis après induction de la fibrose à 7, 14 et 21 jours. Leur état de santé sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur par rapport aux points limites définis pour ce modèle. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Comme l'a déjà montré une étude antérieure, il est attendu que l'animal maintienne un état de santé stable puisque l'atteinte pulmonaire est unilatérale et compensée par le poumon resté sain.

2802. L'accident vasculaire cérébral (AVC) est une atteinte neurologique soudaine, secondaire à une lésion vasculaire. Les AVC représentent la deuxième cause de mortalité dans le monde et sont la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans les pays industrialisés. En France, il y a 130 000 nouveaux cas d'AVC par an dont 50% sont mortels. 15% de ces AVC sont de forme hémorragique. Les hémorragies spontanées, c'est-à-dire les ruptures d'anévrisme et d'autres hémorragies localisées dans une région particulière du cerveau (hémorragies sous arachnoïdiennes - HSA) engendrent une très forte mortalité et perturbent les systèmes physiologiques cérébraux, comme par exemple le système glymphatique.

Le système glymphatique, récemment découvert, est spécifiquement responsable du « nettoyage » du cerveau parce qu'il facilite l'élimination des déchets cellulaires s'y trouvant. Étudié initialement dans la maladie d'Alzheimer, maladie neurodégénérative au cours de laquelle de nombreux déchets s'accumulent dans le cerveau, le système glymphatique est également impliqué et perturbé dans l'AVC. De récentes études de notre équipe ont montré que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) permettait d'évaluer ce système chez le rongeur, ainsi que sa perturbation lors de l'AVC, plus particulièrement lors d'une HSA.

L'une des complications des HSA anévrysmales est l'obstruction secondaire d'une artère cérébrale (on parle d'ischémie secondaire) dans les 15 jours suivant l'hémorragie. C'est une complication redoutable, très complexe, pour laquelle l'arsenal thérapeutique est plus que limité. Trouver le point clef à l'origine de l'ischémie secondaire pourrait permettre de proposer des

nouveaux traitements. Nous pensons que ce point clef est la perturbation du système glymphatique due à l'hémorragie, phénomène que nous avons montré chez le rongeur. Si c'est le cas, maintenir un système glymphatique dans un état physiologique normal lors d'une telle pathologie pourrait diminuer les dommages sur le cerveau et donc améliorer l'état général des patients.

Ce projet a donc deux objectifs :

(1) prouver l'existence du système glymphatique chez le primate non-humain, pour pouvoir évaluer l'impact de nouvelles approches thérapeutiques dans une autre espèce plus proche de l'Homme que le rongeur,

(2) puis étudier l'impact d'une HSA sur ce système chez le PNH.

Le modèle PNH se justifie par la complexité anatomique du cerveau de cet animal, proche de celle de l'Homme et qui offre la possibilité d'utiliser les mêmes techniques non-invasives que chez l'Homme pour évaluer les mêmes fonctions cérébrales. Cette preuve de concept chez le PNH est essentielle à la recherche médicale car elle permettrait d'explorer par la suite l'impact de nouvelles approches thérapeutiques dans la HSA. Cela ouvrirait également un champ de recherche important, que ce soit dans le cadre des lésions cérébrales (traumatisme crânien, AVC...) ou celui des maladies neurodégénératives.

Les primates non-humains impliqués dans ce projet sont nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Leur nombre de 3 a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données significatives afin d'évaluer l'existence du système glymphatique chez le PNH.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales et d'imagerie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Des échelles cliniques journalières, un soutien nutritionnel et l'application de critères d'arrêt permettent de veiller au bien-être des animaux. Tous les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans des cages conformes aux normes européennes. Les animaux bénéficieront d'un programme d'enrichissement défini par la cellule de l'établissement chargée du bien-être animal

2803. Le vaccin contre la Fièvre Jaune (due au virus amaril) est l'un des plus efficaces, si ce n'est le plus efficace, de toute l'histoire de la vaccination. En effet, 95% des individus vaccinés sont protégés pendant 30 à 35 ans, voire toute la vie, par une seule injection. Le but principal de ce projet est d'identifier les raisons de cette efficacité, afin d'en tirer les enseignements nécessaires au développement de nouveaux vaccins contre d'autres maladies infectieuses. Les avancées technologiques des dernières années ont permis d'étudier un très grand nombre de paramètres de la réponse immune chez les individus vaccinés par le vaccin anti-amaril, néanmoins, ces études n'ont pas fourni les renseignements attendus car elles manquent de comparaisons avec des individus exposés au virus pathogène de la Fièvre Jaune (YFV) avec ou sans vaccination préalable. Pour cela, nous aurons recours aux primates non humains (PNH) seul modèle pertinent de l'infection de l'homme par le YFV.

Le projet se déroulera en deux étapes principales. L'une s'attachera à identifier un très grand nombre de paramètres caractérisant la réponse immunitaire induite par le vaccin anti-amaril. L'autre sera focalisée sur l'étude des paramètres caractéristiques de la réponse contre le YFV avec ou sans vaccination préalable.

Le projet prévoit au maximum 64 PNH nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : immunisations, inoculation virale et prélèvements de sang et biopsies sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet.

Des échantillons biologiques produits dans ce projet seront partagés avec d'autres laboratoires afin de limiter le recours au modèle PNH. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés par paires avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales et ils bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule de l'établissement en charge du bien-être animal.

2804. L'objectif scientifique de ce projet est de caractériser des protéines chez des mammifères d'intérêt agronomique. La détection et la mesure de ces protéines dans le sang sont utilisées chez les femelles des mammifères ruminants pour diagnostiquer la gestation ainsi que pour évaluer la survie du fœtus en croissance. La mesure de ces protéines est effectuée par des dosages utilisant des anticorps qui seuls peuvent reconnaître de manière très spécifique les protéines recherchées. La nature des dosages que nous réalisons nécessite l'utilisation d'anticorps produits chez deux espèces animales différentes afin d'éviter la possibilité de réactions faussement positives ou faussement négatives et justifie donc le dépôt de ce projet impliquant des lapins et d'un autre projet identique impliquant des chèvres. Le peu de réactifs actuellement disponibles sont produits par les laboratoires de recherche et mis à disposition des laboratoires d'essai assurant le service aux éleveurs. Le présent projet a pour objectif de produire des anticorps dirigés contre plusieurs membres de cette famille de protéines de gestation. Les anticorps sont sécrétés par des cellules du système immunitaire d'un animal pour détecter et neutraliser les agents pathogènes de manière spécifique. La synthèse d'anticorps est obtenue en réponse à la rencontre d'un antigène ayant un pouvoir immunogène. C'est cette propriété que nous utilisons pour faire produire des anticorps chez le lapin. Les antigènes protéiques sont administrés aux lapins selon une procédure incluant une primo injection suivie d'une série de six injections de rappel afin d'augmenter la qualité des anticorps synthétisés par l'animal. Les antigènes sont des protéines d'extraction naturelle obtenues chez le bovin et des antigènes peptidiques obtenues par synthèse. Ce projet d'une durée de 5 ans prévoit la production d'immunsérums chez 150 lapins à raison d'une trentaine d'animaux par an. Les immunsérums sont obtenus par prises de sang effectuées après chaque rappel au-delà du 3e rappel. Le volume de prélèvement correspond à 6% du volume

sanguin total d'un lapin et reste en dessous des limites des mécanismes compensatoires permettant une régénération des cellules sanguines sans contrainte notable pour l'animal. La mobilisation des animaux n'excède pas 6 mois. L'expérience acquise nous a appris que 3 animaux sont le strict nécessaire afin d'optimiser une production d'anticorps pour un antigène donné. La qualité des anticorps obtenus est testée au laboratoire au fur et à mesure de la procédure d'immunisation dès le 3<sup>e</sup> rappel. Ces mesures permettent d'évaluer si la procédure mérite ou non d'être poursuivie. Si certains antigènes ne s'avèrent pas immunogènes ou si les anticorps formés ne se montrent pas spécifiques, la procédure d'immunisation est arrêtée et les animaux affranchis de la procédure sont remis à l'élevage. Cela entraîne une réduction du nombre total d'animaux maintenus dans le protocole. En conséquence le nombre d'animaux effectivement engagés dans le protocole et la durée du protocole seront certainement inférieurs au total prévu dans le projet. Les animaux sont logés séparément, sans contrainte et selon les conditions en vigueur dans l'élevage. Néanmoins, les contacts sociaux obtenus par l'hébergement des différents animaux dans des cages adjacentes participent à l'enrichissement. Celui-ci est complété par l'apport d'objets (balles) dans l'environnement.

2805. L'objectif scientifique de ce projet est de caractériser des protéines de gestation chez des mammifères d'intérêt agronomique. La détection et la mesure de ces protéines dans le sang sont utilisées chez les femelles des mammifères ruminants pour diagnostiquer la gestation ainsi que pour évaluer la survie du fœtus en croissance. La mesure de ces protéines est effectuée par des dosages utilisant des anticorps qui, seuls, peuvent reconnaître de manière très spécifique les protéines recherchées. Le peu de réactifs actuellement disponibles sont produits par les laboratoires de recherche et mis à disposition des laboratoires d'essai assurant le service aux éleveurs. Le présent projet a pour objectif de produire des anticorps dirigés contre plusieurs membres de cette famille de protéines de gestation. Les anticorps sont sécrétés par des cellules du système immunitaire d'un animal pour détecter et neutraliser les agents pathogènes de manière spécifique. La synthèse d'anticorps est obtenue en réponse à la rencontre d'un antigène ayant un pouvoir immunogène. C'est cette propriété que nous utilisons pour faire produire des anticorps chez la chèvre. Les antigènes protéiques sont administrés aux chèvres selon une procédure incluant une primo injection suivie d'une série de six injections de rappel afin d'augmenter la qualité des anticorps synthétisés par l'animal. Les antigènes utilisés sont de deux types : ce sont soit des protéines extraites de bovins, soit des antigènes peptidiques obtenus par synthèse. Ce projet d'une durée de 5 ans prévoit la production d'immunsérums chez 75 chèvres à raison d'une quinzaine d'animaux par an. L'expérience acquise nous a appris que 3 animaux sont le strict nécessaire afin d'optimiser une production d'anticorps pour un antigène donné. Les immunsérums sont obtenus par prises de sang effectuées après chaque rappel au-delà du 3<sup>e</sup> rappel. Le volume de prélèvement est très inférieur au volume maximal théorique autorisé et ne représente pas de contrainte notable pour l'animal. La mobilisation des animaux n'excède pas 6 mois. La qualité des anticorps obtenus est testée au fur et à mesure de la procédure d'immunisation dès le 3<sup>e</sup> rappel. Ces mesures permettent d'évaluer si la procédure mérite ou non d'être poursuivie. Si certains antigènes ne s'avèrent pas immunogènes ou si les anticorps formés ne se montrent pas spécifiques, la procédure d'immunisation est arrêtée et les animaux affranchis de la procédure sont remis à l'élevage. En conséquence le nombre d'animaux effectivement engagés dans le protocole et la durée du protocole seront certainement inférieurs au total prévu dans le projet. Pendant la durée du protocole, les chèvres, qui ont un comportement social très prononcé, sont laissées dans les conditions usuelles de l'élevage, c'est-à-dire en groupe avec la liberté de mouvement dans l'aire abritée et paillée qui leur est dédié. L'espace sera suffisant afin que les phénomènes de compétition qui sont la règle chez cette espèce, n'empêchent pas l'accès à la nourriture et à l'eau des animaux sous dominance. Les chèvres sont nourries au foin complété par de l'aliment concentré et visitées au moins deux fois par jour. La chèvre étant un animal vif et facétieux, un enrichissement sera obtenu par mise à leur disposition d'éléments (bottes de paille) sur lesquels les animaux pourront grimper et sauter.

2806. Chez quelques espèces animales, dont les espèces aviaires, les spermatozoïdes déposés dans l'appareil reproducteur de la femelle au cours de l'accouplement sont stockés et maintenus en vie pendant de très longues périodes, allant de plusieurs semaines à plusieurs années. Ce modèle de survie prolongée des cellules reproductrices mâles est un excellent modèle pour concevoir des systèmes de conservation de cellules in vitro dans une large gamme d'applications pratiques et thérapeutiques. Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet sont des poules appartenant à 2 lignées divergentes en terme de durée de période fertile qui sont entretenues depuis de nombreuses années. La lignée DPF- se caractérise par une durée de période fertile courte (10 jours environ) alors que la lignée DPF+ a une durée de période fertile longue (21 jours environ). Dans le cadre de ce projet, le nombre maximum de poule (pubères virginisées) sera de 60 (30 par lignée) et par an (1 protocole par an), soit un maximum de 300 poules pour 5 ans. Elles seront toutes inséminées artificiellement le même jour avec du sperme de coq. Le nombre (n=60/protocole) est nécessaire afin d'étudier un groupe présentant une variabilité inter-individuelle et permettre le choix ultérieur d'animaux présentant des phénotypes extrêmes, les plus intéressants pour répondre à notre question (3R - Réduire). Quotidiennement pendant 3 semaines les œufs sont récoltés individuellement et mis en incubation. Au terme de 4 semaines de collecte, nous disposerons pour chacune des 60 poules de sa cinétique de ponte et de sa cinétique de production d'œufs fécondés, duquel nous pourrions déduire sa capacité à conserver les spermatozoïdes au cours du temps. Ce type d'expérimentation est réalisé en vue d'obtenir et d'exploiter des informations sur le phénotype de chaque individu (taux de ponte, fertilité, durée de période fertile); ce qui nécessite l'entretien des animaux en cages individuelles. Les animaux sont en cages individuelles ajourées (grilles de séparation) et contiguës, permettant le contact visuel et vocal, ainsi que des contacts légers par le bec. De plus les cages seront enrichies en y plaçant un petit objet qui servira de jouet à picorer (3R - Raffinement). Elles sont équipées d'un système d'abreuvement et d'alimentation adapté à l'espèce. Les poules seront logées dans une pièce conditionnée (20°C, 14h d'éclairage/jour), et vont recevoir quotidiennement plusieurs visites des soigneurs, des praticiens ou des concepteurs pour, par exemple : le ramassage des

œufs, l'approvisionnement en nourriture et en eau, le nettoyage de la pièce et des cages, ce qui permet l'inspection visuelle de la bonne santé de chaque animal. Les poules seront catégorisées en fonction de leurs paramètres de reproduction, et subiront un prélèvement du fluide utérin à différents moments, avant et après insémination artificielle. Il s'agit d'une méthode non invasive puisque le fluide d'oviducte est récupéré par la voie naturelle, mais qui nécessite l'injection intraveineuse de 50 µg de prostaglandines PGF2 alpha pour favoriser sa collecte. Le volume recueilli varie de 0.1 à 1 ml selon les animaux. Chaque poule sera prélevée individuellement 10 heures après ovoposition. Suite aux recueils de fluide utérin, au cours de chaque protocole (1 par an) cinq poules par lot seront euthanasiées pour permettre le recueil de tissus biologiques afin d'étudier les sites de synthèse et l'expression des acteurs moléculaires impliqués. Les poules restantes retourneront à l'élevage. Ce type d'expérimentation ne peut être réalisé qu'in vivo et ne peut pas faire l'objet d'un remplacement par une méthode alternative (3R - Remplacement).

2807. Les lésions cérébrales post traumatiques représentent l'une des principales causes de mortalité de la population active et l'une des premières causes d'invalidité chez les personnes de moins de 35 ans en Europe et aux Etats-Unis. Avec ses conséquences socio-économiques et sa fréquence élevée chez l'adulte jeune, le traumatisme crânien demeure une préoccupation médicale majeure à l'échelle mondiale et constitue un véritable défi de santé publique.

Il n'existe pas, pour le moment, de traitement neuroprotecteur qui offrirait un meilleur pronostic fonctionnel aux patients "cérébrolésés". La prise en charge initiale actuelle consiste essentiellement en une lutte contre l'augmentation de la pression intracrânienne causée par l'œdème cérébral. Le mannitol et le sérum salé hypertonique constituent la base des traitements antiœdémateux disponibles. Récemment, il a été décrit que l'utilisation de lactate de sodium comme traitement antiœdémateux à la phase initiale du traumatisme crânien permettait de contrôler les poussées d'hypertension intracrâniennes survenant chez les patients. L'utilisation de ce produit en prophylaxie chez les patients traumatisés crâniens graves permet également une diminution significative de l'incidence des poussées de pression intracrânienne présentées au décours de l'hospitalisation. Cet effet s'accompagne d'une diminution de la balance hydrique et de la balance chlorée. Des données expérimentales et cliniques suggèrent également que le lactate est un substrat énergétique préférentiel pour le cerveau en particulier en période de stress ou dans des périodes d'augmentation importante de la demande énergétique comme après une lésion cérébrale aiguë par exemple. Ce produit pourrait donc avoir une action multiple intéressante au décours de la phase aiguë du traumatisme. Alors que des hypothèses sont déjà proposées concernant son action métabolique, les mécanismes de son action antiœdémateuse ne sont actuellement pas connus.

L'objectif de notre projet est de caractériser ces mécanismes. Nos travaux seront orientés selon 3 axes:

- Effet du lactate de sodium sur le développement de l'œdème cérébral post-traumatique et sur l'hémodynamique cérébrale.
- Etude électrophysiologique des effets de la perfusion de lactate de sodium sur les échanges transmembranaires. L'effet du chlore sera particulièrement étudié dans ce contexte. Nous utiliserons pour cet objectif un modèle cellulaire nous permettant de limiter l'utilisation d'animaux.
- Etude par immunomarquage et dosage des aquaporines et des canaux échangeurs sodium-potassium-chlore NKCC, 2 acteurs majeurs dans la genèse de l'œdème cellulaire.

Dans le cadre de ce projet, nous souhaiterions utiliser un modèle de traumatisme crânien diffus par percussion liquidienne latérale sur rats Sprague-Dawley. La pression appliquée sur le cerveau sera de 2,4 atmosphères, permettant de mimer un traumatisme crânien de gravité modérée.

8 groupes de 20 rats seront constitués pour un total de 160 animaux utilisés (14 rats supplémentaires sont prévus pour la mise au point des techniques à utiliser). La moitié des rats (groupes opérés: 4 groupes x 20 = 80 animaux) seront percuteurs après avoir subi une préparation chirurgicale préalable tandis que l'autre moitié des animaux ne subiront que cette préparation sans être percuteurs (groupes pseudo-opérés: 4 groupes x 20 = 80 animaux). Parmi les groupes de rats opérés et pseudo-opérés, l'un recevra du sérum physiologique tandis que les autres recevront respectivement du mannitol 20%, du sérum salé hypertonique 7,5% et du lactate de sodium.

Les animaux seront sacrifiés 6 heures après avoir été opérés et leurs cerveaux seront prélevés pour permettre l'étude des différents paramètres biochimiques d'intérêt.

Nous avons conçu notre plan expérimental dans le souci de la règle des 3R. Nous avons réduit nos effectifs autant qu'une analyse statistique de qualité puisse le permettre. L'obligation de remplacement lorsque cela est possible a été appliquée puisque l'influence du lactate sur les échanges transmembranaires sera évaluée sur des cultures cellulaires. Le raffinement comprend à la fois les conditions d'élevage et la prise en charge de la souffrance des animaux tout au long des procédures prévues. Les animaux seront hébergés par 2 dans une animalerie maintenue dans des conditions de température (22+/-2°C) et d'humidité constante (55+/-10%) et auront un libre accès à l'eau et à la nourriture. Leur souffrance potentielle sera très régulièrement estimée de manière à adapter les traitements antalgiques prévus et, en cas de nécessité, à recourir à une euthanasie d'urgence.

Notre travail permettra de comparer l'efficacité des différents traitements utilisés chez l'Homme selon leurs actions anti-œdémateuses, hémodynamiques et neuroprotectrices. Nous espérons comprendre ainsi les mécanismes mis en jeu lors des effets observés en pratique clinique afin d'en tirer le meilleur parti possible dans le futur.

2808. Le développement de certains composés pharmaceutiques ou chimiques requiert des explorations in vivo chez le rongeur, à part des études réglementaires à proprement parler. Ces études peuvent être demandées ou non par les autorités réglementaires, pour affiner ou mettre en place des conditions expérimentales, ou pour répondre à des questions de sécurité, ou pour explorer les mécanismes d'action. Ces études peuvent donc servir à affiner les expériences en amont des études

réglementaires qui devront être réalisées par la suite, en permettant de limiter le nombre global d'animaux utilisés dans le développement d'un produit. Elles peuvent aussi directement contribuer à assurer la sécurité non-clinique des médicaments en comprenant mieux leurs mécanismes.

Ce projet se résume en l'administration d'un produit pharmaceutique ou chimique chez le rongeur. La fréquence et la durée d'administration sont variables en fonction des composés à tester, de l'objectif de l'étude, et de l'application chez l'homme. La voie d'administration est celle utilisée chez l'homme pour les produits pharmaceutiques (orale, dans la nourriture, application dermale, intraveineuse, intra articulaire, etc.) ou la voie d'exposition potentielle de l'homme pour les produits chimiques (orale, dermale...). Il n'existe pas de méthode alternative *in vitro* pour ce type de procédure de traitement identique à celle utilisée chez l'homme, en raison notamment de la complexité que représente un organisme vivant.

L'animal choisi est le rongeur, car c'est l'espèce acceptée pour ce type d'étude et pour laquelle un grand nombre de données est disponible.

Le nombre d'animaux utilisé dans le cadre de ce projet est très variable selon le protocole expérimental. Il est déterminé a minima afin d'obtenir des résultats représentatifs et exploitables statistiquement et ainsi d'atteindre tous les objectifs spécifiques de l'étude en procédant à toutes les analyses nécessaires sur un nombre d'animaux optimisé. Il est attendu d'utiliser 5800 rongeurs (3500 souris, 2100 rats, 100 cobayes et 100 hamsters) sur la durée du projet. Si nécessaire, l'administration du composé à tester est réalisée sous anesthésie générale pour permettre une injection en toute sécurité et sans douleur (voie intra articulaire par exemple), et l'on peut recourir à l'usage d'analgésiques pour diminuer la douleur si elle n'a pas pu être évitée. 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. Les animaux sont hébergés dans la mesure du possible en groupe dans des cages conformes à la Directive 2010/63 avec enrichissement.

2809. Le virus Zika est un arbovirus transmis à l'homme par les moustiques du genre *Aedes*, connu depuis 1947 en Afrique. En 2013, sept ans après avoir sévi en Micronésie, il atteint la Polynésie Française où il provoque une épidémie touchant 30% de la population. Depuis janvier 2015, le virus s'est propagé au continent Sud-Américain où l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) considère que 40 millions de personnes sont potentiellement exposées. Cette infection virale, asymptomatique dans 60 à 80% des cas, provoque néanmoins des atteintes mineures telles que de la fièvre et des éruptions cutanées. Cependant, dans 0,05% des cas, elle provoque des atteintes neurologiques (syndrome de Guillain-Barré). En Amérique du Sud, des épidémies concomitantes de virus Chikungunya et de Dengue ont masqué l'épidémie de Zika. La gravité de cette dernière n'a été révélée que par la mise en évidence d'une augmentation dramatique (fois 30) du nombre de nouveau-nés microcéphales, sans doute liée à l'infection de leur mère au cours de la grossesse. Il n'existe à ce jour aucun traitement spécifique et aucun vaccin efficace permettant de se protéger de cette infection. Le 1er février 2016, l'OMS a déclaré que le virus Zika constitue une urgence de santé publique de portée mondiale.

L'objectif de notre projet est de mettre au point un modèle animal de l'infection par le virus Zika, pour mieux comprendre ses mécanismes, la distribution du virus dans l'organisme, d'évaluer l'efficacité de « candidats vaccins » et de traitements antiviraux utilisables chez l'homme. L'évaluation de l'innocuité et de l'efficacité de nouveaux vaccins et traitements ne pouvant être réalisée que sur des organismes entiers, le modèle animal est nécessaire pour apporter le maximum d'informations avant la réalisation d'essais chez l'homme. Le modèle choisi pour ce projet est le primate non humain (PNH). En effet, d'une part, les PNH peuvent être infectés par le virus Zika et d'autre part, la réponse des PNH aux vaccins et aux traitements est similaire à celle de l'homme.

Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été réduit au maximum tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non-paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats.

Le projet prévoit au maximum 100 PNH nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies de façon à éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : immunisations, inoculation virale et prélèvements de sang sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Des échantillons biologiques produits dans ce projet seront partagés avec d'autres laboratoires afin de limiter le recours au modèle PNH. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés en groupe avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

2810. La cirrhose représente un problème de santé publique majeur, pouvant être à l'origine de diverses complications, dont l'encéphalopathie hépatique, qui se définit par l'ensemble des manifestations neurologiques ou neuropsychiatriques secondaires à l'atteinte hépatique. Celle-ci est régulièrement décrite suite à la prise de certains xénobiotiques.

Les mécanismes de survenue de l'encéphalopathie hépatique restent à ce jour mal connus. Une des hypothèses physiopathologiques est une altération de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, à l'origine notamment d'une accumulation intracérébrale anormale de certains xénobiotiques, celle-ci étant normalement régulée par les transporteurs ABC, protéines d'efflux de la barrière hémato-encéphalique. Nous émettons l'hypothèse que la cirrhose est à l'origine d'une

modification d'expression ou d'activité de ces transporteurs, ce qui expliquerait les conséquences neurologiques de la prise de certains xénobiotiques chez les patients cirrhotiques, non observées chez les non cirrhotiques.

Notre projet a pour but d'explorer cette hypothèse en étudiant les cerveaux de 130 rats atteints de cirrhose et d'encéphalopathie, en privilégiant à chaque étape l'analgésie et le bien-être des animaux. De plus, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous séparerons les deux hémisphères cérébraux pour limiter la quantité de tissu à utiliser pour chaque technique.

Nous prévoyons de compléter cette étude par des modèles *in vitro* de barrière hémato-encéphalique afin d'explorer les modifications d'expression et d'activité des transporteurs ABC après exposition à du plasma de patients cirrhotiques avec ou sans encéphalopathie.

Cette étude permettra de mieux comprendre les mécanismes de l'encéphalopathie hépatique secondaire à une prise médicamenteuse et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de prévenir ou compenser cette toxicité.

Type d'animaux : rats Wistar mâles adultes

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 130 rats pour une durée de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les phénomènes mis en jeu dans le développement de l'encéphalopathie hépatique sur cirrhose. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires entrant en jeu. Les modèles existants de barrière hématoencéphalique sont des cellules endothéliales de rat ; notre étude pourra donc ainsi compléter les données sans barrière d'espèce.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Nous prévoyons également de réaliser des groupes de mise au point des techniques afin de limiter le nombre total de rats nécessaire à la bonne conduite du projet. Les groupes contrôles (Sham) pourront être constitués d'un nombre plus limité d'animaux (5 vs 10).

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

2811. Le développement de certains composés pharmaceutiques ou chimiques requiert des explorations *in vivo* chez le chien, le chat, le porc ou le lapin, à part des études réglementaires à proprement parler. Ces études peuvent être demandées ou non par les autorités réglementaires, pour affiner ou mettre en place des conditions expérimentales, ou pour répondre à des questions de sécurité, ou pour explorer les mécanismes d'action. Ces études peuvent donc servir à affiner les expériences en amont des études réglementaires qui devront être réalisées par la suite, en permettant de limiter le nombre global d'animaux utilisés dans le développement d'un produit. Elles peuvent aussi directement contribuer à assurer la sécurité non-clinique des médicaments en comprenant mieux leurs mécanismes. Pour répondre à ces questions il n'existe à ce jour pas de méthode alternative *in vitro*, en raison notamment de la complexité que représente un organisme vivant.

Ce projet se résume en l'administration d'un produit pharmaceutique ou chimique dans une ou plusieurs espèces d'animaux de laboratoire. La fréquence et la durée d'administration sont variables en fonction des composés à tester, de l'objectif de l'étude, et de l'application chez l'homme. Pour les produits pharmaceutiques la voie d'administration est celle utilisée chez l'homme (orale, application dermale, intraveineuse, intra articulaire, etc.). Pour les chimiques, c'est la voie probable d'exposition de l'homme au produit (orale, dermale...). Lorsqu'il s'agit de valider des techniques particulières, un soluté physiologique ou un produit de référence peut être utilisé au lieu d'un composé pharmaceutique à tester.

L'espèce est déterminée en fonction des homologues avec l'homme, ou des études réglementaires prévues ou déjà réalisées dans une espèce donnée.

Le nombre d'animaux utilisé dans le cadre de ce projet est très variable selon le protocole expérimental. Il est déterminé a minima afin d'obtenir des résultats robustes et ainsi d'atteindre tous les objectifs spécifiques de l'étude en procédant à toutes les analyses nécessaires sur un nombre d'animaux optimisé. Il est attendu d'utiliser 120 chiens, 40 chats, 84 porcs et 136 lapins sur la durée du projet. Si nécessaire, l'administration du composé à tester est réalisée sous anesthésie générale pour permettre une injection en toute sécurité et sans douleur (voie intra articulaire ou intravitréenne par exemple), et l'on peut recourir à l'usage d'analgésiques pour diminuer la douleur si elle n'a pas pu être évitée. 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. Les animaux sont hébergés dans la mesure du possible en groupe dans des enceintes/cages conformes à la Directive 2010/63. Un soin particulier est accordé à l'enrichissement (renforcement positif, jouets, musique).

2812. Notre projet vise à explorer les altérations des réseaux corticaux induites par une activité épileptique. Notre objectif général est à la fois de mieux comprendre les mécanismes de génération des crises mais également, à travers l'étude de ces altérations, d'explorer les mécanismes de plasticité cellulaire susceptibles d'offrir de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des épilepsies chroniques. Nous nous intéressons particulièrement aux altérations des réseaux inhibiteurs (GABAergiques) dans l'hippocampe épileptique.

Les interneurons inhibiteurs contrôlent notamment la décharge des potentiels d'action des cellules principales, contribuant ainsi aux activités rythmiques dans le cerveau. En particulier, les interneurons à parvalbumine (PV) fonctionnent comme des générateurs d'oscillations qui orchestrent l'activité des cellules principales. Notre hypothèse est qu'une altération de l'excitabilité des interneurons à PV pourrait influencer fortement l'activité du réseau hippocampique. Nous souhaitons donc explorer les propriétés des synapses qui excitent les interneurons à PV dans l'hippocampe, et comment elles sont modifiées dans l'hippocampe épileptique.

Nous avons récemment montré que certaines de ces synapses, mais pas d'autres, expriment des récepteurs de type NMDA, ce qui leur confère des propriétés plastiques particulières. Nos données prédisent ainsi qu'une période d'activité à haute fréquence - telle que celle induite lors d'une crise - pourraient spécifiquement renforcer ces synapses. L'identification de ces afférences requiert l'utilisation d'outils optogénétiques afin d'en caractériser, chez la souris, l'origine anatomique ainsi que la zone de projection. Ces animaux seront alors utilisés à la fois i) pour des expériences électrophysiologiques visant à comparer les propriétés des différentes synapses des interneurons à PV, ii) pour réaliser des marquages immunohistochimiques des récepteurs postsynaptiques afin de confirmer les données électrophysiologiques et iii) pour explorer comment ces différentes synapses sont affectées par une période d'activité épileptique.

Ce projet est basé sur un ensemble de données expérimentales *in vitro* qui soutiennent notre hypothèse de travail. Les procédures expérimentales qui seront mises en œuvre ont toutes été préalablement validées afin de réduire au minimum le nombre d'animaux mis en œuvre. En outre, les conditions de stabulation seront contrôlées avec enrichissement, et toutes les procédures seront mises en œuvre en limitant au maximum le stress et la douleur chez l'animal.

Nombre total de souris utilisées dans ce projet : 322

2813. Les maladies cardiovasculaires sont une des causes majeures de morbi-mortalité dans le monde. Parmi les nombreux facteurs de risque, les dyslipidémies sont identifiées comme étant principalement à l'origine des pathologies vasculaires. Les dyslipidémies sont caractérisées par des anomalies qualitatives ou quantitatives d'un ou de plusieurs lipides circulants : cholestérol total, HDL-cholestérol, LDL-cholestérol et triglycérides. L'objectif de ce projet est d'identifier de nouvelles voies thérapeutiques et d'évaluer l'effet de molécules pharmacologiques innovantes visant à améliorer le métabolisme lipidique et les bénéfices vis à vis des complications cardiovasculaires sous-jacentes.

Dans le cadre de la recherche sur les dyslipidémies, les études *in vitro* et les études *in vivo* sont deux approches complémentaires. Les modèles développés *in vitro* utilisent des cellules ou des organites cellulaires d'origine animale et humaine qui permettent de sélectionner l'efficacité d'un « candidat » par rapport à la cible visée. Ces modèles confortent les hypothèses de cohérence entre le candidat et sa cible, et permettent de sélectionner les composés qui présentent la meilleure efficacité. Le métabolisme des lipoprotéines reste néanmoins un processus complexe qui implique les fonctions hépatiques mais aussi les autres tissus utilisateurs des lipides comme le tissu adipeux et les muscles. La multiplicité des acteurs cellulaires et l'origine multifactorielle des dyslipidémies n'est donc pas reproductible ou modélisable *in vitro*. L'évaluation du bénéfice thérapeutique des composés pharmacologiques préalablement sélectionnés *in vitro* et destinés au traitement des dyslipidémies et de leurs conséquences cardiovasculaires nécessite une approche *in vivo* intégrée et pertinente, permise par le recours à l'animal. Le premier tri réalisé pendant les études *in vitro* garantit d'aborder la phase *in vivo* avec un nombre limité de composés pharmacologiques, et permet ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés. D'autre part, un support en biostatistiques sera apporté par des experts, afin d'optimiser les méthodes expérimentales, et de rationaliser le nombre d'animaux utilisés.

Les modèles expérimentaux seront développés chez la souris et le hamster. Les modèles mis en place chez le hamster sont des modèles particulièrement adaptés à l'étude de la synthèse et la dégradation des lipoprotéines car cette espèce possède un métabolisme et un profil lipidique plus proche de celui de l'Homme que d'autres espèces d'animaux de laboratoire. Par ailleurs, le métabolisme globalement plus rapide chez la souris permet de raccourcir le temps des périodes expérimentales.

Les modèles murins permettant de se rapprocher de la physiopathologie cardiaque humaine nécessitent d'augmenter l'expression des cibles cardiométaboliques d'intérêt avant d'évaluer le bénéfice thérapeutique de leur atteinte par les composés. Ainsi, nous prévoyons d'administrer des protéines recombinantes humaines chez la souris en vue d'étudier le potentiel thérapeutique des composés pharmacologiques.

Les expérimentations réalisées sont encadrées par des recommandations internes et européennes, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (hébergement, soins, manipulation, expérimentations), et ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal. Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques fondamentaux. Nous avons établi des critères d'arrêt anticipé qui permettent de sacrifier l'animal avant l'apparition de phénomènes douloureux. De plus, les étapes pouvant engendrer une douleur sont prises en charge par la combinaison de l'anesthésie avec des antalgiques administrés en péri et post-opératoire.

Le nombre de rongeurs utilisés dans le cadre de ce projet est au maximum de 7200 souris et 6000 hamsters (soit 13200 rongeurs) sur 5 ans.

2814. L'incidence des manifestations allergiques est en constante augmentation dans les pays industrialisés. Ainsi, la dermatite de contact allergique atteint de nos jours environ 20% de la population. L'accroissement de cette affection est lié à l'exposition grandissante de la population à des chimiques non protéiques dotés de pouvoirs sensibilisants appelés haptènes, rencontrés dans la vie de tous les jours et/ou dans notre environnement professionnel. Les connaissances relatives à la physiopathologie de la dermatite de contact allergique reposent essentiellement sur des modèles murins dans lesquels la réponse inflammatoire est induite par l'application sur la peau d'haptènes forts.

L'impact de la flore commensale sur les pathologies allergiques est aujourd'hui bien décrit chez l'homme. Il a été récemment démontré que la composition du microbiote pouvait être régulée par des récepteurs de l'immunité innée. L'objectif de notre projet est d'étudier le rôle de ces récepteurs sur la composition du microbiote dans le contexte d'une réponse allergique en utilisant un modèle pré-clinique murin. Le projet nécessitera l'utilisation de 180 souris. Le choix du modèle murin est imposé car il récapitule les mêmes étapes que la pathologie humaine et représente de ce fait un modèle pré-clinique de référence, et qu'il est largement utilisé dans les tests pré-cliniques des compagnies pharmaceutiques. De plus, la réponse immunitaire responsable de la dermatite de contact allergique est un phénomène biologique complexe faisant intervenir de multiples types cellulaires et une organisation spatiale qui rend impossible son étude dans des tests *in vitro*. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum nécessaire à l'interprétation statistique des résultats des diverses expériences. 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 que pourraient ressentir les animaux. En terme de retombées attendues, ce projet devrait permettre d'identifier si le microbiote et plus spécifiquement certaines bactéries présentes dans la flore intestinale, peuvent être des facteurs de prédisposition à l'allergie, et de ce fait proposer de nouveaux outils de diagnostic de l'allergie cutanée chez l'homme.

2815. L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique représente un problème majeur de santé publique en France et dans le monde. A ce jour, les agents anti-plaquettaires qui préviennent la thrombose, c'est-à-dire la formation d'un agrégat notamment composé de plaquettes au niveau des coronaires, ne peuvent pas être utilisés dans le traitement de l'AVC en raison du risque de saignement élevé qu'ils entraînent au niveau du cerveau. La recherche de nouveaux médicaments antiplaquettaires prévenant la formation de thrombi plaquettaires et ayant très peu d'effets secondaires sur l'hémostase physiologique est clef pour le traitement de l'AVC. La glycoprotéine VI (GPVI) plaquettaire est considérée comme une cible intéressante pour le développement de candidats médicaments antithrombotiques potentiellement plus sûrs. En effet, le ciblage de la GPVI prévient efficacement la thrombose expérimentale chez la souris, sans prolonger son temps de saignement. D'autre part, la GPVI n'est exprimée qu'au niveau des plaquettes et des mégacaryocytes, ce qui limite le risque d'effets secondaires lors de l'utilisation d'antagonistes de GPVI. Lors d'études réalisées précédemment dans notre laboratoire, nous avons montré qu'un anticorps anti-GPVI, inhibe la thrombose expérimentale de souris humanisées pour GPVI (hGPVI) sans prolonger le temps de saignement. Cet anticorps a été humanisé. Le but de ce projet est d'évaluer *ex vivo* et *in vivo* l'activité antithrombotique de cet anticorps dans différents modèles murins en vue de pouvoir l'utiliser dans des essais cliniques chez l'homme.

Réduction : La première expérimentation « Recherche de la dose efficace » sera clef pour les expérimentations suivantes. En effet, elle permettra de déterminer les 2 doses les plus efficaces qui seront ensuite utilisées dans les autres expérimentations. Cela permettra donc de limiter le nombre d'animaux pour les prochaines expérimentations. Le nombre d'animaux utilisés sera donc réduit au maximum, avec la contrainte d'obtenir une quantité de matériel suffisante pour chaque expérience, permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs (test de Mann-Whitney).

Raffinement : Un soin particulier a été apporté pour diminuer le stress et la douleur des animaux : • Hébergement dans des cages munies de copeaux de bois et enrichie avec un carré en coton compressé afin de permettre aux animaux de réaliser un nid conformément à leurs besoins comportementaux • Anesthésie de l'animal avant et pendant la durée de l'opération. • Installation de l'animal sur une plaque chauffée à 38°C afin lutter contre l'hypothermie. • Après l'injection retro-orbitale, injection d'un collyre anti-inflammatoire et apaisant. • Après expérimentation, mise à mort des souris par élongation des vertèbres cervicales sous anesthésie par vetflurane pour éviter toute angoisse et souffrance. Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.

Remplacement : Dans le cadre de cette étude, il est impossible de substituer la souris à d'autres modèles, puisque nous étudions le rôle d'un candidat médicament dans des fonctions physiopathologiques mettant en jeu des fonctions systémiques comme, le vaisseau, la pression artérielle, le flux, le sang et les cellules sanguines.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 276 souris.

2816. La conservation des espèces naturelles passe souvent par la nécessité de capturer et de marquer les individus sauvages afin de gérer au mieux les populations. En milieu aquatique, dont la gestion des ressources est étroitement liée à l'économie, un système très largement utilisé pour le marquage, est la pêche électrique. Ce procédé permet de capturer le poisson en minimisant les impacts visibles sur l'organisme et de le relâcher rapidement après avoir réalisé les mesures nécessaires. Cependant les conséquences physiologiques liées à l'utilisation de ce moyen de capture restent encore flous.

Dans le but de caractériser au mieux les effets de la pêche électrique, notre projet vise tout d'abord à déterminer à court terme, directement après un choc électrique, les impacts de ce choc sur la bioénergétique (utilisation et production d'énergie) de l'organisme entier (capacités locomotrices, métabolisme *in vivo*) jusqu'au niveau cellulaire (production et utilisation d'ATP par les mitochondries, étude du stress oxydatif). Par la suite, nous étudierons les effets à long terme d'une capture via la pêche

électrique, au niveau du succès de reproduction et de la qualité des descendants. Cette étude trans-générationnelle permettra de vérifier si cette technique n'entraîne pas un biais dans l'interprétation des données de conservation des populations. Dans un contexte expérimental et afin de ne pas impacter la biodiversité, nous allons utiliser des poissons-zèbre, espèce modèle en biologie, dans des conditions standards de stabulation, connues pour engendrer un minimum de stress. Pour réduire le stress de la stabulation, les poissons-zèbres étant une espèce grégaire, il seront donc gardés en groupe d'individu de 16 poissons à une température adaptée à leurs besoins physiologiques (27°C) Enfin à l'aide de tests statistiques de puissance a priori, nous avons comptabilisé au mieux le nombre de poissons nécessaires pour notre étude. Nous utiliserons donc au total 712 poissons sur 5 ans.

2817. Les gaines de myéline assurent la propagation rapide de l'influx nerveux le long des axones qu'elles entourent. La perte de myéline survient dans le cas de maladies démyélinisantes telles que la sclérose en plaques (SEP) mais aussi après traumatisme cérébral. La perte des gaines de myéline dans le cerveau et la moelle épinière provoque de graves troubles locomoteurs et de lourds handicaps.

Actuellement, aucune thérapie efficace n'est disponible.

Le projet que nous souhaitons mener vise à évaluer le potentiel thérapeutique d'un composé pharmacologique (l'étazolate), après une perte de myéline.

Pour cela, nous évaluerons différents paramètres de réparation de la myéline après administration de notre composé, suite à l'induction d'une démyélinisation.

La souris est le meilleur modèle animal permettant d'étudier les processus de démyélinisation.

Seule l'expérimentation in vivo, mimant le plus fidèlement possible ces processus de démyélinisation, nous permettra de proposer des stratégies thérapeutiques réparatrices ou protectrices.

Nous utiliserons un modèle de SEP déjà validé : les souris seront traitées par un agent demyelinisant pour induire une perte de myéline puis traitées par l'étazolate. Les capacités locomotrices des souris seront testées à différents moments du protocole. Enfin, les tissus d'intérêt (cerveau, cervelet) seront prélevés pour nos analyses, après mise à mort des animaux. Cette étude, prévue sur 5 ans, nécessitera au total 400 souris.

Le protocole expérimental a été judicieusement élaboré de façon à utiliser un nombre restreint d'animaux. Nous utiliserons des tests statistiques appropriés, afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables malgré le nombre limité de souris. Certains paramètres expérimentaux, tels que la dose d'étazolate à administrer, ont déjà été déterminés par d'autres projets et permettent de réduire le nombre d'animaux.

Nous envisageons l'administration d'antalgiques en cas de souffrance, et appliquerons des points limites (notamment mise à mort anticipée des souris en cas de souffrance majeure). Enfin, nous utiliserons également des méthodes in vitro (cellules en culture) en complément des études in vivo.

En conclusion, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes responsables des processus de perte myélinique. Ce projet permettra surtout d'étudier plus précisément les effets bénéfiques de notre composé étazolate et d'envisager son utilisation pour le traitement de patients atteints de SEP.

2818. De nos jours, les techniques de transfert embryonnaire sont largement utilisées dans la filière bovine pour l'amélioration génétique. Ces techniques qui consistent à produire plusieurs embryons simultanément chez une femelle donneuse pour les transférer dans l'utérus de femelles receveuses. Pour être efficaces, ces techniques nécessitent la production d'embryons de bonne qualité ainsi que d'un environnement utérin favorable au développement de l'embryon puis du fœtus. Aujourd'hui, la production d'embryons viables est très variable chez les donneuses et le taux de réussite après transfert de ces embryons varie de 30 à 70% en fonction des individus et du mode de production des embryons. Les techniques de transfert embryonnaire nécessitent donc d'être améliorées, notamment par la conduite des animaux. Le projet présenté a pour objectif de mettre au point une méthode de supplémentation alimentaire en acides gras de type oméga-3 de courte durée et d'étudier ses effets sur l'aptitude des femelles à conduire une gestation à terme après transfert. L'objectif de cette saisine est de réaliser le transfert chez 40 génisses Holstein receveuses d'embryons provenant de vaches supplémentées en oméga-3 ou en oméga-6 (témoin) selon un protocole croisé (transfert d'embryons produits sous oméga-3 ou non transférés dans des receveuses supplémentées en oméga-3 ou non, et inversement). Grâce à un suivi fin des femelles receveuses (prises de sang, échographies, collecte de fluide utérin), celles qui s'avéreront non gestantes (~20 avec un taux de gestation estimé à 50%) recevront un nouvel embryon. Huit jours après le second transfert, les embryons seront collectés par lavage non invasif de l'utérus et des biopsies de la muqueuse utérine seront également réalisées afin d'évaluer les effets de la supplémentation sur l'environnement utérin. Ce projet respecte la règle des 3R:

Remplacement: pour comprendre les effets d'un apport alimentaire enrichi en oméga-3, le recours à un protocole utilisant des bovins (espèce cible pour l'application potentielle en élevage) est nécessaire.

Réduction: le protocole expérimental permet de réduire au maximum le nombre d'individus utilisés en répétant les procédures expérimentales sur les mêmes individus. Etant donné le taux de gestation après transfert estimé de l'ordre de 50 %, 4 lots de 10 génisses sont nécessaires pour évaluer les effets de la supplémentation sur la qualité de l'embryon d'une part et sur l'environnement utérin d'autre part.

Raffinement : les génisses utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance quotidienne (activité, comportement) et hébergées dans une stabulation répondant aux normes de bien-être animal chez cette espèce (10m<sup>2</sup> par animal avec un accès aisé à l'auge et aux points d'abreuvements, présence de tapis caoutchouc derrière pour le confort des applombs, accès à des brosses latérales et dorsales...). De plus, des traitements anesthésiques locaux seront réalisés lors des biopsies d'endomètre.

Si les effets positifs de cette supplémentation alimentaire sont confirmés, elle constituera une pratique d'élevage simple à mettre en œuvre dans les élevages désireux d'optimiser les performances de reproduction de leurs femelles, notamment ceux faisant appel aux techniques de transfert embryonnaire.

2819. L'imagerie et la spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (NMRI et NMRS) sont des techniques utilisées depuis des décennies dans la recherche sur le muscle squelettique et cardiaque. Leurs caractères non-invasif et atraumatique en font des techniques de choix dans l'étude des lésions musculaires chez les patients atteints de pathologies neuromusculaires sans recourir à des biopsies, ainsi que chez les modèles animaux de ces pathologies. Un examen peut donc être répété plusieurs fois chez un même animal sans léser ce dernier, réduisant ainsi le nombre d'animaux nécessaires pour les projets. Enfin, l'imagerie et la spectroscopie par RMN étant non-invasives et de haute résolution, elles répondent au second R, raffinement, de la règle des 3R.

Ces techniques permettent le suivi longitudinal de l'évolution des pathologies, de même que l'étude de l'efficacité dans le cadre d'essais thérapeutiques chez des animaux, en respectant la règle des 3R.

Le muscle étant une structure très complexe, il n'existe pas actuellement de modèle *in vitro* pertinent. Le recours à des modèles animaux est donc indispensable pour son étude. Il existe plusieurs modèles animaux des pathologies neuromusculaires tels que des modèles murins, félins, canins. Les modèles animaux utilisés dans ce projet sont les modèles canins car leurs phénotypes présentent de fortes similitudes avec ceux observés chez l'homme (fibrose, cycles de dégénérescence/régénération des fibres musculaires, inflammation, atteinte cardiaque et respiratoire ...). Le modèle canin de la dystrophie de Duchenne, le Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD), est ainsi un modèle de référence dans les essais thérapeutiques pour la dystrophie de Duchenne.

Le projet soumis ici est un projet de type plateforme : les différentes procédures expérimentales décrites ci-dessous seront utilisées dans le cadre de différents projets scientifiques réalisés en collaboration avec d'autres équipes. Les demandes d'autorisation associées aux projets scientifiques utilisant les procédures décrites ici citeront alors la présente autorisation. Le nombre d'animaux, estimé à partir des projets impliquant des chiens au laboratoire ces 3 dernières années, demandés pour 5 ans est de 100.

2820. La compréhension des processus qui permettent le maintien du polymorphisme génétique en populations naturelles constitue un enjeu de recherche majeur en biologie évolutive. Chez les espèces animales, les comportements sociaux à base génétique peuvent faciliter l'évolution de polymorphismes corrélés de traits physiologiques, comportementaux et démographiques au sein d'une même population. En particulier, il a été proposé que le polymorphisme génétique de coloration, impliqué dans la signalisation et la communication visuelle, est souvent corrélé à des différences génétiques de comportement social qui favorise en retour son maintien par la sélection "fréquence-dépendante" (i.e., dépendante de la fréquence du génotype) entre différentes stratégies. Chez les lézards, les polymorphismes de couleur sont fréquents et la coloration caroténoïdique (jaune-orange) présenterait toutes les caractéristiques d'un trait génétique soumis à une sélection sociale, fréquence-dépendante. Toutefois, les travaux testant cette hypothèse par la manipulation de la fréquence des morphes de différentes couleurs et le calcul de leur succès darwinien (survie et reproduction des morphes) sont très rares. Nous nous proposons de mettre en évidence cette forme de sélection par la manipulation conjointe des ratios de morphes jaunes et oranges chez des mâles adultes et des femelles adultes du lézard vivipare (*Zootoca vivipara*) avec deux traitements expérimentaux par facteur (fréquence faible ou forte de chaque morphe). Décrite comme un polymorphisme génétique, cette différence de couleur est censée refléter la stratégie de compétition sociale chez les mâles et le mode de choix du partenaire chez les femelles. Les lézards seront relâchés dans des populations semi-naturelles (24 enclos, environ 20 lézards adultes et sub-adultes et 35 nouveaux-nés par enclos, soit  $n=1340$ ) dont le fonctionnement sera suivi pendant une année afin de quantifier la survie, la reproduction et la croissance de tous les individus. Par ailleurs, des suivis individuels par spectrophotométrie et des dosages sanguins de caroténoïdes seront effectués au cours du projet afin de caractériser une éventuelle plasticité de la coloration autour de sa moyenne génétique. Cette expérience permettra de tester pour la première fois l'hypothèse d'une sélection fréquence-dépendante sur la coloration caroténoïdique des mâles et des femelles de cette espèce. Cette expérience ne peut être remplacée par un modèle non expérimental, elle comprend un nombre réduit de populations (24 enclos soit 6 réplicats par traitement) dont les effectifs sont ceux à l'équilibre démographique en conditions naturelles, et elle utilise des procédures expérimentales faiblement invasives et optimisées pour réduire le stress chez le modèle d'étude.

2821. L'arthrose est une maladie articulaire dégénérative irréversible parfois très invalidante qui touche environ 10 à 15% des personnes de plus de 60 ans. D'ici 2050, on estime que 130 millions de personnes dans le monde souffriront d'arthrose. Bien qu'elle puisse aussi affecter les plus jeunes, sa prévalence augmente fortement avec l'âge (elle atteint environ 80 % des personnes de plus de 75 ans). L'impact socio-économique de cette maladie est conséquent puisque les coûts directs représentaient en France plus de 1,6 milliard d'euros en 2002, soit environ 1,7% des dépenses de l'assurance maladie. L'arthrose se caractérise par la dégradation progressive du cartilage articulaire mais touche également l'ensemble des tissus de l'articulation. Aux symptômes (douleur chronique, raideur, déformation articulaires) et au handicap fonctionnel peuvent s'ajouter de lourdes séquelles psychologiques et une baisse de la qualité de vie. Les lésions ligamentaires du genou constituent une cause importante d'arthrose du genou. Elles surviennent en particulier dans la pratique des sports de pivot (ski, tennis, basket) avec une atteinte préférentielle du ligament croisé antérieur (LCA). Selon la Société Française d'Arthroscopie en 2001, l'incidence de rupture du LCA dans la population générale est estimée à 2/1000 habitants par an soit

25000 ruptures L'effet des ruptures du LCA sur la cinématique du genou est important avec à court terme l'apparition d'une instabilité responsable de lésions méniscales et cartilagineuses et à long terme l'apparition d'une arthrose à 10ans. L'intervention chirurgicale est recommandée en particulier chez les sujets jeunes et sportifs. 15000 patients nécessitent ainsi une intervention chirurgicale par ligamentoplastie chaque année en France.

Actuellement, le traitement chirurgical de référence des ruptures du LCA repose sur le remplacement du ligament lésé par un autogreffe (utilisation d'un tendon ou d'un ligament du patient : technique de Kenneth-Jones ou technique dite du DIDT). Aucun greffon n'a actuellement prouvé sa supériorité dans la reconstruction du LCA avec globalement un pourcentage de succès allant de 75% à 90% à long terme selon les auteurs. Le taux d'échecs est de l'ordre de 20%, comprenant la persistance d'une instabilité, de douleurs, expliquées par le prélèvement de la greffe ou par une greffe incompetente pouvant nécessiter une nouvelle reconstruction. Enfin des tentatives de mise au point de ligaments artificiels n'ont pas montré de succès (ruptures du ligament artificiel avec instabilité, inflammation synoviales liée au débris d'usure).

Ce projet vise à évaluer un ligament artificiel original à base de fibres d'hydrogel implanté sous arthroscopie chez la brebis. Nous comparerons la réaction inflammatoire générée de l'articulation, et la stabilité de l'articulation sur des animaux ayant subi un remplacement du LCA soit par une autogreffe (tendon fléchisseur superficiel des doigts) soit par le ligament artificiel testé. Cette évaluation ne peut se faire que chez l'animal, car elle nécessite une articulation entière. Le modèle expérimental retenu est un modèle chirurgical par rupture du LCA chez la brebis, car il est adapté pour notre étude (le LCA de la brebis est très proche de celui de l'Homme) et bien décrit dans la littérature.

Vingt quatre animaux seront utilisés, ce qui est le minimum indispensable pour une interprétation statistique des données et qui tient compte de la faible probabilité de perte d'un animal (procédure chirurgicale bien tolérée) et de la variabilité limitée des réponses. Les interventions chirurgicales seront réalisées par un chirurgien orthopédiste et des vétérinaires. Les animaux recevront systématiquement un traitement anti-douleur avant, pendant et après (2jours) l'opération. Des soins post-opératoires adaptés à l'espèce seront mis en place afin d'assurer un rétablissement rapide. Durant toute l'étude les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans des conditions qui dans notre expérience génèrent le minimum de stress. La mise à mort des animaux sera effectuée conformément aux bonnes pratiques relatives à l'espèce (injection léthale intraveineuse) et les tissus explantés seront exploités.

2822. L'illumination nocturne, due au développement continu des villes et des réseaux routiers, a augmenté de façon spectaculaire dans de nombreuses parties du monde (les 2/3 de la population mondiale vivraient dans des zones au-delà du seuil de pollution lumineuse). Bien que de nombreux travaux aient étudié les effets de la lumière sur les organismes, leur pertinence en conditions naturelles est souvent faible car les intensités et les spectres lumineux ne sont pas réalistes. Le projet proposé a pour but de déterminer l'impact de la pollution lumineuse nocturne sur une espèce d'amphibien présente en Rhône-Alpes dans des milieux à la fois urbains et ruraux, le crapaud commun (*Bufo bufo*). Des crapauds mâles adultes seront exposés pendant la période de reproduction (fin février - mars selon les conditions météo) à des luminosités nocturnes de différentes intensités. Le stress des animaux sera évalué par dosage de la corticostérone salivaire (prélèvements salivaires à l'aide d'un coton introduit dans la bouche) et l'impact de la pollution lumineuse sur le statut immunitaire des animaux sera mesuré par une méthode faiblement invasive (injection de PHA dans la patte et mesure du gonflement inflammatoire). Cette étude sera réalisée sur 90 animaux qui seront relâchés à la fin de l'expérimentation. L'étude doit permettre de mieux sensibiliser les acteurs impliqués dans l'aménagement du territoire dans la prise en compte de la pollution lumineuse.

2823. La dégénérescence valvulaire est responsable d'une sténose aortique chez le sujet âgé. Cette pathologie peut conduire à terme à une insuffisance cardiaque. Jusqu'à présent, le traitement de référence était le remplacement valvulaire par voie chirurgicale consistant en une excision de la valve native avec mise en d'une prothèse valvulaire (essentiellement une bioprothèse du fait de l'âge avancé des patients). Pour les patients ayant un risque chirurgical élevé, le traitement peut consister en la mise en place par voie percutanée d'un nouveau type de bioprothèse : les stents valvés. Ce sont des « bioprothèses » constituées de 3 feuillets de péricarde bovin ou porcin, montés sur un stent. Les stents sont des structures tubulaires, maillées et métalliques.

Ces prothèses sont comprimées (sertissage), insérées dans un cathéter pour être délivrées via l'artère fémorale au niveau de l'anneau aortique. La prothèse est déployée à l'intérieur de la valve aortique sténosée, soit par inflation d'un ballonnet sur lequel elle est sertie soit par retrait de la gaine du cathéter si le stent est auto-expansible.

Une différence essentielle entre les bioprothèses chirurgicales et percutanées est la création obligatoire d'un « traumatisme des feuillets » lors de l'utilisation de ces dernières (sertissage et déploiement). Ce traumatisme a été objectivé dans plusieurs travaux surtout expérimentaux. Les conséquences d'un tel traumatisme, qui altère la structure du péricarde, sur le risque de calcification in-vivo à long terme, ne sont pas encore connues. Cependant, des observations de calcifications prothétiques précoces chez des sujets très âgés (le risque de calcification valvulaire est connu pour être extrêmement faible en cas d'âge avancé) suggèrent un risque de détérioration plus élevé avec les bioprothèses percutanées. Le but de notre travail est d'étudier dans un premier temps le risque de calcification prématurée de bioprothèses percutanées. Pour cela, nous comptons utiliser un modèle expérimental classique pour l'étude des dégénérescences des feuillets péricardiques utilisés dans la construction des bioprothèses.

Pour la réalisation de ce projet, des échantillons (disques péricardiques de 6mm de diamètre) issus de prothèses d'origine bovine serties et non serties seront implantés dans les muscles paravertébraux de lapins pendant un maximum de 75 jours. Le contenu en calcium des disques sera mesuré après explantation des échantillons. Chaque lapin recevra 8 disques (4 disques issus de prothèses comprimées et 4 autres issus de prothèses non comprimées) et ce projet utilisera au total 10 lapins.

L'implantation intramusculaire chez le lapin est un modèle de référence pour les essais portant sur la calcification des biomatériaux. Ce type de test de biocompatibilité ne peut être remplacé par des études ex vivo à la fois pour des raisons scientifiques liées à la complexité des réactions tissulaires impliquées et pour des raisons réglementaires qui imposent ce type d'essais. En implantant plusieurs échantillons chez le même animal, nous réduisons drastiquement le nombre d'animaux utilisés en mettant en œuvre des tests statistiques sur des échantillons appariés. Bien que ce type d'intervention n'ait habituellement que peu de conséquences chez l'animal, nous mettons en œuvre un traitement antalgique préventif post-opératoire.

2824. Le myélome est un cancer de la moelle osseuse. Les cellules cancéreuses, dites plasmocytaires, prolifèrent et altèrent l'os environnant. Elles augmentent la destruction osseuse et inhibent sa reconstruction. Les traitements anticancéreux éliminent les cellules plasmocytaires cancéreuses mais ne corrigent pas les lésions osseuses.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) sont à l'origine de l'ostéogénèse qui permet la reconstruction osseuse. Les deux sources principales de CSMs sont la moelle osseuse et le tissu adipeux. Dans le myélome, les CSMs d'origine médullaires sont très altérées et inutilisables. Par contre, les CSMs issues du tissu adipeux pourraient être saines et pourraient permettre une reconstruction osseuse. C'est l'objectif de ce projet : montrer dans un modèle murin que les CSMs adipeuses issues de patients ayant un myélome sont capables de fabriquer de l'os. Si c'est le cas, nous pourrions envisager une thérapie cellulaire à partir de ces cellules pour corriger les lésions osseuses des patients atteints de myélome. Des greffes simples et faiblement invasives, de biomatériaux (type matrice osseuse Puros®) associés aux CSMs adipeuses, seront réalisées en sous cutanées chez la souris sous anesthésie générale. Cette technique est couramment utilisée et aucune mortalité, ni souffrance, n'a été observée chez les animaux suite à ce type de greffe.

Type d'animaux : Souris SCID

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de projet. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu. La souris est une espèce génétiquement proche de l'Homme. La disponibilité de souches génétiquement modifiées notamment les souris immunodéprimées est utiles lors des greffes de cellules humaines, afin d'éviter le risque de rejet du greffon (cellules humaines) par le hôte (murin).

Réduction : Dans le cadre de ce projet nous utiliserons 62 souris réparties en 3 groupes. Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. La formation osseuse ectopique murine est un bon modèle pour évaluer la fonctionnalité des cellules étudiées. Afin de diminuer le nombre d'animaux, 6 implants de petites tailles seront greffés par souris.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

Pour le bien-être des souris, celles-ci resteront en groupe dans un milieu enrichi et seront régulièrement surveillées. Si un animal montre des signes de mal être, les dispositions adéquates à la situation seront prises comme la prise d'analgésique en cas de douleur.

2825. Le projet de thérapie cellulaire, réalisé dans un cadre réglementaire, a comme objectif de permettre l'évaluation du potentiel toxique et/ou tumorigénique de produits de thérapie cellulaire, ainsi que la biodistribution de ce produit après administration unique ou répétée.

Le projet consiste en l'injection ou la greffe de cellules (humaines sur des animaux immunodéficients) ou murines (si un homologue a pu être créé, sur souris immunocompétentes) afin d'évaluer la toxicité potentielle, le potentiel tumoral et la biodistribution du produit. Les administrations de produit de thérapie cellulaire sont à faire selon la voie envisagée chez l'homme. Il peut s'agir d'une voie parentérale classique (intraveineuse, intra-artérielle, intra-musculaire, sous-cutanée, intra-péritonéale), mais aussi de toute voie nécessitant un acte chirurgical préalable (tel que la greffe de cellules ensemencées sur une matrice ou l'injection dans la veine porte hépatique, dans le foie, le cœur ou dans tout autre organe cible selon l'indication du traitement chez l'homme).

Les animaux sont observés pendant 1 semaine à 6 mois voire 12 mois suivant l'administration selon la nature du produit testé.

Une phase décisive de l'évaluation d'une thérapie cellulaire passe par la recherche des effets toxiques suite à l'administration des cellules. Comme il faut étudier la façon dont elles vont se comporter dans l'organisme, cette phase ne peut pas être réalisée in-vitro. Les effets toxiques peuvent résulter de l'interaction des cellules injectées avec d'autres cellules ou tissus, ou de la sécrétion de médiateurs par ces cellules : il est donc nécessaire de mettre le produit de thérapie cellulaire en contact avec un organisme complexe, vivant. Il en est de même pour l'évaluation du potentiel tumorigénique des cellules et pour leur biodistribution dans l'organisme.

En l'absence de modèle in vitro disponible, la souris sera le modèle animal privilégié (toutes souches, y compris animaux transgéniques, immunodéficients ou autres mutants). C'est l'espèce privilégiée par les autorités réglementaires pour ce type de projets.

Le nombre d'animaux utilisés est déterminé a minima de façon à obtenir des résultats suffisamment robustes d'un point de vue statistique et ainsi atteindre tous les objectifs de l'étude en procédant à toutes les analyses nécessaires sur un nombre d'animaux optimisés pour évaluer la biodistribution et/ou la tumorigénicité (histopathologiques, biomarqueurs, génomiques...).

Nombre d'animaux pour une période de 5 ans: 1900

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages conformes à la Directive 2010/63. Au cas où une intervention invasive ne peut être évitée pour administrer le produit cellulaire (via une chirurgie), les animaux pourront être prémédiqués et suivis de façon à minimiser les douleurs éventuelles. En général, ils sont ensuite hébergés individuellement (dans des cages ventilées ou non) avec de l'enrichissement pour réduire l'inconfort potentiel. Des soins adéquats sont essentiels pour minimiser/effacer le stress et ainsi ne pas interférer avec le devenir des cellules injectées. 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.

2826. L'infection chronique par les virus de l'hépatite B (VHB) et C (VHC) sont associées fréquemment à des réponses immunitaires inefficaces et à une réponse inflammatoire conduisant à une fibrose puis une cirrhose, voire chez certains patients à un carcinome hépatocellulaire (CHC). Le CHC est le cancer du foie le plus fréquent. Il est le 5<sup>e</sup> cancer le plus fréquent et représente la 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> cause de mortalité par cancer dans le monde. Les options thérapeutiques du CHC sont limitées et il n'existe pas de méthode préventive du CHC. Le blocage par certains anticorps des récepteurs impliqués dans l'entrée du virus dans sa cellule cible, l'hépatocyte (cellule du foie), peut non seulement prévenir, mais aussi guérir une infection chronique par le VHC. Nous posons l'hypothèse qu'un traitement avec un anticorps anti-récepteur pourrait prévenir voire renverser, le développement d'une fibrose ou d'une cirrhose hépatique, de façon indépendante du blocage de l'infection par le VHC proprement dite et selon des mécanismes pouvant impliquer des mécanismes communs à différentes étiologies du CHC (abus d'alcool, infection par VHC ou par VHB). Nous proposons donc, dans un modèle de foie fibrotique et cirrhotique conduisant éventuellement à un CHC, de vérifier sur 120 souris C3H/HeNRj l'effet protecteur d'un anticorps anti-récepteur administré de façon hebdomadaire, soit lors de l'induction de la fibrose par injection unique d'un agent hépatotoxique (protocole préventif, 18 semaines de traitement), soit après induction de fibrose (protocole thérapeutique, 5 semaines de traitement). Les paramètres analysés en fin d'expérience seront : le profil transcriptomique et protéomique du foie, l'analyse histologique du foie et la mesure des taux sériques de marqueurs d'inflammation et/ou de souffrance hépatique (ASAT, ALAT, LDH...).

REGLE DES 3 R :

REPLACER : La fibrose et la cirrhose résultant d'interactions complexes entre de multiples types cellulaires, il n'est pas possible de reproduire in vitro ces pathologies hépatiques, ce qui implique l'utilisation de modèles animaux.

REDUIRE : Le monitoring de la progression des lésions hépatiques par imagerie non invasive (imagerie par résonance magnétique) permettra de limiter le nombre d'animaux utilisés, en évitant de mettre à mort des animaux au cours de l'expérience en vue de réaliser des analyses histologiques.

RAFFINER : L'expérience sera arrêtée 20 semaines après administration de DENA, c'est à dire avant le temps minimum pour permettre l'apparition de tumeurs, qui est de l'ordre de 30 à 50 semaines.

2827. Dans une population non régulée par la densité-dépendance, la structure d'âge d'une population est censée converger vers un équilibre déterminé par les survies des différentes classes d'âge et par la distribution de la reproduction entre les différentes classes d'âge d'adulte. Toutefois, quand la population est soumise à une régulation via la compétition pour les ressources, la structure d'âge peut suivre, en fonction de la nature de la compétition entre les différentes classes d'âge, des dynamiques qui varient entre la stabilité et des cycles de cohortes. Une bonne compréhension de ces asymétries compétitives entre classes d'âge nécessite des expériences de perturbation de la structure d'âge qui sont complémentaires de travaux de modélisation et qui ont rarement été entreprises en populations naturelles. Ce projet vise à combler cette lacune en se focalisant sur la quantification des mécanismes de régulation de la structure d'âge chez une espèce de lézard (lézard vivipare) caractérisée par des dynamiques fortement régulées par la densité-dépendance impliquant des asymétries compétitives liées à la taille des individus. Les expériences seront conduites dans de grands enclos expérimentaux où les animaux sont hébergés en groupe et impliqueront un minimum de protocoles expérimentaux nécessaires pour le marquage des individus et pour des évaluations de leur condition physiologique via des prélèvements sanguins selon des protocoles raffinés pour cette espèce. Les effectifs manipulés seront choisis pour refléter la densité et les structure de sexe proches de l'équilibre dans 24 enclos expérimentaux afin de réduire les échantillons d'animaux, soit 20 adultes et 45 nouveaux-nés par enclos (n=1560). Une perturbation de la structure d'âge de la population en terme de ratio des sub-adultes par rapport aux adultes sera appliquée avec trois niveaux expérimentaux (faible, normal et élevé). Une expérience sur deux années permettra de quantifier la dynamique de deux cycles de reproduction.

2828. Une allergie alimentaire est une réaction exagérée du système immunitaire vis-à-vis d'un aliment, en principe sans danger pour l'homme. Dans la plupart des cas, l'allergie s'exprime dans les minutes qui suivent l'exposition. Elle se présente sous différentes formes : digestive, cutanée, respiratoire. Sa forme la plus grave appelée choc anaphylactique débute souvent par une sensation de malaise, avec démangeaisons et gêne respiratoire. Sans intervention médicale immédiate, il peut survenir une perte de connaissance associée à une chute de tension pouvant aller jusqu'à l'arrêt cardiaque. Les aliments impliqués dépendent des habitudes de consommation et de l'âge des patients. Le lait est le premier aliment incriminé chez

l'enfant. L'allergie au lait de vache est très fréquente (5 à 6 % des enfants en France) et guérit spontanément dans la majorité des cas vers 3 ans.

Pour les patients non guéris, la seule solution face au risque vital est l'éviction stricte des aliments contenant du lait. Mais respecter ce type de régime est très contraignant car le lait est extrêmement utilisé dans notre alimentation courante.

Les grands groupes industriels du lait commercialisent des laits dits hypoallergéniques dans lesquels les protéines ont été hydrolysées afin de réduire l'allergénicité de la préparation. Cependant, certains enfants présentent toujours des symptômes allergiques suite à l'ingestion de ces laits suggérant une allergénicité résiduelle de ces préparations. De plus, de nombreux enfants se détournent des laits hypoallergéniques à cause de leurs propriétés organoleptiques désagréables.

Notre projet vise à déterminer la nature des facteurs allergisants d'un lactosérum afin de les retirer du lait pour obtenir un lait hypoallergénique tout en conservant ses qualités nutritionnelles et organoleptiques.

Pour cette étude d'une durée de 5 ans, un maximum de 576 souris Balb/C femelles âgées de 4 semaines au début du protocole seront utilisées et divisées en groupes de 8 souris. Différents paramètres seront étudiés durant cette étude : la voie de sensibilisation (intra-péritonéale ou orale), trois fractions du lactosérum (+ un groupe de souris témoin) et trois doses (3,5 mg, 150 µg ou 50 µg de protéines). Les expérimentations qui auront donné de bons résultats seront renouvelées deux fois afin de confirmer les résultats.

Les souris seront sensibilisées au lactosérum ou aux différentes fractions du lactosérum par 1 injection intragastrique ou intra-péritonéale par semaine pendant 6 semaines. La sensibilisation des animaux sera vérifiée par deux méthodes : un test MEST (Mouse Ear Swelling Test, équivalent du Prick Test humain) et un test de provocation allergique. Le test MEST consiste en une mesure de l'épaisseur de l'oreille avant et après injection intradermique du produit de sensibilisation. Lors de la provocation allergique, les souris reçoivent une injection intra-péritonéale du produit de sensibilisation et les signes cliniques d'une allergie (baisse de fréquence respiratoire, baisse de température corporelle, symptômes cliniques) sont suivis pendant une heure. La présence d'IgE sériques dirigées contre le produit de sensibilisation est mise en évidence par un test in vitro (ELISA) suite à des prélèvements de sang à différents temps du protocole (J0, J20, J35, J42 voire J54, J71, J97). L'ensemble de ces tests permettra de savoir si les souris ont développé une allergie contre le produit de sensibilisation et si elles possèdent des taux significatifs d'IgE sériques fonctionnelles contre ce produit.

Une surveillance quotidienne des souris sera effectuée. Elles seront maintenues dans un cycle jour-nuit de 12 heures à une température de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  et une hygrométrie de  $55 \pm 20\%$ . Elles disposeront de nourriture et d'eau ad libitum.

A la fin de l'étude ou si l'un des points limites est atteint (cachexie, affaiblissement, prostration, difficulté à se mouvoir ou à manger, hypothermie irréversible), les souris seront mises à mort selon une méthode réglementaire.

En fonction des résultats d'une étude prévue en février 2016 sur l'impact de l'enrichissement, le milieu des souris sera enrichi. De plus, tout sera mis en œuvre afin d'éviter toute souffrance ou détresse animale (Raffinement). Notre étude statistique nous indique qu'utiliser des groupes de 8 souris est nécessaire et suffisant (Réduction). Le dosage d'anticorps est possible in vitro mais cette technique ne renseigne que sur la quantité et non sur la fonctionnalité de ces anticorps vis-à-vis de l'allergène défini (Remplacement).

2829. Jusqu'à 20 % des femmes enceintes sont confrontées durant leur grossesse à de troubles de l'humeur telle que la dépression. Les traitements le plus populaire contre la dépression maternelle sont les antidépresseurs de la famille des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) et 5-10 % des femmes enceintes sont traitées par ces médicaments. Des recherches récentes démontrent que le traitement par ISRS pendant la grossesse peut modifier de manière significative le comportement chez les nouveaux nés et les enfants, sans malheureusement avoir un effet thérapeutique chez les mères. Par ailleurs, il reste de nombreuses questions quant aux implications à long terme d'une exposition indirecte à ces antidépresseurs durant la grossesse et l'allaitement pour le développement des enfants. L'objectif de ce travail est de déterminer l'effet de l'exposition périnatale aux ISRS sur les paramètres neurobiologiques de la mère et de sa progéniture, en utilisant un modèle de stress et de dépression maternelle chez le rat.

De nombreuses études ont montré que l'exposition périnatale aux ISRS peut contrecarrer le développement normal des comportements sociaux chez les enfants : des enfants de 4 ans qui ont précédemment été exposés de manière prénatale aux ISRS montrent plus de comportements d'externalisation (agression, attention et hyperactivité, et comportement de défiance) ainsi qu'une augmentation des comportements d'internalisation (dépression, anxiété,...). De plus, des études épidémiologiques suggèrent très fortement que l'exposition périnatale aux ISRS augmente la probabilité de développer des traits autistiques. Chez les modèles animaux, le traitement postnatal aux ISRS diminuent le comportement de jeux chez les juvéniles et affecte les comportements de reproductions. La trajectoire développementale de ces effets et les cibles physiologiques des différents types de médication restent cependant à déterminer.

Le but de notre projet est de déterminer comment l'exposition périnatale à deux ISRS les plus couramment utilisés, fluoxétine (Prozac) et sertraline (Zoloft) sont capables d'affecter de façon spécifique le développement des interactions sociales, y compris les comportements de reproduction, et les paramètres neurobiologiques sous-jacents chez la descendance mâle et femelle rat, en utilisant un modèle de stress maternel et de dépression.

Cette étude dépend de processus très clairement liés à la présence du placenta et des interactions complexes entre le fœtus et la mère, raison pour laquelle des études in vivo à l'échelle de l'organisme entier sont inévitables (Remplacement). Un total de 36 rattes gestantes de souche Sprague Dawley seront utilisées. Elles seront réparties en 6 groupes 1. Control (pas de stress, pas de ISRS), 2. Stress (pas de ISRS), 3. Fluoxetine, 4. Stress+Fluoxetine, 5. Sertraline, and 6. Stress+Sertraline. Une dose de de 10mg/kg/jour sera administrée aux mères gestantes, sur base des doses administrées chez les femmes durant leur gestation. Le traitement sera administré via un biscuit vanillé contenant l'ISRS ou son solvant durant la grossesse et durant la

l'allaitement, jusqu'au moment du sevrage. Ce type de traitement mime la situation clinique chez les humains (traitement oral) et surtout élimine le stress potentiel de l'administration chez la mère (Raffinement). Ces doses utilisées pour les ISRS ne sont pas toxiques et ne provoquent pas de malformation chez les nouveau-nés. Dans le cas très improbable de souffrance d'un individu au cours de la procédure expérimentale, les mesures appropriées de réduction de la douleur seront employées. Afin de réduire le nombre de rats requis, cette étude se déroulera en 2 phases, en utilisant tous les animaux nés lors des traitements (Réduction). Nous estimons que 360 nouveau-nés seront utilisés au cours des différentes procédures. Nous étudierons les comportements de jeux juvéniles et les interactions sociales, y compris comportement de reproductions chez l'adulte. Nous nous attacherons également à définir les mécanismes neurobiologiques associés aux changements de comportements. Ses études seront réalisées chez la descendance mâle et femelle, car des travaux précédents ont démontré des effets différentiels des ISRS sur les 2 sexes. Cette étude utilisera donc un total de 492 rats (y compris stimulus sociaux) sur une durée 5 années. Cette étude devrait nous permettre d'améliorer nos connaissances sur les risques et bénéfices de l'utilisation de la fluoxétine et sertraline dans le traitement de la dépression maternelle durant la période périnatale.

2830. Dans les dernières années notre laboratoire travaille sur l'hypothèse que certains agents chimiothérapeutiques efficaces peuvent induire un certain type de stress des cellules tumorales et sa mort qui est immunogénique (ICD, de l'anglaise « Immunogenic cell death »), ce qui signifie que les cellules cancéreuses mourantes d'un patient peuvent servir comme un vaccin qui stimule une réponse immunitaire spécifique anti-tumorale, qui serait capable de contrôler (et parfois même éliminer) les cellules cancéreuses résiduelles (souches). Ce nouveau concept remet en cause la croyance antérieure selon laquelle les différents traitements chimiothérapeutiques anticancéreux uniquement ciblent les cellules tumorales, sans aucune participation significative du système immunitaire de l'hôte. Nous postulons que l'ICD survenant in vivo doit conduire à une réponse immunitaire significative locale (avec un afflux des effecteurs innés et lymphocytaires du système immunitaire dans la tumeur) et conduire à une réduction de la croissance tumorale que dépend (au moins en partie) de la contribution du système immunitaire.

La mort immunogénique est caractérisée par l'induction de l'apoptose (processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal), l'autophagie (un mécanisme permettant à la cellule de digérer une partie de son contenu), le stress du réticulum endoplasmique (RE, état de la cellule causé par l'accumulation de protéines de conformation anormale), la libération d'ATP, et l'exposition de la calréticuline (CALR) une protéine reconnue par le système immunitaire lorsqu'elle est exprimée à la membrane plasmique).

Ce projet vise à optimiser de possibles immunothérapies anticancéreuses en modulant la réponse du système immunitaire moyennant des cellules inductibles pour chacune des caractéristiques de l'ICD ou certaines caractéristiques en combinaison. Ce qui pourrait nous permettre d'identifier, a posteriori, différentes drogues ayant le même effet que les cellules inductibles.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales sur des animaux vivants, plus particulièrement la souris. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire ex-vivo du fait de sa complexité.

Ce projet se déroulera sur plusieurs années, et il nécessitera 1280 souris.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. D'une part, car elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. L'objectif final de ce projet est de trouver le moyen de rétablir la réponse immunitaire associée à la chimiothérapie anticancéreuse. Pour cette raison, nous avons besoin de réaliser des expériences in vivo chez des souris immunocompétentes et immunodéficientes afin de pouvoir confirmer nos données obtenues in vitro. En effet, l'étude du rétablissement de la totalité de la réponse immunitaire ne peut se faire que dans des organismes entiers. Les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Les nombres de souris par lot ont été calculés par des méthodes de calcul de puissance (avec un seuil de 5% et une puissance de 90%). Les tests statistiques utilisés seront principalement des suivis longitudinaux (e. g. inférence linéaire sur le log de la taille des tumeurs). En cas de croissance tumorale atypique (comme pour les cas de régression tumorale), nous utiliserons aussi des tests à des temps donnés (e.g. t-test, chi2, etc.). Enfin, nous pourrions utiliser moins de souris si nous trouvons une significativité avec moins de souris. Les animaux recevront une alimentation adaptée à leur condition (alimentation enrichie, accès très facile, digestibilité importante) dès apparition des signes modélisant la carcinogénèse.

2831. Lors de l'analyse transcriptomique entre des malades atteints de la maladie d'Alzheimer et des contrôles, certains gènes différentiellement exprimés ont été mis en évidence. Ces travaux ont été réalisés dans une unité de recherche. Nous nous sommes particulièrement intéressés au gène Adam30. Des études in vitro ont montré qu'Adam30 agit sur le métabolisme de l'APP. Le gène Adam30 code pour une métalloprotéine. L'action d'Adam30 sur le métabolisme de l'APP est directement liée à son site catalytique. En effet des mutations ponctuelles inactivant le site catalytique annulent l'influence d'Adam30 sur le métabolisme de l'APP. Les techniques de culture cellulaire utilisant des cellules cancéreuses neuronales nous ont permis dans un premier temps de définir le rôle d'Adam30 sur le métabolisme de l'APP (diminution d'Abeta40 et d'Abeta42). Nos précédentes études in vivo ont confirmé une diminution des plaques amyloïdes, et également une diminution d'Abeta40 et 42 sur des souris sur exprimant Adam30 dans un modèle Alzheimer. Lorsque la forme mutée d'Adam30 est surexprimée, nous observons aucune variation des paramètres (plaque amyloïdes, Abeta 40 et Abeta 42) chez la souris. Des facteurs environnementaux (régime riche en matière grasse, exercice physique,..) interviennent sur le développement de la maladie d'Alzheimer et le métabolisme de l'APP. Aussi nous voulons dans un premier temps déterminer si l'effet bénéfique d'Adam30 se retrouve lorsque les souris sont soumises à un régime riche en matière grasse. Cette étude sera alors réalisée à deux temps 6-7 mois et 10 -11 mois et portera sur 700 souris.

Pour la mise en place de ce projet nous respecterons la règle des 3rs.

Ainsi pour réduire et étudier l'influence du métabolisme sur la maladie d'Alzheimer nous travaillerons sur les 2 sexes. Pour la réalisation de cette étude longitudinale et afin de réduire le stress et l'angoisse chez nos animaux, les procédures seront espacées d'une phase de repos de 3 à 7 jours selon la procédure suivante à effectuer. Notre projet implique de travailler sur des animaux âgés (10 mois) avec ou non un traitement "high fat". Aussi, afin que ces derniers est plus de place dans la cage nous mettrons une souris en moins soit 5 souris par cage. Pour toute procédure invasive ou terminale nous utilisons des anesthésiques afin d'éviter toute douleur inutile aux animaux. Lors de la réalisation de certaines procédures (notamment la glycémie) les animaux sont préalablement entraînés afin de réduire le nombre de prélèvement à réaliser par animaux. Chaque procédure impliquée dans ce projet a un point limite défini au préalable afin d'éviter toute souffrance inutile aux animaux. Les animaux inclus dans ce projet sont observés régulièrement afin de vérifier l'absence de signes de souffrances (perte de poids, piloérection, dos rond, démarche anormale, pâleurs des extrémités, automutilation, isolement, léthargie, vocalisation anormale).

2832. Le diabète de type 1 représente environ 10% des cas de diabète. L'incidence de ce type de diabète ne cesse de progresser dans tous les pays du monde au rythme de 3 à 4 % par an depuis une vingtaine d'années. Cette maladie apparaît le plus souvent durant l'enfance ou l'adolescence. Au tout début, le diabète de type 1 ne provoque aucun symptôme. La maladie ne devient apparente qu'au moment où 80 à 90 % des cellules pancréatiques productrices d'insuline sont déjà détruites. Les personnes atteintes présentent de multiples complications liées au diabète : néphropathies, maladies cardiovasculaires, problèmes de vision, etc. Toutes ces pathologies ont aujourd'hui des causes et des liens communs : diabète, syndromes métaboliques, épisodes d'hyperglycémie et d'hypoglycémie, acidocétose, etc. La nécessité d'étudier la progression et la thérapeutique de la pathologie diabétique a suscité l'élaboration de nombreux modèles expérimentaux, dont murins. Parmi ces modèles, l'injection de streptozotocine à des nouveau-nés va induire le développement d'un diabète par la destruction des îlots de Langerhans dans le pancréas responsables de la production de l'insuline, amenant les complications associées. L'enjeu est d'identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la pathologie diabétique et d'en déduire les stratégies thérapeutiques les plus efficaces pour freiner, voire stopper la progression de cette pathologie. Ne pouvant étudier les conséquences d'un développement de la pathologie diabétique dans un système de culture cellulaire, les modèles animaux rongeurs sont un outil de référence pour l'étude des mécanismes impliqués dans le diabète. Dans cette étude, 200 souriceaux par an seront soumis à l'injection de streptozotocine à l'âge de 2 jours pour développer un diabète soit 1000 souriceaux pour ce projet. La règle des 3R est appliquée ici pour les principes de réduction et de raffinement. Les souriceaux seront hébergés par portée avec leur mère (1 femelle avec portée par cage) dans des cages contenant de l'enrichissement (bandes de papier kraft brun non blanchi afin d'en faire un nid). De plus, une surveillance et une observation des animaux seront réalisés quotidiennement pour détecter et traiter éventuellement tout signe de douleur. Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la structure bien-être animal.

2833. La prophylaxie ou le traitement de maladies dues à certaines infections virales est réalisée grâce à la vaccination. Les vaccins, et plus particulièrement les souches de virus utilisées pour leur fabrication, doivent être testés pour en garantir l'innocuité et la qualité avant d'être administrés à l'homme.

Pour chaque nouvelle souche de virus (ou nouveau lot d'une souche) destinée à la production de vaccin vivant atténué, lorsque ces virus ont un tropisme nerveux, les autorités demandent de s'assurer de l'absence de neurovirulence résiduelle chez le primate, avant la première administration chez l'homme. Les lignes directrices imposent l'utilisation du macaque; les tests ne sont pas recevables s'ils sont réalisés dans une autre espèce.

Ce projet se résume en l'administration unique d'une souche vaccinale (virus atténué) chez le singe par injection dans une zone du cerveau, thalamique, lombaire ou toute autre voie spécifique spécifiée dans les lignes directrices.

Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet peut être estimé à un total de 150 singes sur 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est déterminé à minima sur base des recommandations de l'Organisation mondiale de la santé (WHO) et des Pharmacopées (Pharmacopée européenne ou texte équivalent d'autres pays hors UE) afin d'obtenir des résultats représentatifs et exploitables statistiquement le cas échéant. Ainsi, un nombre d'animaux optimisé est utilisé pour évaluer la neurovirulence, l'immunogénité et/ou le tropisme viscéral, sur base des scores cliniques obtenus lors d'examen de l'état général et d'examen détaillé neurologique, des éventuels examens sanguins et surtout des scores lésionnels à l'examen post-mortem des différentes zones du cerveau.

L'administration de la souche vaccinale est réalisée sous anesthésie générale pour permettre une injection en toute sécurité et sans douleur. Une étroite surveillance des animaux est réalisée (contrôles au-moins biquotidien), et des soins adéquats (analgésie) sont appliqués pour éviter l'inconfort et la douleur éventuelle en post-traitement.

L'état de santé des animaux est évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. En particulier, en raison du site de l'administration et du possible tropisme nerveux des virus, les éventuels effets sur le système nerveux central pouvant avoir un impact sur la consommation de nourriture, le comportement ou induisant des tremblements, amaurose, convulsions ou troubles loco-moteurs sont vérifiés et objectivés avec des scores. Les points limites sont donc principalement basés sur l'obtention de scores nerveux traduisant des signes éventuels de douleur/inconfort. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance/inconfort d'un animal est jugée trop importante, si les scores de signes nerveux indiquent que les points limites sont atteints, et si aucun autre soin ne peut lui être

apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée. Les animaux sont hébergés en groupe, dans des cages conformes à la Directive 2010/63, avec enrichissement (renforcement positif, perchoirs, musique, jouets).

L'évaluation de la neurovirulence ne peut pas être réalisée in vitro, à part pour le virus de la polio. Il n'existe pas de méthode alternative in vitro validée pour ce type de procédure avec d'autres virus à tropisme nerveux, en raison notamment de la difficulté à déterminer/confirmer l'absence de virulence chez un agent pathogène viral atténué.

2834. Chaque année notre institut reçoit une centaine de lignées de souris génétiquement modifiées de partenaires extérieurs. Afin de réduire au minimum tout risque de contamination microbienne de nos animaleries, les lignées sont importées au stade embryonnaire ou sous forme de sperme ce qui permet d'obtenir des animaux de statut sanitaire compatible avec celui de nos animaleries (validation par sérologie) après transfert d'embryons chez des souris mères-porteuses.

Par ailleurs, nous utilisons également cette technique de transfert d'embryons couplée à une FIV (fécondation in vitro) afin d'augmenter le nombre d'embryons produits pour obtenir des lots d'animaux expérimentaux homogènes et aux effectifs permettant des études de phénotypage. La FIV, que nous réalisons une cinquantaine de fois par an, nous permet également de réduire considérablement le nombre de femelles utilisées par rapport à des accouplements classiques.

Pour la réalisation de ces transferts d'embryons et FIV, un maximum de 4 800 souris par an sera utilisé, soit environ 24 000 souris pour ce projet.

D'un point de vue pratique, le bien-être des animaux sera respecté tout au long du projet. Toute procédure stressante ou douloureuse sera réalisée sous anesthésie générale. Ainsi, nous essayons au mieux de répondre aux exigences de raffinement et de réduction de la règle des 3Rs.

2835. La voie intramammaire constitue une voie d'administration locale de choix dans le traitement et la prévention des pathologies de la mamelle de la vache laitière. Ces pathologies peuvent survenir chez la vache laitière pendant la période de lactation ou pendant la période de tarissement (=période sèche, de repos de la mamelle avant un nouveau vêlage). Le médicament est administré par voie naturelle, par le sphincter du trayon, et déposé dans le canal du trayon, à partir duquel il pourra, selon ses propriétés, diffuser plus ou moins dans le reste de la mamelle. Le plus souvent le médicament est présenté dans une seringue munie d'un embout fin, qui permet l'introduction dans le sphincter et le dépôt du médicament dans le canal du trayon. L'administration peut concerner un ou plusieurs quartiers à la fois. Une fois administré, en fonction de ses propriétés et de la période de traitement (lactation ou tarissement), le médicament pourra : soit rester en place et jouer le rôle de bouchon du trayon (ex : obturateurs utilisés au tarissement), soit diffuser de manière plus ou moins importante dans le quartier afin d'y exercer son effet.

Les études de tolérance, de pharmacocinétique et de résidus dans le lait pour le développement réglementaire de médicaments vétérinaires intramammaires vont permettre d'étudier et de caractériser le comportement du médicament dans l'espèce de destination à laquelle il est dédié (vache laitière). Les réactions d'intolérance locales qui pourraient se produire au niveau du canal du trayon sont suivies et documentées en cours de procédure par l'observation locale du trayon, l'observation de l'aspect du lait ainsi que par des comptages cellulaires réalisés dans le lait des quartiers traités. Cette analyse permet de détecter une éventuelle réaction inflammatoire de la mamelle ou du quartier concerné. Les prélèvements de lait destinés à l'étude de la pharmacocinétique ou des résidus dans le lait sont obtenus dans les conditions habituelles de traite. Des prélèvements sanguins peuvent être réalisés en complément, aux mêmes temps que les prélèvements de lait, pour comparaison des niveaux de concentration. Ces études sont réalisées selon les lignes directrices en vigueur, définissant le nombre minimal d'animaux requis et le schéma expérimental le mieux adapté à la finalité de l'étude. Aucun sacrifice n'est nécessaire pour réaliser ces études. La réutilisation des vaches incluses peut être envisagée en fonction de la durée et de l'espacement des procédures considérées. Le nombre total de vaches nécessaire à ce projet varie en fonction du nombre de procédures expérimentales nécessaires au développement du médicament et de la capacité de réutilisation des vaches, sans toutefois excéder 100 vaches sur 5 ans. Les vaches utilisées dans ce projet sont hébergées et étudiées dans leur cadre de vie habituel, alternant passages en pâture extérieure et passages en stabulation. Pendant le déroulement des procédures expérimentales, les conditions habituelles de traite et de distribution de la ration sont maintenues, ce qui n'engendre pas de stress additionnel.

2836. Notre hypothèse générale est que les cellules mourantes d'un patient cancéreux doivent pouvoir permettre de stimuler son immunité contre les cellules cancéreuses.

L'idée est donc d'utiliser certains agents chimiothérapeutiques qui peuvent induire un certain type de stress des cellules tumorales et leur mort qui est immunogénique (ICD, de l'anglais « Immunogenic cell death »), ce qui signifie que les cellules cancéreuses mourantes d'un patient pourraient servir de vaccin stimulant une réponse immunitaire spécifique anti-tumorale, qui serait capable de contrôler (et parfois même éliminer) les cellules cancéreuses résiduelles (souches). Des analyses biochimiques ont révélé les propriétés distinctives de l'ICD (par opposition à la mort non immunogène des cellules, non-ICD). Celles-ci sont l'exposition de la calréticuline (CRT) à la surface cellulaire, la libération d'ATP pendant l'apoptose, et la mort cellulaire associée à la libération de HMGB1. Nous avons découvert que la mort cellulaire immunogénique est obligatoirement précédée de deux types de stress premortem, à savoir le stress du réticulum endoplasmique (ER) et de l'autophagie. Suite au stress de l'ER induit par la chimiothérapie, la CRT, qui est habituellement isolée dans la lumière de l'ER, s'installe sur la surface extérieure de la membrane plasmique et constitue un signal pour le système immunitaire qui élimine les cellules cancéreuses

mourantes. L'autophagie est également obligatoire pour la mort immunogénique parce que la suppression de l'autophagie inhibe la libération d'ATP à partir de cellules tumorales mourantes.

Nous postulons que si une drogue chimiothérapeutique défaut à induire le stress d'ER, mais provoque une réponse à l'autophagie, la restauration du stress d'ER devrait rétablir la réponse immunitaire associée à la chimiothérapie anticancéreuse. L'objectif final de ce projet est de trouver le moyen de rétablir la réponse immunitaire associée à la chimiothérapie anticancéreuse. Pour cette raison, nous avons besoin de réaliser des expériences in vivo chez des souris immunocompétentes et immunodéficientes afin de pouvoir confirmer nos données obtenues in vitro. En effet, l'étude du rétablissement de la totalité de la réponse immunitaire ne peut se faire que dans des organismes entiers.

Ce projet vise à optimiser de possibles immunothérapies anticancéreuses, grâce à trois types d'expériences in vivo qui sont essentielles. Afin de suivre la règle des 3Rs, dans une première expérience, seulement les 10 drogues (sur 1040) permettant d'obtenir les meilleurs résultats in vitro seront utilisées. En fonction des résultats obtenus nous allons réduire le nombre de drogues utilisées à 5 dans l'expérience 2. Au total, 3400 souris au maximum seront utilisées dans ce projet.

Afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques et nous chercherons de regrouper les expérimentations dans le but de garder un nombre minimum d'animaux pour les groupes contrôles.

Un milieu enrichi adapté est prévu pour l'hébergement des souris pour minimiser l'angoisse (présence, dans les cages, du coton pour qu'ils puissent faire de nids).

2837. Pendant ces dernières années notre laboratoire a travaillé sur l'hypothèse que certains agents chimiothérapeutiques efficaces peuvent induire un certain type de stress des cellules tumorales et leur mort immunogénique (ICD, de l'anglais « Immunogenic cell death »), ce qui signifie que les cellules cancéreuses mourantes d'un patient, pourraient servir comme un vaccin qui stimule une réponse immunitaire spécifique anti-tumorale, qui serait capable de contrôler (et parfois même éliminer) les cellules cancéreuses résiduelles (souches). Des analyses biochimiques ont révélé les propriétés distinctives de l'ICD (par opposition à la mort des cellules non immunogène, non-ICD). Ceux-ci sont l'exposition à la surface cellulaire de la calréticuline (CRT), la libération d'ATP pendant l'apoptose, et la mort cellulaire associée à la libération de HMGB1. Nous avons résolu que la mort cellulaire immunogénique est obligatoirement précédée de deux types de stress premortem, à savoir le stress du réticulum endoplasmique (ER) et l'autophagie. Suite au stress du RE induit par la chimiothérapie, la CRT, qui est habituellement isolée dans la lumière du RE, s'installe sur la surface extérieure de la membrane plasmique et constitue un signal pour le système immunitaire qui élimine les cellules cancéreuses mourantes. L'autophagie est également indispensable à la mort immunogénique des cellules parce que la suppression de l'autophagie empêche la libération d'ATP par les cellules tumorales mourantes.

Nous postulons que si une drogue chimiothérapeutique est incapable d'induire le stress d'ER ou l'autophagie, leur restauration devrait rétablir la réponse immunitaire associée à la chimiothérapie anticancéreuse.

Ce projet vise à optimiser de possibles immunothérapies anticancéreuses en modulant la réponse du système immunitaire moyennant l'apport externe de CRT (sous forme de protéine recombinante) ou ATP (via l'inhibition des enzymes qui dégradent l'ATP extracellulaire, les ectoATPases avec ARL67156) dans de cellules présentent des défauts dans la réponse au stress ER ou autophagie déficientes, respectivement.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales sur des animaux vivants, plus particulièrement la souris. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire ex-vivo du fait de sa complexité.

Ce projet se déroulera sur plusieurs années, et il nécessitera 4900 souris.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. D'une part, car elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. L'objectif final de ce projet est de trouver le moyen de rétablir la réponse immunitaire associée à la chimiothérapie anticancéreuse. Pour cette raison, nous avons besoin de réaliser des expériences in vivo chez des souris immunocompétentes et immunodéficientes afin de pouvoir confirmer nos données obtenues in vitro. En effet, l'étude du rétablissement de la totalité de la réponse immunitaire ne peut se faire que dans des organismes entiers. Les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Les nombres de souris par lot ont été calculés par des méthodes de calcul de puissance (avec un seuil de 5% et une puissance de 90%). Les tests statistiques utilisés seront principalement des suivis longitudinaux (e. g. inférence linéaire sur le log de la taille des tumeurs). En cas de croissance tumorale atypique (comme pour les cas de régression tumorale), nous utiliserons aussi des tests à des temps donnés (e.g. t-test, chi2, etc.). Enfin, nous pourrions utiliser moins de souris si nous trouvons une significativité avec moins de souris. Les animaux recevront une alimentation adaptée à leur condition (alimentation enrichie, accès très facile, digestibilité importante) dès apparition des signes modélisant la carcinogénèse.

2838. Pendant ces dernières années, notre laboratoire a travaillé sur l'hypothèse que certains agents chimiothérapeutiques efficaces peuvent induire un certain type de stress des cellules tumorales et leur mort immunogénique (ICD, de l'anglais « Immunogenic cell death »), ce qui signifie que les cellules cancéreuses mourantes d'un patient pourraient servir de vaccin (en stimulant une réponse immunitaire spécifique anti-tumorale), qui serait capable de contrôler (et parfois même d'éliminer) les cellules cancéreuses résiduelles (souches). Des analyses biochimiques ont révélé les propriétés distinctives de l'ICD (par opposition à la mort non immunogène des cellules, non-ICD). Ceux-ci sont l'exposition à la surface cellulaire de la calréticuline (CRT), la libération d'ATP pendant l'apoptose, et la mort cellulaire associée à la libération de HMGB1. Nous avons découvert que la mort cellulaire immunogénique est obligatoirement précédée de deux types de stress premortem, à savoir le stress du

réticulum endoplasmique (ER) et l'autophagie. Suite au stress du RE induit par la chimiothérapie, la CRT, qui est habituellement isolée dans la lumière du RE, s'installe sur la surface extérieure de la membrane plasmique et constitue un signal pour le système immunitaire qui élimine les cellules cancéreuses mourantes. L'autophagie est également indispensable à la mort immunogénique des cellules parce que la suppression de l'autophagie empêche la libération d'ATP par les cellules tumorales mourantes.

Nous postulons que si une drogue chimiothérapeutique est incapable d'induire l'autophagie, mais capable de déclencher l'exposition de CRT et la libération de HMGB1, la restauration de la libération d'ATP devrait rétablir la réponse immunitaire associée à la chimiothérapie anticancéreuse.

Ce projet vise à optimiser de possibles immunothérapies anticancéreuses en modulant la réponse du système immunitaire moyennant des cellules inductibles pour stimuler la libération d'ATP avec l'addition de cumate. Ce qui pourrait nous permettre d'identifier, a posteriori, différentes drogues ayant le même effet que les cellules inductibles.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales sur des animaux vivants, plus particulièrement la souris. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire ex-vivo du fait de sa complexité. Il nécessitera 4360 souris.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Vu que l'objectif final de ce projet est de trouver le moyen de rétablir la réponse immunitaire associée à la chimiothérapie anticancéreuse, nous avons besoin de réaliser des expériences in vivo chez des souris immunocompétentes et immunodéficientes afin de pouvoir confirmer nos données obtenues in vitro.

Afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques et nous chercherons à regrouper les expérimentations dans le but de garder un nombre minimum d'animaux pour les groupes témoins. Les nombres de souris par lot ont été calculés par des méthodes de calcul de puissance (avec un seuil de 5% et une puissance de 90%). Les tests statistiques utilisés seront principalement des suivis longitudinaux (e. g. inférence linéaire sur le log de la taille des tumeurs). En cas de croissance tumorale atypique (comme pour les cas de régression tumorale), nous utiliserons aussi des tests à des temps donnés (e.g. t-test, chi2, etc.). Néanmoins nous pouvons utiliser moins de souris si nous trouvons une significativité avec moins de souris. Un milieu enrichi adapté est prévu pour l'hébergement des souris pour minimiser l'anxiété (présence, dans les cages, du coton pour qu'ils puissent faire de nids). Les animaux recevront une alimentation adaptée à leur condition (alimentation enrichie, accès très facile, digestibilité importante) dès apparition des signes modélisant la carcinogénèse.

2839. La flécaïne est un médicament anti-arythmique de classe 1c, utilisé pour le traitement de maladies cardiaques graves telles que les arythmies supraventriculaires. Il présente cependant un fort risque de surdosage, puisque que la dose toxique ne débute qu'à 3 fois la dose recommandée. Lors d'une intoxication, volontaire ou accidentelle, le patient présente des troubles cardio-vasculaires importants associés à un taux de mortalité évalué entre 40 et 50%. Le traitement actuel de cette intoxication reste principalement symptomatique par l'administration de sels de sodium molaires ou semi-molaires. En derniers recours, et en tenant compte des propriétés liposolubles (qui se dissout dans les graisses) de la flécaïne, certaines équipes ont tenté l'administration d'émulsions lipidiques qui, bien qu'initialement destinées à la nutrition parentérale, ont montré leur efficacité pour antagoniser les effets cardiotoxiques d'autres molécules liposolubles comme notamment les anesthésiques locaux. Leur utilisation au cours des intoxications à la flécaïne reste toutefois controversée avec des résultats humains et expérimentaux peu probants. Contrairement aux émulsions lipidiques commercialisées dont la composition est prédéterminée, des techniques récentes (Dynamic light scattering, Liposome electrokinetic capillary chromatography (LEKC), Asymmetrical field flow fractionation (AsFFFF), Atomic force microscopy (AFM), fluorescence spectroscopy, high-performance liquid chromatography) permettent d'étudier et de créer des suspensions liposomales spécifiques de chaque molécule en jouant sur leur composition lipidique, la taille des vésicules, leur charge, leur tampon interne et leur caractère mono ou multi-lamellaire.

Jusqu'à présent, aucune étude n'a exploré les interactions entre la flécaïne et des liposomes. C'est le choix qui a été fait dans le cadre de ce projet. Pour tenter de répondre à plusieurs questions, il se déroulera en deux phases :

- une étude in vitro au cours de laquelle une suspension liposomale hyperaffine de la flécaïne sera mise au point et testée, pour vérifier s'il est possible de créer une émulsion liposomale spécifique pour la capture de la flécaïne, et vérifier si le pouvoir de capture de cette émulsion liposomale est supérieur à ceux des émulsions lipidiques commercialisées.

- une étude in vivo pour évaluer si cette émulsion liposomale permet de lutter contre la cardiotoxicité induite par une intoxication à la flécaïne, notamment en améliorant les paramètres hémodynamiques et électrophysiologiques, et pour analyser si ce traitement est supérieur au traitement conventionnel et aux émulsions lipidiques commercialisées. Cette phase d'étude in vivo nécessitera une mise au point préalable, d'une part pour évaluer la toxicité de la suspension liposomale choisie, mais également pour optimiser les gestes à réaliser pour la mesure des paramètres nécessaires au suivi des animaux, et ainsi réduire le nombre d'animaux pour chaque groupe. Pour des raisons de coût, et après une étude bibliographique, c'est le rat Sprague-Dawley qui a été choisi comme modèle. Un total de 50 animaux est prévu soit 5 groupes de 10, permettant ainsi la phase de mise au point, puis la comparaison de 4 antidotes (contrôle, traitement conventionnel, émulsion commerciale, suspension liposomale) après intoxication à la flécaïne.

Dans le cadre de ce projet, tout sera mis en oeuvre pour respecter au mieux la règle des 3R :

(Remplacer) Il s'agit d'une étude basée sur l'étude des paramètres hémodynamiques en temps réel. Il n'existe pas de méthode alternative permettant de reproduire les réactions d'un organisme entier suite aux effets résultant de multiples interactions biologiques simultanées.

(Réduire) Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum, en considérant toutefois un nombre suffisant permettant de réaliser une étude statistique.

(Raffiner) La souffrance et l'angoisse de l'animal seront prévenues par la réalisation d'une anesthésie générale pendant toute la durée du protocole. Aucun animal ne sera réveillé, l'euthanasie étant réalisée sous anesthésie générale.

2840. L'ataxie de Friedreich (AF) est une maladie génétique rare (incidence 1/50000) qui touche aussi bien les garçons que les filles et où prédominent essentiellement des signes neurologiques (trouble de l'équilibre, difficultés à coordonner ses mouvements, difficultés à s'exprimer, perte des réflexes), des troubles viscéraux (cardiomyopathie obstructive et diabète sucré). La cause du décès est souvent cardiaque mais elle peut également survenir suite à un étouffement. Il survient à un âge très variable. Cette maladie est caractérisée par des lésions de la moelle épinière et du cervelet (dégénérescence spinocérébelleuse). A l'heure actuelle il n'y a pas de traitement curatif, cependant l'Idébénone (analogue du coenzyme Q10) est donné à titre expérimental pour diminuer les complications cardiaques sans améliorer les signes neurologiques. L'ataxie de Friedreich est la plus fréquente des ataxies héréditaires d'origine génétique, qui se déclare généralement à l'adolescence. Le gène muté est le gène de la Frataxine qui est une protéine de la matrice mitochondriale. Son rôle reste controversé mais son absence conduit à l'ataxie de Friedreich. L'atteinte neurologique domine le pronostic de cette maladie et ne bénéficie pas encore d'une prise en charge efficace et reste sans traitement. Dès lors, un traitement par thérapie génique pour apporter une copie normale du gène codant pour la frataxine est donc une approche pertinente si on arrivait à cibler le transfert de gène dans certaines parties du système nerveux (le cervelet, le tronc cérébral et la moelle épinière). L'approche par Thérapie Génique a récemment montré cette pertinence dans l'atteinte cardiaque de cette maladie. La compétition internationale est sévère car au moins 3 groupes ont des approches semblables et les différences de stratégie reposent sur le choix des vecteurs de transfert de gène mais également sur la voie d'administration que le modèle animal macaque permet au mieux d'appréhender.

Parallèlement à un projet précédent (référence 2015121515582056 / APAFIS 3200, avis favorable du Comité d'éthique en date du 26/02/2016), le projet soumis ici a pour but de cribler 2 voies d'administration au niveau du système nerveux central (intracérébroventriculaire et injection intracisternale magna) d'un nouveau vecteur de thérapie génique, AAV2i8-FXN-HA, afin d'évaluer son tropisme pour le système nerveux central. Il y a plusieurs voies d'administration possible, et plutôt que de tester chacune d'entre elle en utilisant un nombre élevé d'animaux par voie d'administration, nous souhaitons faire cette étude pour choisir celle qui montrerait le plus fort potentiel de transfert de gène dans le système nerveux et en particulier au niveau du cervelet. C'est pourquoi chaque groupe n'est composé que de 2 animaux, 1 male et une femelle, (n=4 animaux au total) et que nous pensons que, compte tenu de l'expertise de l'équipe vétérinaire en place, de celle de l'investigateur principal, neuropathologiste (plusieurs années d'expertise et de manipulation de ces animaux en particulier pour le transfert de gène dans le système nerveux central) et celle du neurochirurgien intervenant, la robustesse des résultats avec le nombre d'animaux réduit par groupe sera suffisante pour en tirer les informations recherchées (i.e. la meilleure voie d'administration). Les vecteurs de thérapie génique reposent sur l'emploi de virus recombinants et, dès lors, leur tropisme (lieu où ils transmettront le gène thérapeutique) va varier selon l'espèce animale utilisée. Nous savons à partir des données de la littérature que le primate non humain est le modèle animal le plus prédictif pour les vecteurs viraux que nous utilisons. D'autre part, les repères anatomiques sont certes différents de ceux de l'homme mais sont néanmoins les plus proches pour une projection clinique ultérieure. Ce sont les raisons pour lesquelles nous souhaitons faire cette étude pilote dans ce modèle que nous connaissons bien pour refléter au mieux la clinique humaine.

Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en place. Ils ont été optimisés grâce à notre expertise de l'espèce macaque depuis l'année 2000.

• Des protocoles d'anesthésie seront mis en place selon les procédures :

- IRM, réalisée sous anesthésie fixe avec relai gazeux, ne nécessitant pas la mise en place d'un protocole analgésique.

- Les 2 voies d'administration du vecteur AAV seront réalisées sous anesthésie fixe avec relai gazeux.

- Prélèvements sanguins : anesthésie à l'aide d'une injection IM de Kétamine (Imalgène® 1000).

• Des protocoles d'analgésie seront mis en place en fonction de la voie d'administration :

- Administration intracisternale : un anti-inflammatoire (meloxicam®) administré par voie SC avant le réveil de l'animal. Au niveau du site ponction lombaire, une crème anesthésique (Lidocaïne prilocaïne 5% crème) sera appliquée quelques minutes avant le réveil de l'animal.

- Administration intracérébroventriculaire : association de morphine en SC avant incision cutanée et d'un anti inflammatoire non stéroïdien (meloxicam®) en SC en avant le réveil de l'animal. Au niveau du site opératoire (craniotomie) une crème anesthésique (Lidocaïne prilocaïne 5% crème) appliquée avant le réveil de l'animal. A l'euthanasie, de la morphine sera injectée en SC en début d'anesthésie.

En outre, afin de favoriser les échanges sociaux entre animaux et favoriser leur bien être, les macaques seront hébergés par groupes de 2 ou 3 dans la mesure du possible (hors période de suivi post opératoire par exemple), comme nous le faisons dès que compatible avec l'étude

2841. Avant toute commercialisation d'un médicament humain et vétérinaire/produit chimique/vaccin, il faut évaluer ses effets indésirables à des doses élevées. Les études toxicologiques ont pour but la détection de ces effets après administration unique puis répétée. La réglementation internationale requiert l'utilisation en recherche biomédicale d'une espèce non rongeur et rongeur. Chez ces mammifères (rats, souris, cochon d'Inde, Hamster...), on évalue les effets après un (effets aigus)

ou plusieurs jours de traitement dont la durée varie en fonction de celle souhaitée/possible chez l'Homme. Pour les produits chimiques, le niveau de danger et de risque peut être associé directement aux résultats de ces études.

Ce projet (pour lequel il n'existe pas d'alternative in vitro) se résume en l'administration unique ou répétée (quotidiennement) d'un produit pharmaceutique/chimique chez le rongeur pour une durée de 1 jour à 1 année. La voie d'administration est celle utilisée chez l'homme (orale, nourriture, sous cutanée, intramusculaire, intraveineuse, intra articulaire, dermale...). Des points limites sont définis afin d'envisager un arrêt de traitement des animaux ou leur euthanasie prématurée.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet peut être estimé à 30000 sur 3 ans. Il doit permettre d'obtenir des résultats représentatifs, prédictifs d'une toxicité, et exploitables statistiquement pour d'atteindre les objectifs des études. Le nombre d'animaux est déterminé a minima afin d'obtenir des résultats robustes statistiquement et ainsi atteindre les objectifs de l'étude. Parfois, des animaux suivent une phase sans traitement à l'issue d'une période de traitement afin d'évaluer la réversibilité des effets, et/ou font l'objet de prélèvements sanguins pour définir le profil cinétique de la molécule/métabolites. Si nécessaire, l'administration du composé à tester est pratiquée sous anesthésie générale pour permettre une injection en toute sécurité et sans douleur (par exemple voie intra articulaire). Des souris transgéniques peuvent être utilisées.

L'hébergement (en groupe par défaut) des animaux en cages est conforme à la Directive 2010/63 avec enrichissement.

Les paramètres vivo sont enregistrés méthodiquement (par exemple les signes cliniques, poids corporel, consommation alimentaire, ophtalmologie) et des analyses hématobiochimiques et urinaires sont réalisées. Des prélèvements sanguins permettent d'établir un profil toxicocinétique. Après euthanasie, l'étude histopathologique (examen macroscopique et microscopique, pesée des organes majeurs) permet d'identifier une toxicité d'organes.

2842. Le "Gastric Bypass" (RYGB) est un type de chirurgie métabolique qui entraîne une amélioration spectaculaire de l'équilibre glycémique et une correction du diabète de type 2, indépendamment de la perte de poids. Le RYGB consiste à réduire la taille de l'estomac créant ainsi une poche gastrique sur laquelle est raccordée un segment d'intestin, le but étant d'en réaliser un court-circuit. Cependant, les mécanismes conduisant à l'amélioration du métabolisme du glucose après RYGB sont mal définis.

Notre équipe a développé, chez le porc miniature d'anatomie similaire à l'Homme, un modèle de RYGB permettant d'explorer le rôle de l'intestin et du foie dans l'équilibre glycémique lié aux modifications anatomiques de l'intestin grêle.

Nous réaliserons des dosages sanguins de différents paramètres métaboliques lors d'un repas test réalisé chez des animaux vigiles: les dosages sanguins de différents paramètres (glucose, insuline, ...) seront ainsi effectués.

Afin d'estimer l'activité de la flore intestinale des animaux, nous réaliserons des biopsies pendant la chirurgie du RYGB.

Les animaux utilisés dans cette étude seront hébergés individuellement dans une animalerie. Afin de limiter leur nombre, nous serons particulièrement attentifs à leur développement et à leur rétablissement en utilisant des traitements anti-douleurs avant, pendant et après toute chirurgie. Pour réaliser cette étude, nous estimons la nombre d'animaux nécessaires à 24 par an soit 120 individus sur 5 ans.

Les résultats obtenus permettront une meilleure compréhension des mécanismes du RYGB, et éventuellement le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour traiter le diabète de type 2.

2843. Le phénotype le plus souvent observé dans le contexte physiopathologique de nombreuses myopathies est une atrophie, une infiltration adipocytaire et la présence de fibrose disqualifiant de fait, ou du moins limitant, les rationnels thérapeutiques proposés par la thérapie génique ou la thérapie cellulaire. Le maintien de l'intégrité musculaire a été décrit depuis longtemps comme étant dépendant de l'innervation et de l'exercice. Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de l'homéostasie musculaire sont encore mal compris.

Parmi les différents signaux trophiques, l'activité contractile du muscle, la neurotransmission et les facteurs neurotrophiques sont des éléments essentiels qui régissent l'intégrité de la masse musculaire. Une altération de l'activité électrique provoque une modification de l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie musculaire.

Le but de cette étude est donc de déterminer les mécanismes impliqués dans le contrôle de la masse musculaire après une altération de l'activité électrique et d'identifier la part de responsabilité «neurogénique» versus «myogénique».

Pour répondre à cette question, nous allons explorer les conséquences d'une interruption de l'activité contractile des fibres musculaires après dénervation ou sans dénervation en détruisant le système de couplage excitation-contraction du muscle. Le couplage excitation-contraction est assuré au niveau de structures subcellulaires par deux principaux partenaires moléculaires, le récepteur des dihydropyridines (DHPR) et le récepteur ryanodine de type 1 (RyR1). Notre objectif est donc d'étudier les conséquences morphogénétiques liées à une inactivation de deux sous-unités du DHPR (alpha1S et beta1a).

Pour réaliser ce projet nous utiliserons 240 souris C57BL/6Jrj soit pour invalider les sous-unités alpha1S et beta1a soit pour réaliser des dénervations des muscles de la patte postérieure. Afin de limiter au maximum le recours à l'utilisation de souris pour l'obtention de réponses à nos questions, les expériences seront, dans la mesure du possible réalisées in vitro avec des lignées cellulaires. Ce n'est qu'en dernier recours que nous utiliserons le système murin. De même, les processus expérimentaux seront conçus de façon à utiliser un nombre de souris limité permettant une analyse statistique. Dans les situations de reproduction ou de stress dues à l'expérimentation, la nourriture pourra être mise à disposition sur le plancher de la cage. De la laine de bois pourra être ajoutée afin de permettre la création d'un nid.

2844. L'arsenal thérapeutique disponible actuellement ne permet pas une prise en charge satisfaisante des douleurs arthrosiques. L'arthrose est une maladie chronique qui se caractérise par la destruction du cartilage osseux sur toute la

structure de l'articulation. Elle est considérée comme une pathologie découlant d'une érosion inéluctable du cartilage. Or chez plus de 50 % des patients, on retrouve dans les liquides de synovie, normalement stériles, des résidus bactériens (ADN, ARN), dont les origines peuvent être buccale mais également alimentaire (bactéries du sol et de l'eau). La translocation bactérienne depuis la sphère intestinale serait donc perturbée chez les patients arthrosiques. La persistance des messages dans les articulations aggraverait l'inflammation locale et donc le développement de l'arthrose. Plusieurs arguments sont en faveur du lien « inflammation-messages bactériens » au site arthrosique : sécrétion par les fibroblastes synoviaux des cytokines proinflammatoires et des métalloprotéases en réponse à la stimulation par des peptidoglycanes et du lipopolysaccharide, augmentation de la production de nombreux médiateurs (PGE2, NO, métalloprotéines) et baisse de la synthèse des macromolécules de la matrice par les chondrocytes stimulés par ces résidus bactériens. Par ailleurs le lien entre « inflammation et douleur » commence à être documenté (rôle du TNF $\alpha$  dans l'hyperexcitabilité de la moelle épinière associée à l'inflammation articulaire, amélioration de la douleur par régulation de cytokines inflammatoires, bénéfice des glucocorticoïdes lors de douleurs sévères arthrosiques...). En outre, l'association fréquente de l'arthrose avec l'obésité renforce le risque de translocation bactérienne depuis les sites buccal et intestinal. En effet, du lipopolysaccharide circulant est communément détecté hors période post-prandiale chez les personnes en surpoids. Une meilleure régulation de la translocation bactérienne pourrait donc améliorer la prise en charge de la douleur arthrosique. Pour contrer les effets délétères de la persistance de résidus bactériens dans des sites normalement stériles, il est nécessaire de restaurer l'homéostasie hôte-microbiote.

2845. Les bifidobactéries et les complexes bifides présentent un intérêt de part leurs propriétés régulatrices de la translocation bactérienne d'origine intestinale. Cependant la diversité des bifidobactéries demande de vérifier quelles souches et/ou complexes bifides ont la meilleure efficacité thérapeutique et à quelle dose. Le recours à un modèle animal est donc indispensable avant d'envisager un essai clinique chez les patients

L'injection de monoiodoacétate (MIA) dans la patte du rat produit des changements dégénératifs (histologiques et morphologiques) comparables à ceux observés dans l'arthrose humaine avec l'avantage d'être rapide, peu invasive et reproductible. De plus, des études préalables réalisées par notre équipe ont mis en évidence un lien entre la translocation bactérienne et le développement de l'arthrose dans ce modèle. Il s'agit désormais d'évaluer l'effet de la régulation de la translocation bactérienne sur la douleur de l'animal. Le modèle MIA comme modèle d'évaluation de la douleur est déjà reconnu par la communauté scientifique en atteste les publications récentes visant à apprécier les propriétés anti-nociceptives de nombreux composés (Retigabine, Chenopodium...).

Ainsi, pour positionner les complexes bifides et/ou les bifidobactéries dans l'arthrose, la démarche est d'abord de déterminer la (ou les) dose(s) anti-arthrosique(s) dans le modèle MIA chez le rat et de vérifier si elle réduit la douleur de l'animal. L'efficacité anti-arthrosique des molécules bifides est évaluée post-mortem par observation macroscopique et histologique de la structure articulaire et de l'état du cartilage osseux au niveau des pattes. L'évaluation de la douleur est réalisée via deux tests mécaniques. Enfin, d'un point de vue mécanistique, l'effet à court et moyen terme de l'administration des molécules bifides sur le microbiote et la translocation bactérienne sera évalué.

Le nombre d'animaux par groupe est prévu pour avoir un effectif minimum et suffisant en conformité avec la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement) permettant une analyse statistique significative (tests Mann Whitney, Kruskal Wallis, ANOVA mesure répétée- Modèle mixte). Le calcul du nombre d'animaux pour raison statistique (hypothèse: 70% d'arthrose dans le groupe non traité; 20% dans le groupe traité) impose 15 rats par lot pour l'effet dose. 3 lots "test molécules bifides" avec différentes doses (DOSE A, DOSE B, DOSE C) et 1 lot Placebo sont testés afin d'obtenir une significativité statistique soit 60 rats. En année 2, l'effet des molécules sur le microbiote au cours du temps nécessite au minimum 16 rats par lots (3 lots: Placebo, Dose A, Fantôme) à chaque temps (T0, T+2, +4, +6 semaines) soit un total de 192 rats pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. En année 3, l'étude cinétique de la translocation bactérienne nécessite au minimum 8 rats par lots (2 lots: Placebo, Dose A) à chaque temps (T0, T6h, T12h, T18h, T24h après la dernière prise) soit un total de 80 rats pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Résumé des effectifs (N=332 rats):

- Année 1: Effet Dose des molécules bifides (60 rats)
- Année 2: Mécanisme-Effets des molécules bifides sur le microbiote au cours du temps (192 rats)
- Année 3: Cinétique de la translocation bactérienne (80 rats)

2846. L'infarctus du myocarde aigu demeure aujourd'hui une cause majeure de mortalité et de morbidité dans le monde. Le conditionnement ischémique à distance (RIC) est une nouvelle stratégie thérapeutique qui consiste à induire de brèves séquences d'ischémie-reperfusion au niveau d'un tissu ou d'un organe à distance du cœur. Il permet de réduire les lésions d'ischémie-reperfusion dans l'infarctus du myocarde aigu. Le RIC est un stimulus neuro-humoral qui conduit à une libération de facteurs circulants cytoprotecteurs qui induisent une protection à distance du cœur. Les mécanismes cellulaires et moléculaires de cette cardioprotection sont encore mal compris. L'angiopoietine-like 4 (ANGPTL4) est une protéine induite par l'hypoxie qui joue un rôle dans la préservation de l'intégrité vasculaire. De par ses propriétés cardioprotectrices, ANGPTL4 pourrait être l'un de ces médiateurs du RIC. Notre objectif est donc d'étudier l'implication d'ANGPTL4 dans la cardioprotection induite par le RIC. Cette étude sera réalisée chez la souris qui est un modèle de choix pour l'infarctus du myocarde aigu. Ce modèle est validé et est parfaitement maîtrisé au laboratoire. Nous étudierons l'effet du RIC sur la taille d'infarctus chez des souris KO pour ANGPTL4 (-/-) et leurs congénères contrôle (wild type +/-). Dans une seconde partie du projet, nous étudierons les voies de signalisation activées dans le cœur après ischémie-reperfusion myocardique avec ou sans RIC (par western blot). Dans une troisième partie, nous étudierons l'expression de Angptl4 après RIC dans le cœur, le muscle

squelettique et le foie par qRT-PCR et western blot. Nous analyserons également les niveaux d'Angptl4 plasmatique. Enfin, une dernière partie examinera in vitro sur cardiomyocytes isolés de coeur de souris l'effet de Angptl4 sur la viabilité cellulaire après hypoxie-réoxygénation. 168 souris au total seront utilisées pour ce projet. Le nombre d'animaux utilisés a été minutieusement établi de sorte qu'il y ait une utilisation optimale des animaux. Seules les expériences indispensables seront réalisées et il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience. Nous utiliserons un anesthésique et un analgésique aux doses appropriées (pentobarbital sodique 90mg/Kg et buprénorphine 0.1mg/Kg). De plus, il n'existe pas de méthode alternative, ni de modélisation possible de l'infarctus du myocarde aigu.

2847. En conséquence de la transition nutritionnelle qui confronte des enfants nés de mères malnutries à une pléthore énergétique, la moitié de la population de pays émergents se retrouve en surpoids ou obèse et connaît une augmentation significative du risque de maladies métaboliques chroniques comme le diabète de type 2. La programmation nutritionnelle, c'est-à-dire l'influence de l'alimentation de la mère durant la gestation et/ou la lactation sur la santé de l'enfant, en est un déterminant majeur. Pour trouver des solutions nutritionnelles préventives, nous utiliserons un modèle de transition nutritionnelle chez la souris. Ce modèle consiste à proposer à des mères allaitantes une alimentation riche en gras et en sucre. Les petits nés de ces mères reçoivent ensuite une alimentation standard ou également riche en gras et en sucre. Ce modèle est nécessaire pour reproduire au plus juste l'impact de l'alimentation sur les différents tissus et organes et pour comprendre les conséquences à long terme sur la santé de l'organisme. Pour répondre à nos objectifs, nous utiliserons 1050 souris. Le nombre d'animaux a été estimé au minimum nécessaire pour satisfaire les analyses statistiques. Toutes les mesures sont prises pour éviter la souffrance animale.

2848. La myéline est le constituant principal de la gaine qui entoure les axones des neurones du système nerveux central. Elle favorise la conduction rapide des influx nerveux, et donc la communication entre les neurones tout en assurant leur protection. La désagrégation de cette gaine entraîne à long terme une dégénérescence axonale irréversible provoquant des troubles neurologiques. La Sclérose en Plaque (SEP) est une pathologie démyélinisante qui se déclare chez les jeunes adultes, et se manifeste par des réactions auto-immunes ciblant la myéline, menant à l'apparition de troubles neurologiques très handicapants. Il n'existe actuellement aucun traitement permettant de guérir cette maladie ou de réparer les dommages causés.

L'étude de la SEP in vivo est réalisée sur des modèles rongeurs trop éloignés de l'Homme pour permettre d'aborder la physiopathologie de la maladie, et les stratégies thérapeutiques cliniquement pertinentes. De ce fait, nous proposons dans un premier temps d'établir chez le primate non humain, un modèle lésionnel du nerf optique dans le but de mieux cerner l'impact fonctionnel de la démyélinisation – remyélinisation sur les fonctions visuelles.

La lésion sera évaluée par imagerie (IRM) et par des analyses post-mortem. Des tests fonctionnels (PEV : potentiel évoqué visuel, PLR : reflex pupillaire, ERG : électrorétinogramme), utilisés en clinique humaine, seront également effectués avant et après lésion, pour étudier l'impact et l'évolution de cette démyélinisation du nerf optique. Ces tests seront réalisés quotidiennement, sur des créneaux courts (< 1h10) pour réduire le nombre d'animaux utilisés tout en permettant une exploitation statistique des résultats (n=16).

Dans un second temps, nous effectuerons sur le même modèle primate, des greffes de cellules souches neurales (CSN) dont nous avons validé l'efficacité remyélinisante chez la souris.

A noter que chaque intervention sera accompagnée d'un protocole d'anesthésie et d'un accompagnement analgésique adapté pour réduire la douleur et éviter toute souffrance prolongée de l'animal. Un opérateur atitré prendra soin des animaux quotidiennement pour limiter leur angoisse et détecter tous comportements anormaux.

Cette étude fournira à la communauté scientifique un nouveau modèle de démyélinisation avec déficit fonctionnel, très proche de l'Homme. Elle pourrait d'autre part contribuer à la mise en place de nouvelles méthodes de diagnostic précoce des atteintes du système visuel, facilement transposables à l'Homme. Enfin, elle permettra le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques (greffe des CSN) évitant l'installation de troubles définitifs chez les patients SEP.

2849. Le présent projet a pour cadre l'évaluation de la tolérance buccale chez le hamster à l'application d'un candidat médicament sous forme topique buccale. L'objectif de ce projet étant de caractériser la tolérance de la muqueuse buccale suite à l'application du produit testé, et sa tenue sur les muqueuses, il n'est pas possible de limiter les études à des études in vitro. Le hamster est choisi pour la large surface de ces abajoues, facilitant ainsi l'application du produit testé et l'observation des muqueuses. C'est le modèle de choix, reconnu par la communauté scientifique et les agences réglementaires pour ce type d'étude.

Il s'agit d'un projet générique, constitué de deux procédures expérimentales réalisées chez le hamster, par administration unique ou répétée (maximum bi-quotidienne) jusqu'à deux semaines, par application buccale.

Ce projet est conçu pour être répété, en totalité ou partiellement, pour caractériser la tolérance buccale de chaque nouveau candidat médicament testé. La décision de mise en oeuvre de ce projet est faite sur la base des données disponibles et de la stratégie de développement du médicament.

Un plan d'étude est rédigé pour chaque utilisation d'une procédure expérimentale (hors procédure expérimentale d'entraînement/formation du personnel) dans le cadre de l'évaluation d'un candidat médicament. Ce plan définit les objectifs, les moyens expérimentaux mis en oeuvre (s'appuyant sur nos modes opératoires standard), les conditions d'hébergement et d'utilisation des animaux et le nombre de lots. Il précise également les éléments spécifiques comme le calendrier, les

conditions de traitement (dose, fréquence) et d'examens, les gestes techniques. Les effectifs prévus permettent de garantir l'exécution du plan d'étude et d'assurer un nombre d'animaux suffisant pour conclure de façon scientifiquement pertinente.

On prévoit :

- 1 à 2 répétitions par an de la procédure 1, soit 30 à 60 hamsters par an, soit 150 à 300 sur 5 ans.

- 1 à 3 répétitions par an de la procédure 2, soit 30 à 90 hamsters par an, soit 150 à 450 sur 5 ans.

Soit au total 300 à 750 hamsters sur 5 ans.

Dans le but de minimiser la souffrance, la détresse et l'inconfort des animaux engagés dans ces procédures, des points limites permettant de statuer rapidement sur la conduite à tenir vis-à-vis de l'animal ont été définis en interne. Une grille d'évaluation a été élaborée conjointement par la structure chargée du bien-être animal, le comité d'éthique animal et les expérimentateurs et sera régulièrement revue.

Enfin, un petit nombre d'animaux supplémentaires étant prévu pour remplacer ceux dont le statut sanitaire ne serait pas conforme aux critères d'inclusion, ils pourront, à la fin de la procédure expérimentale, être inclus dans une procédure d'entraînement ou de formation du personnel également décrite dans ce projet.

2850. Le développement de nouveaux additifs alimentaires à destination de la nutrition animale tels que les enzymes, les vitamines, les probiotiques et les eubiotiques fait l'objet de travaux de recherches depuis maintenant de nombreuses années. L'objectif de ce projet est d'utiliser des modèles animaux comme outils pour le développement de nouvelles générations d'additifs alimentaires. Le porc représente une des espèces majeures parmi les animaux de rente pour l'utilisation des produits que nous voulons développer et commercialiser. C'est un modèle de référence pour l'évaluation de l'efficacité des candidats avant toute demande de mise sur le marché.

Les nouvelles générations d'additifs devront permettre de valoriser l'utilisation des nutriments des ingrédients d'origine végétale composant l'alimentation des animaux d'élevage, d'améliorer la croissance des animaux, mais également d'améliorer leur état sanitaire dans le but de diminuer l'apport de substances médicamenteuses (ex. antibiotiques).

Le projet d'utiliser des modèles animaux s'étend sur 6 années, dans le but d'évaluer, de tester et de développer différents produits expérimentaux sur l'espèce porcine. Pour ce faire, trois essais au maximum seront réalisés chaque année en utilisant 12 animaux par essai (36 animaux au maximum par année) suivant les paramètres étudiés (digestibilité des nutriments, cinétique d'absorption des nutriments, etc. ...), et dans le but de diminuer au maximum la répétition des essais et le nombre d'animaux utilisés.

Dans le cadre de ce projet deux procédures expérimentales seront mises en œuvre.

D'une part, la procédure expérimentale 1, «Etude de digestibilité et d'absorption chez le porc canulé et stabulé en cage à métabolisme», permettra de démontrer la validité du concept et d'évaluer le mécanisme d'action des additifs alimentaires testés (enzymes, probiotiques, eubiotiques et vitamines) par l'étude du transit et de l'absorption des nutriments et de leurs effets sur la sécrétion des enzymes digestives.

D'autre part, la procédure expérimentale 2, «Etude cinétique chez le porc cathétérisé et stabulé en cage à métabolisme», permettra de démontrer la validité du concept et d'évaluer le mécanisme d'action des additifs alimentaires testés (enzymes, probiotiques, eubiotiques et vitamines) par l'étude de l'absorption des nutriments (cinétiques), de leur métabolisation hépatique et de leur distribution dans la circulation.

La mise en place de ce projet de protocoles chirurgicaux inclut obligatoirement des protocoles d'anesthésie et post-opératoire, afin de limiter la douleur et la souffrance des animaux.

2851. L'autisme est un trouble précoce du développement qui s'accompagne généralement de déficits cognitifs altérant les apprentissages et l'intégration sociale. Si à l'heure actuelle l'autisme ne se guérit pas, cependant, différents médicaments peuvent aider à réduire les comportements répétitifs, l'hyperactivité, l'agressivité, les troubles de la mémoire ou du comportement social.

Au sein de notre laboratoire, nous travaillons sur deux gènes de susceptibilité lié à l'autisme : les gènes *Scribble1* et *Shank3*. La mutation de l'un ou l'autre de ces gènes entraîne, chez la souris, un déficit important de l'interaction sociale ainsi qu'une perturbation de l'apprentissage et de la mémoire. Nous avons déjà montré que l'administration d'un groupe de molécule permettait de restaurer un comportement social normal chez la souris. Ce projet vise à tester sur nos modèles de souris l'efficacité de ces mêmes molécules susceptibles de réduire les troubles de la mémoire liés à l'autisme. Nous utiliserons une lignée de souris mutante : la lignée « *circletail* ou *crc* » qui possède la mutation *Scribble1* et une lignée de souris transgéniques « *CMV-Shank3* » dont le gène *Shank3* est muté.

Notre projet repose sur une approche intégrée nécessitant le fonctionnement du cerveau dans son intégrité ce qui reste encore impossible à modéliser. Par conséquent, nous pensons qu'il n'existe pas de remplacement disponible à notre modèle expérimental qui permettrait d'atteindre les objectifs scientifiques du travail proposé.

Pour supprimer l'angoisse, la détresse ou la douleur subie par les animaux au cours de l'expérience, les animaux sont élevés en cage collective enrichie, observés quotidiennement et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place. Enfin, pour n'utiliser que le nombre minimal d'animaux tout en garantissant la validité scientifique et statistique des résultats, nous utiliserons autant que possible les mêmes animaux pour tester les différentes doses des molécules. Nous considérons qu'un nombre minimum de 15 animaux est nécessaire pour chaque condition expérimentale. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 530 animaux.

2852. Les maladies de Charcot-Marie-Tooth (CMT) sont des maladies génétiques héréditaires, neuromusculaires et évolutives. Elles atteignent les nerfs périphériques provoquant souvent une amyotrophie des mollets, des avant-bras et des mains. Il existe plusieurs formes de CMT qui se différencient par leur mode de transmission, leur localisation génétique et la partie du nerf affectée.

Dans ce projet nous nous intéressons au type dont la cause génétique est la duplication d'une partie du chromosome 17. Afin de modéliser cette pathologie chez l'animal, une souche de rat transgénique porteur de cette même anomalie du chromosome 17 a été développée (Phénotype n'engendrant pas de douleur). Comme l'Homme, ces rats présentent un dysfonctionnement de la transmission nerveuse, des troubles de la marche et de la force musculaire.

Cette souche de rat a été choisie afin de tester un nouveau traitement de la maladie. Les critères que nous utilisons dans ce projet pour évaluer les effets du traitement sont basés sur des mesures de conduction nerveuse et électromyographiques sur des animaux. Des échantillons post-mortem de nerf périphériques permettent d'apprécier les changements morphologiques des fibres nerveuses (histologie).

Dans le cadre du respect de la règle des 3R nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soins aux animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés (grâce notamment à un test statistique Anova). Dans le souci de réduire le nombre des animaux utilisés, il n'y aura pas production de cohortes de rats spécifiquement pour ce projet. En effet des animaux impliqués dans le présent projet ont déjà été étudiés dans un cadre d'analyse comportementale mis en œuvre par un autre laboratoire de recherche. De plus, cette coordination entre les deux laboratoires permet de dégager de possibles corrélations entre les résultats comportementaux et les données neurophysiologiques et histologiques produites par notre équipe.

Notre plan d'étude compte 4 groupes d'animaux transgéniques comportant 20 animaux par groupe ainsi qu'un groupe de 15 animaux non-transgénique servant de référence. Ainsi dans ce projet nous utilisons 95 animaux.

2853. Les lymphomes primaires du système nerveux central (PCNSL) sont une catégorie particulière de lymphomes non-Hodgkinien diffus à grandes cellules, localisés dans le cerveau ou la moelle épinière (système nerveux central). Même si c'est un type de lymphome plutôt rare, avec environ 300 nouveaux cas par an en France, son incidence est en hausse, en particulier dans la population immunocompétente. La caractéristique principale de ces lymphomes réside dans leur tropisme très particulier et restreint au système nerveux central avec très peu de métastases.

Notre laboratoire se concentre sur l'étude d'un couple ligand/récepteur impliqué à la fois dans le guidage des axones et la tumorigenèse. Ce ligand et son récepteur, fortement exprimés au niveau du cerveau, participent à la mise en place du réseau de neurones mais favorisent également la survie des cellules tumorales.

Des études préliminaires sur des cohortes d'échantillons tissu normal/tumoral de patients atteints de PCNSL ont montré que notre ligand d'intérêt est fortement exprimé en périphérie de la tumeur. Notre objectif est de définir si cette forte expression de ligand peut expliquer la localisation particulière des PCNSL en favorisant soit leur survenue, soit leur persistance au niveau du système nerveux central, ce qui expliquerait par ailleurs leur tendance très faible à métastaser.

Malgré l'absence de dissémination, les PCNSL restent une catégorie agressive de cancer avec un taux de survie moyen de 19 mois chez les patients traités (chimiothérapie, radiothérapie). Notre projet permettra potentiellement d'identifier un facteur nécessaire et indispensable au développement atypique de ces lymphomes. Par la suite, nous pourrions envisager le développement d'une thérapie ciblée visant à empêcher l'association de ce ligand à son récepteur, afin d'induire la mort des cellules tumorales.

L'utilisation de ces animaux transgéniques se fera en conformité avec la règle des 3R :

afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (Réduction), nous optimiserons et restreindrons au maximum le nombre d'animaux par groupe (contrôle versus mutants), tout en permettant une interprétation statistique des résultats. Les tumeurs des animaux inclus dans cette étude seront par ailleurs collectées lors de la mise à mort de ceux-ci (en fin de protocole ou en cas de dépassement de point limite) et caractérisées *in vitro*, afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés (Réduction/Remplacement).

Un plan de surveillance adapté avec notamment une pesée hebdomadaire des animaux sera enfin mis en place de manière à éviter l'apparition de signes de souffrance. En cas d'apparition d'un quelconque signe de souffrance, les animaux seront sortis de l'étude et euthanasiés pour raison éthique.

Au total, 60 souris seront incluses dans cette étude.

2854. Nous nous intéressons dans ce projet à une protéine P et à son implication potentielle dans le développement/la régénération musculaire. Le gène codant pour P est un gène de fonction inconnue, exprimé spécifiquement dans les muscles squelettiques. Or, nous avons observé que son expression est significativement diminuée dans les muscles de patients atteints de dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale (DMFSH).

Nous souhaitons donc déterminer le rôle de P dans le développement/la régénération musculaire à l'aide de ce modèle, afin de comprendre l'impact de sa perte chez les patients atteints de dystrophies musculaires. Beaucoup de souris modèles de dystrophies ne présentent pas spontanément de pathologie musculaire. Celle-ci n'apparaît qu'après induction d'une lésion musculaire par injection d'une toxine. Nous comparerons les modalités de réparation de cette lésion chez des animaux contrôles et invalidés pour ce gène.

Retombées attendues dans le domaine de la santé : Avec une prévalence de 1/20 000 en France et un handicap conséquent pour les patients atteints, la DMFSH représente un enjeu thérapeutique important. Mieux comprendre les dérégulations en cause dans cette maladie permettra d'envisager des traitements éventuels pour les personnes touchées.

Conformité par rapport aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

la compréhension du rôle global de P dans la mise en place et la réparation du muscle ne peuvent se faire qu'à partir de modèles cellulaires et nécessitent l'utilisation de modèles animaux. Les animaux seront hébergés en cages ventilées avec nourriture et boisson à disposition ; des carrés de coton seront placés dans les cages de manière à enrichir le milieu. Le nombre d'animaux par groupe sera réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats. Afin de limiter au maximum la douleur et toute gêne liée au déplacement, la cardiotoxine sera injectée dans le Tibialis, muscle non indispensable à la locomotion.

De plus, les muscles prélevés seront échantillonnés de manière à pouvoir étudier les modifications d'expression de gènes et les anomalies histologiques à partir des mêmes animaux. Les animaux inclus dans l'expérience de régénération seront examinés quotidiennement après injection de la toxine, qui se fera selon une méthode standardisée et fréquemment utilisée.

Au total, 60 animaux seront inclus dans ce projet

2855. Les canaux ioniques génèrent les signaux électriques qui permettent au système nerveux de percevoir le monde, d'intégrer l'information, de créer la mémoire et de contrôler le comportement. Une des familles de canaux la plus importante et diversifiée est la famille des canaux potassiques. Parmi ces canaux, les canaux K2P sont à l'origine d'un courant, dit de fuite ou de fond, décrit par Hodgkin et Huxley dans les années 1950. Ces canaux ont une fonction de pivot dans l'établissement du potentiel de membrane cellulaire et dans le contrôle de l'excitabilité neuronale. Leur activité basale conduit le potentiel de membrane à des valeurs proches du potentiel d'équilibre du potassium (-90 mV) et donc réduit l'excitabilité cellulaire. Ces canaux jouent donc un rôle clé dans la régulation de l'excitabilité cellulaire. Ils jouent aussi un rôle central dans la réponse de la cellule à divers signaux intracellulaires et extracellulaires tels que le pH, l'étirement membranaire ou encore la signalisation intracellulaire induite par l'activation des récepteurs couplés aux protéines G. Chez les mammifères, 15 gènes codant pour des canaux à 2 domaines P ont été identifiés. Ces gènes peuvent être divisés en 6 sous-familles en fonction des homologies de séquence et des propriétés fonctionnelles.

Leur étude nécessite de pouvoir les exprimer dans un système d'expression hétérologue dépourvu d'autres canaux ioniques similaires afin d'en déterminer la fonction et leur pharmacologie. Ces canaux présentent une activité basale extrêmement faible et sont donc difficile à étudier. Le système d'expression de l'ovocyte de xénope est un très bon système pour étudier ces canaux ioniques. En effet, il est dépourvu de canaux endogènes et à la particularité d'exprimer les canaux avec une très grande efficacité. De part leur taille et leur grande capacité à synthétiser les protéines, les ovocytes de xénope apparaissent être le seul système permettant d'exprimer ces canaux afin d'en étudier leur fonction.

C'est pour cela que nous demandons l'autorisation de prélèvement d'ovocytes de xénopes à partir de xénopes (*Xenopus laevis*).

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous avons mis en place un système permettant d'augmenter la durée de vie des œufs après prélèvement ce qui permet une réduction immédiate du nombre d'animaux utilisés. D'autre part, les grenouilles seront opérées à deux reprises en ménageant un temps de récupération, diminuant encore par 2 le nombre d'animaux. Nous n'opérerons que 2 fois les xénopes afin qu'ils ne se réveillent qu'une seule fois d'une opération (raffinement).

64 xénopes seront utilisés pour la totalité du projet.

2856. Les animaleries d'hébergement suivent et contrôlent leur statut sanitaire régulièrement en contrôlant l'accès des animaux uniquement sur accord d'un vétérinaire référent et suite à la consultation de contrôles sanitaires et font régulièrement des tests sanitaires dans leur locaux.

Suivant le statut sanitaire d'une animalerie, il se peut que des animaux ne puissent pas être transférés d'un établissement utilisateur vers un autre ce qui peut être un frein à un projet et au bon déroulement de la recherche scientifique.

Pour palier ce problème de statut sanitaire, nous proposons à la communauté scientifique de réaliser la décontamination de leur lignée. Ceci signifie de rendre des lignées dépourvues de pathogènes spécifiques.

La technique consiste à prélever des ovules fécondés chez des femelles au mauvais statut sanitaire et à les implanter dans des femelles au bon statut sanitaire. Ainsi la descendance sera dépourvue des pathogènes souhaités et pourront être transférés dans l'animalerie voulue.

Pour ce projet, un maximum de 4884 animaux sera utilisés. Pendant toute la durée du projet nous respecterons la règle des 3R conformément à la réglementation :

\*Remplacement : nous ne pouvons utiliser que des souris qui sont d'intérêts pour les chercheurs. Si le chercheur ne souhaite pas obtenir une lignée tout de suite, nous proposons la cryopréservation de sperme ce qui permet de conserver une lignée non respirante.

\*Réduction : le nombre de mâles et de femelles utilisées par lignée pour les transferts d'embryons est le minimum requis pour obtenir les animaux d'intérêt suite à la redérivation. Les mêmes mâles vasectomisés sont utilisés pour plusieurs lignées pendant 2 ans.

\*Raffinement : Les animaux ont tous une période d'acclimatation d'au moins une semaine et leur milieu de vie est contrôlé. Toutes les cages sont enrichies avec des carrés de coton compactés qui permettent de ronger et de créer des nids et des maisons en plastique rouge. Lors de chirurgies, les animaux reçoivent une anesthésie et une analgésie adéquates pour éviter toute douleur. Les animaux sont manipulés par du personnel compétent pour éviter tout stress.

2857. Un dysfonctionnement du système immunitaire peut provoquer la rupture de la tolérance au soi et être à l'origine du développement des maladies auto-immunes. Ainsi, la connaissance approfondie des mécanismes immunologiques impliqués dans la tolérance représente un enjeu capital pour améliorer à la fois la compréhension et le traitement des maladies auto-immunes.

L'objectif de ce projet est maintenir une colonie de rat déficient pour le gène Rag 1 de rat. En pathologie humaine, cette mutation entraîne des déficits immunitaires combinés sévères (DICS) consistant en des défauts complets génétiquement déterminés de l'immunité adaptative. U défaut de réarrangement somatique des gènes des récepteurs de l'antigène des lymphocytes T (TCR) et des lymphocytes B (BCR), étape indispensable à la différenciation et à la diversification des lymphocytes T et B, conduit à l'absence de lymphocytes T associée à l'absence de lymphocytes B contrastant avec la présence normale de cellules NK.

Nous avons précédemment mise en place et caractériser une partie du phénotype de ces animaux. Ceux-ci vont nous servir comme modèle d'étude pour la création d'une plateforme de rats humanisés. Le choix du rat repose essentiellement sur le fait que ces animaux présentent de plus fortes similitudes immunologiques et génétiques avec l'homme que la souris et que les études fonctionnelles seront plus faciles à réaliser.

Nous limiterons au maximum le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans à 770 rats (femelles et mâles). Les procédures mises en place nous permettront d'optimiser la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner). Afin de réduire, en fonction des résultats statistiques obtenus sur les modèles in vivo, les différents groupes d'expérimentations pourront se limiter à un n=5 au lieu de 10. Afin de raffiner, des procédures visant à diminuer la douleur (métacam, lidocaïne) seront mis en place. Nous prendrons en compte tous les éléments nécessaires afin de limiter au maximum la douleur de l'animal.

2858. Remplacer la trachée est indispensable pour traiter certaines tumeurs ou des affections bénignes comportant un risque d'asphyxie, chez l'adulte et chez l'enfant.

Alors que la greffe d'organe (foie, rein, cœur, poumons) est au point, celle de la trachée a, jusqu'à présent, échoué à cause de la difficulté à assurer l'apport sanguin (revascularisation) au niveau du greffon, et à son rejet, dont le support essentiel est sa surface de revêtement interne (épithélium).

Ayant récemment réussi la greffe de segments courts de trachée dénudée de son épithélium, sans traitement antirejet, chez le lapin, il est indispensable d'effectuer des expérimentations analogues dans une autre espèce : le miniporc, dont la trachée a une forme et un diamètre très proches de ceux de l'homme. Trente et un miniporcs seront utilisés. Après sédation puis sacrifice, 9 serviront de donneurs de trachée. Chacune sera dénudée de son épithélium et stockée, après congélation, dans une banque de tissus.

La première phase consistera, chez 10 receveurs, en l'enveloppement d'un segment décongelé de greffon trachéal dans l'épiploon (un feuillet de tissu particulièrement riche en vaisseaux sanguin, situé dans l'abdomen) afin de s'assurer de sa revascularisation effective, et confirmer l'absence de rejet, comme précédemment observé chez le lapin.

En cas de succès, on pourra mettre en œuvre la transplantation trachéale proprement dite chez 12 receveurs : après une phase de revascularisation dans l'épiploon pendant 3 semaines, les greffons seront transposés au cou et serviront à remplacer un segment de la trachée du receveur. Un tuteur interne en silicone (« stent ») sera mis en place pendant la phase de cicatrisation du greffon et de régénération de l'épithélium. Les animaux feront l'objet d'une surveillance bronchoscopique (identique à celle effectuée chez les humains), afin de surveiller la perméabilité du « stent » ; et enfin procéder à son ablation par les voies naturelles au bout de 3 mois.

Toutes les procédures seront effectuées sous anesthésie générale, et un traitement antidouleur sera administré en phase postopératoire, à base de morphinomimétiques. Après sédation, l'ensemble des receveurs seront sacrifiés, après des périodes programmées de 6 à 360 jours, afin d'étudier les segments de trachée transplantées.

Un nouveau succès de cette expérimentation animale autoriserait alors une prise en charge chez l'homme de certaines affections de la trachée jugées, jusqu'à présent, incurables.

2859. 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 plan des traitements, l'arsenal pharmacologique disponible concernant l'anxiété et le stress présente de nombreuses limitations dues aux effets secondaires importants et/ou à 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 du labyrinthe en croix surélevé (LCS) est l'un des modèles d'anxiété les plus utilisés chez le rongeur. C'est donc un outil de choix pour l'évaluation de nouveaux traitements.

Ce test est basé sur l'aversion innée des rongeurs pour les espaces ouverts. Le dispositif est composé de 2 branches ouvertes et de 2 branches fermées organisées en forme de croix autour d'une zone centrale. L'ensemble est surélevé par rapport au sol. Au début du test, le rat est placé dans la partie centrale du labyrinthe qu'il peut explorer librement pendant 5 minutes. Dans

cette situation, les animaux évitent les branches ouvertes qui sont aversives. Ce comportement est lié à l'anxiété de l'animal et un rat traité avec un agent anxiolytique explore de manière accrue l'espace ouvert.

L'objectif du présent projet est d'évaluer les propriétés anxiolytiques de mélanges de peptides fonctionnalisés innovants d'origine naturelle dans le LCS. Le projet se situe dans le cadre de la recherche d'aliments fonctionnels modulateurs de l'humeur.

Dans ce projet, 196 rats seront utilisés en 2 lots de 98 rats pour la réalisation de 2 expérimentations, chacune utilisant 6 groupes de 16 animaux chacun et 2 animaux trêce. Ils seront hébergés par 2 dans des cages ouvertes de 1300 cm<sup>2</sup> de surface, 18 cm de hauteur, sans enrichissement pour ne pas modifier le comportement des animaux par rapport à nos conditions de test standard, et placés en cycle de lumière inversé (lumière de 20 h à 8 h). Un autre projet visant à incorporer de l'enrichissement pour le même type d'étude est en cours de réalisation. Dans chaque expérimentation, trois groupes de rats recevront des combinaisons peptidiques différentes. Les effets de ces combinaisons sur le comportement des rats seront comparés aux effets du Véhicule, du Diazépam (anxiolytique de référence) et d'une référence interne d'origine naturelle. Pour cela, ces peptides seront administrés par voie orale à des rats mâles Sprague Dawley adultes dont le comportement sera évalué 1 h plus tard dans le Labyrinthe en Croix Surélevé. Ce test qui dure 5 minutes est une situation comportementale de référence pour la mesure du comportement de type anxieux chez le rat. Les produits utilisés sont connus pour n'induire aucune toxicité aux animaux ni aucune douleur et l'animal a la possibilité de se soustraire à la partie anxiogène du dispositif en restant dans les branches fermées du labyrinthe. Les animaux seront mis à mort à l'issue de ce test ou réutiliser pour de la recherche interne (mise au point d'une nouvelle procédure ou d'un nouveau modèle).

Le nombre d'animaux a été choisi sur la base d'une étude de puissance (puissance statistique de 80%) basée sur des données historiques avec un produit similaire.

L'utilisation d'animaux est nécessaire pour étudier les effets anxiolytiques de nouveaux produits car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) (remplacement). Le nombre d'animaux utilisé a été déterminé par une approche statistique pour ne pas utiliser trop d'animaux tout en maximisant la probabilité d'observer un effet en cas d'efficacité des traitements (réduction). Les conditions d'application du test ont été optimisées pour le minimum d'anxiété nécessaire à la réalisation du test (raffinement).

2860. La migraine se caractérise par des céphalées accompagnées d'une hypersensibilité sensorielle (phonophobie, photophobie, allodynie mécanique). La sensibilisation du système nerveux central sous-tendant les manifestations de la migraine a été étudiée sur le plan neuronal en mettant en évidence une modification pathologique de la plasticité des réseaux, des récepteurs, des synapses etc... Cependant nous savons que le tissu nerveux non neuronal, comme les astrocytes sont significativement impliqués dans la modulation des messages nociceptifs notamment l'allodynie mécanique qui correspond à la sensation douloureuse déclenchée par un stimulus non douloureux. L'allodynie constitue un des symptômes majeurs, et des plus impactants sur la qualité de vie. Afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans la migraine, il apparaît donc nécessaire de savoir si les astrocytes jouent un rôle majeur dans ses mécanismes physiopathologiques. Pour ce faire, et sachant qu'il n'existe objectivement aucune méthode alternative pour ce type d'étude, nous proposons d'étudier l'implication de l'activité des astrocytes dans un modèle animal de migraine où la nociception céphalique et l'allodynie est mesurée chez le rat anesthésié. L'allodynie est déclenchée par injection supra-méningée d'une "soupe inflammatoire". Les messages nociceptifs sont enregistrés dans le noyau du trijumeau, premier relais central des messages nociceptifs céphaliques et en particulier ceux en provenance des méninges. L'intérêt de ce type de préparation tient au fait que la mesure de la nociception (douleur), même si réalisée chez le rat anesthésié, est basée sur des activités neuronales qui permettent de quantifier objectivement en nombre de potentiels d'action le niveau de nociception en relation avec des stimulations périphérique calibrées.

Le monitoring continu des paramètres cardio-respiratoires nous permet de contrôler la perception de la douleur durant la chirurgie et tout au long de l'expérience. Il s'agit d'une expérience sans réveil, avec donc une mise à mort en fin d'enregistrement par injection d'une dose létale de pentobarbital. L'implication des astrocytes est testée après des mesures avant et après administration intracisternale de différents agents modulateurs de l'activité de ces cellules (1 seul agent est testé par animal). Le nombre de rat par groupe (n=10) est réduit au maximum tout en permettant de discriminer un effet significatif entre les traitements et calculé par tests statistiques adaptés. Chaque animal est enregistré en conditions témoins avant injection des agents astrocytaires ce qui contribue au respect des "R" réduire et raffiner. Le nombre total d'animaux pour ce projet est de 50 rats adultes mâles répartis en 5 groupes de 10 (groupes témoins + groupes agents astrocytaires).

2861. Dans le cadre d'un projet de développement de molécules thérapeutiques, nous souhaiterions comparer l'effet de 3 molécules, l'Ethinylestradiol, l'Eburnamonine et la Doxorubicine, sur un modèle de lymphomes primitifs des séreuses (PEL) chez des souris immunodéficientes, généré par l'inoculation intrapéritonéale de cellules BC3, une lignée cellulaire PEL. Les objectifs de ce projet seraient de valider les études préalables effectuées in vitro sur cultures cellulaires et le cas échéant, pouvoir démarrer un essai clinique avec l'Ethinylestradiol et l'Eburnamonine, à des fins de développement thérapeutique dans la maladie de Kaposi et/ou du PEL. Pour se faire, l'essai se déroulerait sur une période de 2 mois et comprendrait 28 souris mâles NOD/SCID âgées de 6 semaines réparties en 7 groupes (4 souris par groupe) en fonction des traitements qui leur seront administrés. La totalité de l'expérimentation sera conduite trois fois. Conformément aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, le nombre d'animaux se restreint au minimum nécessaire afin d'avoir des résultats significatifs. De plus, l'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement par du personnel compétent qui veilleront au bien-être et à toutes anomalies pouvant entraîner des douleurs. Les animaux témoins n'ayant reçu ni molécules ni cellules

seront réutilisés dans une prochaine étude. La décision de les garder en vie sera prise par le responsable du projet, Monsieur Vincent Calvez.

2862. Les êtres humains peuvent être victimes d'un grand nombre de maladies génétiques (dus à des mutations du génome touchant la lignée germinale, et donc leur descendance). Dans ce cas, les enfants peuvent naître avec des déficits en protéines indispensables à la vie. Parmi les options thérapeutiques existantes, l'administration de la protéine manquante sous forme thérapeutique est une des alternatives possibles. La production de ces protéines, pour avoir une efficacité thérapeutique, doit obligatoirement se faire dans un système qui permet à la protéine d'avoir la conformation et l'activité fonctionnelle (exemple enzymatique) requise. Parmi les différentes possibilités qui existent pour atteindre ce but, la production puis la purification des protéines thérapeutiques à partir de lait de mammifères est une des plus efficaces.

Cette demande d'autorisation de projet concerne donc la création de lignées de lapins transgéniques capables de produire plusieurs protéines recombinantes humaines dans le lait des femelles, sur une période de 5 ans.

Ces protéines recombinantes auront pour objectif de soigner, en fonction des objectifs scientifiques déterminés par la direction scientifique de l'entreprise, des maladies génétiques orphelines létales (maladies de Pompe, Gaucher, Fabry, liste non exhaustive) ou plus fréquentes, telles que les hémophilies. Les protéines recombinantes produites pourront aussi soigner des maladies environnementales comme des intoxications aux pesticides, des addictions à certaines drogues et les effets de gaz neurotoxiques utilisés lors d'attaques terroristes.

Actuellement, la technologie la plus efficace pour créer des lignées de lapins transgéniques produisant des médicaments dans le lait est la transgénèse par micro-injection d'un fragment d'ADN permettant la production du médicament, dans le noyau d'embryons au stade une cellule. Cette technologie requiert donc l'utilisation de lapines comme donneuses d'embryons, d'autres comme femelles receveuses d'embryons et des lapins mâles reproducteurs.

Nous prévoyons d'utiliser au maximum 3630 lapins (donneuses d'embryons, conservation des lignées transgéniques et mâles reproducteurs) pour ce projet.

Il n'est pas possible de produire ces protéines actives et correctement glycosylées (et avec gamma-carboxylation) en système cellulaire, et le choix de l'espèce lapin est le meilleur pour le but recherché.

Dans le cadre de la Réduction, notre stratégie de création de lapins transgéniques est basée sur un maximum de journées entières de manipulation (récupération des embryons, micro-injection et réimplantations) en un minimum de semaines. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés par jour de manipulation, les lapines reçoivent un traitement de super-ovulation qui augmente le nombre de follicules ovulés, elles sont accouplées avec des mâles reproducteurs puis euthanasiées. Les embryons récupérés sont micro-injectés puis réimplantés dans des femelles de même stade hormonal, dites « receveuses ». Après la gestation, ces femelles receveuses seront recyclées en tant que femelles « donneuses » afin de micro-injecter dans leurs embryons l'ADN de cette même protéine ou de la protéine d'intérêt suivante. L'optimisation de l'utilisation des lapines nous permet de réduire jusqu'à 50% le nombre d'animaux utilisés pour l'ensemble du projet. Cette Réduction par optimisation est complétée par les méthodes de Raffinement suivantes. Toutes les interventions seront faites sous anesthésie et les animaux recevront des anti-inflammatoires locaux et généraux après chaque intervention. Les animaux seront systématiquement tranquilisés, même pour les interventions non invasives comme la traite.

Nous réaliserons ensuite l'élevage des animaux transgéniques et différentes expérimentations seront menées en fonction du modèle créé (caractérisation génotypique, prélèvement de lait, sang, sperme). Nous élèverons également des animaux de phénotype sauvage pour la production d'embryons liée à l'activité de transgénèse et pour l'accouplement avec les animaux transgéniques afin de générer des descendants (F1, F2). Ceci permettra de fonder les élevages des animaux qui produiront les protéines thérapeutiques.

2863. L'abus d'alcool et les infections chroniques par les virus de l'hépatite B (VHB) et C (VHC) représentent les causes majeures de fibrose et de cirrhose, pouvant évoluer chez certains patients vers un carcinome hépatocellulaire (CHC), qui est le cinquième cancer le plus fréquent et la deuxième cause de mortalité par cancer dans le monde. Les options thérapeutiques du CHC sont limitées et il n'existe pas de méthode préventive du CHC. Grâce à l'analyse du profil d'expression des gènes de cellules de foie cultivées dans des conditions mimant les agressions à l'origine de ces maladies hépatiques (infection par VHB ou VHC, alcool ou autre), nous avons pu identifier un profil d'expression de gènes associé à un fort risque de transformation tumorale. Ces gènes représentent des cibles potentielles de nouvelles approches thérapeutiques destinées à ralentir, limiter voire empêcher le développement de la fibrose, de la cirrhose, voire du CHC. La présente demande concerne l'évaluation de la capacité de certaines molécules à diminuer le développement chez le rat de la fibrose ou de la cirrhose induites par des injections de diethylnitrosamine (DENA), une molécule toxique pour le foie, selon le protocole rapporté par Schiffer et al., *Hepatology* 2005 ; 41 : 307-314 et par Fuchs et al., *Hepatology* 2014 ; 59 : 1577-1590 (cf Annexe 1) :

- une injection intrapéritonéale hebdomadaire de DENA à 50 mg/kg sera réalisée durant 18 semaines sur des rats Wistar mâles de 100g, conduisant au développement d'une fibrose puis d'une cirrhose et d'un CHC.

- Le traitement par les molécules candidates sera soit initié le jour de la première injection de DENA et jusqu'à la semaine 18 (protocole de prévention), soit des semaines 13 à 18 après le début d'administration de DENA (protocole de traitement).

- Les groupes témoins seront :

- i) pas d'injection de DENA, témoin négatif d'induction de maladie hépatique (N=4)
- ii) injection de DENA + véhicule, témoin positif d'induction de maladie hépatique (N=8)
- iii) injection de DENA + erlotinib 2 mg/kg (témoin positif de chimioprévention). (N=8)

3 groupes expérimentaux seront testés en parallèle pour un nombre total (incluant les témoins injectés avec DENA) de 5 groupes de 8 rats traités au DENA.

Les administrations de molécules seront réalisées par injections intrapéritonéales quotidiennes cinq fois par semaine. Huit rats par lot seront utilisés, pour un nombre total maximum de 264 rats. Un monitoring non invasif de la maladie hépatique sera réalisé par CT-scan aux semaines 9, 13 et 19. Au terme de l'étude (semaine 20), les animaux seront mis à mort pour analyse histologique et transcriptomique du foie, ainsi que pour une analyse des taux sanguins d'enzymes hépatiques (serum alkaline phosphatase –ALP-, alanine transaminase –ALT-, aspartate transaminase –AST- et bilirubine totale –TBIL-).

Respect des 3R :

Un monitoring régulier du développement de la maladie par CT-scan permettra d'utiliser chaque animal comme son propre témoin, donc de réduire le nombre d'animaux requis par rapport à une analyse cinétique en histologie, qui nécessiterait de mettre à mort un nombre plus important d'animaux. De plus, cette modalité d'imagerie est non-invasive, ce qui permet de raffiner le monitoring, par rapport à un monitoring des enzymes hépatiques par prélèvement sanguin. Afin de limiter les douleurs liées aux injections intrapéritonéales répétées, du paracétamol sera ajouté chaque semaine à l'eau de boisson (1 mg/ml) durant toute la durée de l'expérience. Les cages seront enrichies avec des nids de coton à gratter, changés à chaque change de cage et des jouets (tubes).

2864. Les biomarqueurs obtenus par la technique d'imagerie en clinique dans le diagnostic et les prises en charge thérapeutiques sont devenus incontournables. Une amélioration constante de ces techniques permet l'élaboration de dispositifs plus performants adaptés aux systèmes d'imagerie destinés à l'homme lors d'assistance chirurgicale.

Le développement de l'imagerie préclinique in-vivo permet des approches translationnelles applicables à l'homme. Aucune expérience d'imagerie in vitro, ne peut remplacer l'expérience d'imagerie réalisée sur un animal vivant avec sa complexité anatomique et physiologique. L'imagerie in vivo du petit animal est donc une technologie en pleine expansion. Les systèmes d'imagerie optique basés sur la détection de la fluorescence à résolution macroscopique (Spectrum-CT® ou Odyssey®) et un microscope endoscopique (Cellvizio®) à résolution au niveau cellulaire, permettent de tester non seulement des sondes fluorescentes innovantes mais également de visualiser les effets des produits pharmacologiques sur les paramètres de l'image obtenue dans différentes régions cérébrales et organes périphériques. Ces techniques d'imageries minimalement invasives permettent de suivre au cours du temps le développement d'une pathologie et l'efficacité d'un traitement thérapeutique sans avoir à euthanasier des animaux à différents intervalles de temps. En suivant en longitudinal le même animal (suivi de l'évolution d'une pathologie ou d'un traitement), ces techniques d'imageries conduisent à diminuer le nombre total d'animaux à utiliser.

Ces techniques d'imageries utilisant des sondes fluorescentes moléculaires variées participeront à l'évaluation du potentiel thérapeutique, de la visualisation in-vivo de l'expression de promoteurs ou de gènes d'intérêt, de la biocompatibilité, de la toxicité, de la cinétique et des effets doses d'une entité pharmacologique (petites molécules, peptides, plasmides DNA, SiRNA, Anticorps..) d'un bio matériel synthétique ou naturel ou d'un hydrogel-composite synthétique.

Des animaux transgéniques à phénotype non dommageable pourront être étudiés dans le cadre de ce projet

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 relatifs à 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 par des experts de la spécialité, afin d'optimiser et réduire 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 de maximum 6000 rongeurs pour 5 ans.

2865. Les maladies du système nerveux (Parkinson, Alzheimer, Huntington, ...) sont une préoccupation croissante en santé publique. De nouveaux outils diagnostiques associés à de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires pour améliorer la prise en charge des patients.

La Maladie d'Alzheimer (MA) est un enjeu majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de contrecarrer l'évolution naturelle de la maladie. La découverte d'un nouveau traitement pour la maladie d'Alzheimer (seuls 4 médicaments peu efficaces actuellement sur le marché) pourra être considérée comme une révolution que ce soit en termes de nombre de patients (actuellement 26 millions de cas dans le monde; 65 millions en 2030 en l'absence de nouveaux traitements. 870.000 cas en France) qu'en termes humains (répercussions sur la santé des conjoints) et financiers pour le système de santé.

Les différents échecs observés chez l'Homme suite à des études précliniques prometteuses pourraient en partie s'expliquer soit par l'imperfection des modèles animaux de la MA utilisés jusqu'alors soit par l'absence de cibles thérapeutiques alternatives. Le projet a comme but final de développer un modèle de la composante amyloïde de la MA chez le rongeur, ceci par transfert de gènes. Ce modèle sera également utilisé pour valider l'efficacité d'approches thérapeutiques.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité dans des élevages reconnus. Leur nombre (3100 rongeurs) a été réduit au minimum nécessaire afin d'obtenir des données suffisantes pour valider le développement de nouveaux modèles rongeurs ainsi que de caractériser l'efficacité de 3 nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes. Le recours à l'animal est nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau en particulier les interactions structurelles et fonctionnelles de ces cellules.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux.

2866. Pour les études in vitro de l'embryon de souris, les chercheurs ont besoin de fluides biologiques pour garantir un développement normal de l'embryon. Les embryons de souris sont incontournables dans les études du développement.

Ce protocole vise à produire un sérum de rats mâles très propre, exempt d'hémolyse, utilisé comme milieu de culture pour des études de développement de l'embryon de souris. Pour l'instant il n'existe pas de substituts synthétiques au sérum de rats, permettant la mise en culture d'embryons d'une telle qualité.

Cette manipulation permet en outre d'épargner de nombreuses femelles souris gestantes. En effet, le sérum d'un seul rat permet de voir évoluer in vitro plus d'une dizaine d'embryons de souris pendant un laps de temps pouvant aller jusqu'à 24h. Sans ce sérum, cette expérience demanderait le sacrifice d'un nombre considérable de mères souris, pour arriver au même résultat.

Les rats sont d'anciens reproducteurs qui arrivent en fin d'utilisation chez l'éleveur. Pour obtenir le maximum de sérum avec le plus petit nombre d'animaux, nous privilégions les mâles dont le poids corporel, et donc le volume sanguin, est bien supérieur à celui des femelles. Ces animaux étant destinés à l'euthanasie, nous les réutilisons pour prélever leur sang sous anesthésie générale. Il n'y a pas de naissances de rats dédiés spécifiquement à cette production de sérum.

Nous utiliserons environ 400 rats pour ce projet, soit 20 rats par trimestre, 80 rats par an.

2867. 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 une molécule antivirale ayant une activité complémentaire à celle de notre produit d'immunothérapie.

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 184 souris maximum.

2868. Les tumeurs neuroendocrines (TNE) sont des tumeurs rares, hétérogènes dans leur présentation anatomopathologique et clinique. Lorsqu'elles sont découvertes au stade métastatique, ce qui concerne 50% des patients au moment du diagnostic, peu de stratégies thérapeutiques efficaces sont actuellement disponibles. Ces tumeurs sont en effet peu sensibles aux chimiothérapies conventionnelles. Elles répondent cependant à 2 nouvelles thérapies ciblées : l'anti-mTOR, l'éverolimus, ou l'inhibiteur à plus large spectre de kinases, le sunitinib. L'efficacité de ces thérapies est partielle et temporaire, avec l'apparition de résistance au bout de quelques mois de traitement. Les modèles d'étude actuels in vitro ne suffisent pas pour comprendre précisément les processus impliqués dans cette résistance. Le but de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes de progression tumorale et d'évaluer de nouvelles cibles thérapeutiques en utilisant un modèle préclinique de développement de nodules métastatiques chez la souris nude.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Ce projet a des applications directes à court terme afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients. Nous pourrions ainsi tester des combinaisons thérapeutiques prometteuses actuellement étudiées in vitro.

A long terme, il permettra de mettre en évidence les mécanismes moléculaires impliqués dans la progression tumorale et de développer de nouvelles thérapies moins toxiques et plus ciblées pour le traitement des TNE. Ces travaux pourraient également déboucher sur l'identification de facteurs prédictifs de réponse et de résistance au traitement.

### 3- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

- Tous les tests effectués sur les animaux reposent sur des résultats déjà obtenus ou en cours de validation in vitro.

- Les modèles de xénogreffes caecale et splénique sont largement utilisés au niveau international mais également dans notre centre pour des études de progression tumorale ou de réponse aux traitements. Ils sont nécessaires à la validation de nos études in vitro. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permet la réalisation des procédures expérimentales dans des conditions optimales.

- Le nombre d'animaux/groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats, compte tenu que la réalisation du protocole repose sur une procédure maîtrisée par les expérimentateurs.

### 4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet : 3792 souris

2869. L'objectif de ce projet de recherche est de mettre à profit les résultats d'études de génétique clinique afin de développer de nouveaux modèles de souris pour comprendre les mécanismes responsables de la symptomatologie et améliorer les traitements des patients. L'ADN provenant de patients atteints de maladies rares est centralisé dans une collection biologique et les données médicales efférentes dans une base de données (D4/phenodent). Cette approche (financée au titre d'un programme de l'Union européenne) nous permet de recueillir des connaissances significatives sur les maladies rares. Nous avons caractérisé le profil d'expression de plusieurs gènes responsables de maladies rares en clonant leurs homologues de souris. Pour certains de ces gènes, nous créons l'équivalent des mutations rencontrées chez les patients dans un modèle animal (souris). Ce processus est long, mais essentiel pour comprendre l'étiologie de la maladie, et ensuite élaborer des stratégies de traitements. Nous analysons un modèle murin d'inactivation du gène *Smoc2*. Ce gène code pour une protéine ayant des rôles probables dans le développement dentaire, l'ostéogenèse, le contrôle de la prolifération cellulaire, et la vascularisation. Chez l'homme, la mutation de *SMOC2* résulte en une oligodontie (dents manquantes et/ou réduites) et un déficit de croissance de l'os alvéolaire. Nous utiliserons le modèle murin pour analyser la croissance osseuse et le rôle potentiel de cette protéine dans (i) le traitement de l'ostéoporose, (ii) l'amélioration de l'ostéointégration des implants dentaires, et (iii) la promotion des métastases cancéreuses.

Nous analyserons le développement osseux dans le modèle murin en utilisant des techniques non invasives – donc les souris seront anesthésiées. Des prélèvements sanguins, et des traitements chirurgicaux (implants chirurgicaux dans la cavité buccale) seront effectués. L'ovariectomie (mimant la ménopause chez la femme) accentuera l'ostéoporose. Nous allons tester les effets de l'administration de la protéine *Smoc2* sur un modèle murin d'implants dentaires. Ceci exigera une anesthésie et une surveillance post-opératoire attentive. Nous étudierons également l'effet d'une alimentation déficiente en vitamine D et calcium.

Nous proposerons aussi l'étude d'autres modèles murins (Rogdi).

L'objectif de notre projet est de comprendre le rôle des gènes et des anomalies génétiques de patients atteints de maladies rares touchant la cavité buccale et les dents en étudiant les souris reproduisant ces maladies. Ainsi, ces souris seraient un modèle permettant d'étudier des maladies à ce jour très mal connues chez l'Homme, puis éventuellement de tester des traitements pour ensuite mieux traiter les patients humains atteints par ces syndromes.

Ce projet va donc être réalisé en utilisant des souris génétiquement modifiées, seuls animaux chez lesquels les techniques de mutation génétique pertinentes pour cette étude sont actuellement bien maîtrisées. De plus l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode in vivo ne peut remplacer le développement et la génétique avec ses interactions dans l'organisme.

La mutation génétique étudiée a des conséquences sur l'animal. Afin de réduire toute souffrance à son minimum, les animaux seront euthanasiés dès les premiers signes de perte de poids. Le stress induit par les traitements sera également réduit en administrant au maximum les substances dans l'eau de boisson. Le stress ou la faible douleur induite par les prises de sang seront également réduits par l'utilisation d'anesthésiques locaux ou généraux selon les volumes prélevés et les sites de prélèvement.

Ainsi, dans ce projet un total de moins de 1550 animaux sera utilisé lors des procédures expérimentales.

Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. De même, les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter tout duplicata d'étude.

2870. La gastrite se caractérise par une inflammation de la muqueuse gastrique. Cette inflammation est la résultante d'une dérégulation entre des facteurs protecteurs (mucus, prostaglandines) et des facteurs d'agression (alcool, tabac, sécrétions acide ou prise d'anti-inflammatoires). Elle constitue un problème important en Santé Publique en raison de sa prévalence élevée (30 à 50 % de la population) et des douleurs qui l'accompagnent.

Les objectifs de ce projet sont d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques pour le traitement de la gastrite ou d'évaluer les dommages au niveau gastrique liés aux effets secondaires de nouvelles molécules thérapeutiques.

Pour répondre à ces objectifs, le rat ou la souris pourront être utilisés et 2 modèles seront développés :

- le modèle induit par l'administration d'un anti-inflammatoire non stéroïdien (l'indométacine)
- le modèle induit par l'administration d'éthanol/HCl (acide chloridrique)

Ces deux modèles sont utilisés dans la littérature pour induire des lésions gastriques chez le rongeur, se rapprochant de la pathologie humaine.

Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 2640 rats et 2640 souris en raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. Le détail du nombre d'animaux sera présenté pour chaque procédure. Afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, différents types d'enrichissement pourront être ajoutés aux animaux, tels que :

- Des Nestlets (carré de coton pur), permettant aux souris de faire une nidation (uniquement utilisé chez la souris) ;
- Des Aspen brick (bâtons à ronger) permettant aux animaux d'assouvir leurs besoins de rongement et limitant les querelles entre les mâles.
- Des igloos ou des tunnels, permettant le jeu et le repos des animaux.

Nous ne pouvons utiliser de médication analgésique puisque la pathologie que nous souhaitons mimer est une pathologie inflammatoire. Cependant, un contrôle quotidien sera réalisé afin de s'assurer de l'état général des animaux et de détecter des comportements atypiques suite aux éventuels effets secondaires des traitements :

- Altérations des fonctions normales (impossibilité d'uriner, de s'alimenter...),
- Vocalisation, tremblements...,
- Perte de poids élevée (mais < 20% du poids initial),
- Posture anormale (voûté ou déséquilibré pour soulager une zone douloureuse, démarche anormale, diminution des mouvements, prostration),
- Détection/présence d'une anomalie (plaie, pilo-érection...),

Dans le cas où l'animal présenterait des difficultés pour s'alimenter ou s'abreuver, l'accès à l'aliment et à la boisson lui serait facilité en plaçant ces derniers directement dans la cage. Si l'état général de l'animal ne s'améliorait pas au cours de la journée (les observations s'effectuant le matin) et qu'aucune solution ne pouvait être apportée, ce dernier serait mis à mort. De même, si un animal avait une perte de poids supérieure à 20%, l'expérimentateur mettrait à mort l'animal.

Ainsi ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

2871. L'objectif du projet est l'obtention d'anticorps polyclonaux de mouton, dirigés contre les antigènes spécifiques des bactéries pathogènes, recherchées dans les produits alimentaires : *Listeria*, *Salmonelles*, *Escherichia Coli* O157: H7, *Staphylocoques* (toxines A,B,C,D,E)

Ces anticorps polyclonaux sont utilisés pour la réalisation de tests de détection, ou d'enrichissement préalable à la détection, des bactéries ou de leurs entérotoxines, à l'aide d'automates par les services qualité de l'industrie alimentaire.

Les immunisations à réaliser dans le cadre de ce projet porteront, en fonction des besoins en tests à fournir sur une période de 5 ans, sur 4 moutons pour chaque série d'immunisation.

Une série est nécessaire pour chaque antigène contre lequel on souhaite obtenir des anticorps polyclonaux .

Globalement, 15 séries de 4 moutons, soit 60 moutons maximum seront nécessaires :

- 2 séries pour les antigènes 1/2C et 4A de *Listeria*,
- 7 séries pour les antigènes Z29, FGX, B, Z42Z32, I, ENX et D de *Salmonelles*
- 1 série pour l'antigène d'*Escherichia Coli* O157:H7
- 5 séries pour les toxines A, B,C,D,E de *Staphylocoques*

En l'absence de modèle in-vitro performant, l'espèce mouton a été choisie. Des résultats antérieurs ont montré l'efficacité de l'immunisation chez cette espèce. La qualité des anticorps ainsi obtenus s'est révélée satisfaisante (affinité et spécificité) et répond bien aux besoins en diagnostic. Cette espèce donne la possibilité d'effectuer des prélèvements consécutifs de sang à différentes reprises, ce qui permet de produire des quantités importantes de sérum hyper-immun et ainsi de limiter le nombre d'animaux impliqués dans le projet pour couvrir les besoins pour les 5 prochaines années de production. Les anticorps de mouton ainsi produits sont poolés puis purifiés pour être utilisés dans des tests de dosage antigénique automatisés.

Les moutons, animaux grégaires, sont stabulés en petits groupes dans des conditions adaptées à l'espèce et conformes à la réglementation.

Il est probable que seules 2 ou 3 séries de nouveaux moutons soient démarrées sur la période de 5 ans compte-tenu du fait que la durée de vie productive des animaux est de l'ordre de 5 à 8 ans et que les volumes de sérum hyper-immuns récoltés sont importants, assurant ainsi une dizaine d'année de fabrication de kits.

Par expérience, ces protocoles ne sont pas susceptibles d'occasionner douleur, souffrance ou angoisse. Toutefois, la surveillance quotidienne "approfondie" de ces animaux en protocole assure, en cas de signes cliniques, le déclenchement de soins spécifiques sur les conseils d'un vétérinaire.

2872. La transplantation représente un moyen thérapeutique efficace pour contrer le dysfonctionnement de certains organes ou pour traiter différentes pathologies (comme les cancers). Cependant, des problèmes majeurs existent. Le rejet aigu, survenant plusieurs jours après la greffe et du à une reconnaissance des cellules du donneur (et particulièrement des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité) par le système immunitaire du receveur (les lymphocytes T CD4+), est aujourd'hui contrôlé par des traitements immunosuppresseurs. En revanche, le rejet chronique, survenant jusqu'à plusieurs années après la greffe, n'est à l'heure actuelle pas contrôlé. De plus, les traitements immunosuppresseurs deviennent à long terme toxiques pour les patients. Ainsi, l'un des objectifs en transplantation est de comprendre les mécanismes du rejet et d'induire une tolérance spécifique du greffon, qui permettrait au receveur de vivre sans la contrainte d'un traitement immunosuppresseur.

L'unité INSERM dans laquelle nous travaillons étudie les mécanismes liés à la survie et au rejet de greffe. Pour cela, nous devons faire appel à des modèles de greffes chez l'animal. Alors que les animaux non traités, dans un modèle de complexe majeur d'histocompatibilité incompatible, rejettent leur greffon en 7-10 jours, il est en effet possible d'éviter le rejet dans ce modèle par l'administration pendant vingt jours d'un immunosuppresseur, analogue de la deoxyspergualine, ce qui entraîne une survie à très long terme du greffon. Des expériences précédentes ont permis de mettre en évidence une accumulation de LT régulateurs CD4+CD25+ dans la rate et dans le greffon de ces animaux tolérants.

Peu d'études se sont intéressées à la réponse des lymphocytes B dans les modèles de tolérance, nous nous sommes alors penchés sur cet aspect. Ainsi, une étude récente de l'équipe a démontré qu'un transfert de LB de la rate des rats tolérants à de nouveaux rats greffés induisait une tolérance du greffon à long terme. Ce modèle animal nous permet ainsi d'étudier plus précisément les mécanismes impliqués dans le transfert de cette tolérance. Pour ce projet d'étude assez vaste, nous envisageons d'utiliser 320 animaux (rats) sur 5 ans. Nous respecterons la règle des 3R, afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés. Les animaux seront hébergés dans l'animalerie selon les normes qui leur sont propres afin de ne pas ajouter un stress supplémentaire au protocole utilisé. D'autre part, pour le bien être des animaux, des rouleaux de carton ainsi que du papier wool sont mis systématiquement dans les cages. Les animaux étant greffés selon les procédures décrites, nous utilisons des analgésiques anti-douleur le jour de la greffe mais aussi si besoin post-opératoire.

2873. La maladie de Marek est associée à un lymphome T, un cancer mortel chez la poule. Cette maladie hautement contagieuse est due à un alphaherpesvirus du genre *Mardivirus*, le virus de la maladie de Marek (MDV). Bien que la vaccination soit largement utilisée depuis les années 1970, cette maladie reste une maladie d'importance économique, chez la poule au niveau mondial. La persistance de l'infection est attribuée au fait que les vaccins préviennent la formation des tumeurs, mais n'empêchent pas la réplication du virus et son excrétion virale dans l'environnement. Aussi trouver des vaccins qui bloqueraient la maladie mais aussi l'excrétion virale est l'un des objectifs prioritaires de la recherche actuelle sur le MDV. De façon intéressante, l'herpesvirus du dindon (HVT), virus apathogène utilisé pour vacciner contre la maladie de Marek est aussi excrété dans le milieu extérieur, et cela de façon importante. Dans ce contexte, l'objectif du projet proposé est d'étudier la dynamique d'excrétion des *Mardivirus* dans l'environnement sur le long terme et les facteurs influençant cette excrétion afin d'identifier des moyens biologiques pour la prévention et le contrôle de la dissémination de MDV. Le virus vaccinal HVT - ND, vaccinant à la fois contre la maladie de Marek et la maladie de Newcastle sera pris comme modèle viral. La réponse anticorps anti-ND sera aussi suivie en parallèle, afin d'étudier cette réponse sur le long terme sur des animaux de lignées génétiquement très différentes.

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

- Remplacer : Pour évaluer les réponses, il faut disposer des mesures sur les animaux et le modèle le plus adapté pour l'évaluer sur la poule est la poule elle-même
- Réduire: des calculs statistiques ont été effectués pour estimer le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de cette expérience. Afin de réduire le nombre de poules, nous suivrons plusieurs paramètres biologiques en parallèle et une partie des expériences seront faites sur des troupeaux d'animaux parentaux.
- Raffiner : les jeunes sont élevés au sol dans des conditions comparables à celles d'élevage classique. Un enrichissement (grattoir, rondelles métalliques) sera mis en place lors de la phase d'hébergement en cages.

L'ensemble projet nécessitera l'utilisation de 112 poules.

2874. La peur est une sensation complexe qui implique de nombreux noyaux cérébraux. Ces noyaux d'une part interagissent afin d'en construire une trace mnésique et d'autre part sont à l'origine du contrôle et de la réaction physiologique à la peur. Parmi ces structures, l'amygdale, structure clef de la réponse à la peur, est largement innervée par des projections axonales ocytocinergiques (OT) originaires de l'hypothalamus. Cependant, nous ne disposons à ce jour d'aucune donnée permettant de déterminer si une population bien précise de neurones ocytocinergiques est – ou non – impliqué dans le contrôle de la peur. Ce projet, basé sur les nouvelles possibilités offertes par la manipulation des vecteurs viraux, consiste à identifier et caractériser ces projections OT par techniques de neuroanatomie ainsi que leur modulation par la noradrénaline par technique d'imagerie calcique, et leur implication dans les tests comportementaux de peur conditionnée et d'interaction sociale.

Les résultats attendus permettront à la communauté scientifique de mieux comprendre les mécanismes et populations neuronales impliqués dans la réponse à la peur.

Notre étude portant sur l'analyse de plusieurs structures cérébrales interagissant et reconnues comme impliquées dans les effets des drogues, l'intégralité du cerveau d'animaux vivants est nécessaire. Le nombre d'animaux a été réduit au strict nécessaire pour permettre des analyses statistiques. Les animaux seront hébergés - sauf exception mentionnée - à 5 par cage avec eau et nourriture ad libitum. Les cages sont enrichies avec du matériel de nidation (frisures) et des bâtons à ronger. Les rats seront placés en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie contrôlée.

Espèce utilisée : Rats Wistar

Nombre d'animaux total : 456 sur 3 ans.

2875. Dans le domaine de la cancérologie, les traitements employés se divisent en 3 groupes : la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Dans ce dernier groupe, de nouvelles modalités ont été développées comme l'irradiation par un faisceau d'ions qui possèdent des propriétés physiques et biologiques qui leur confèrent des avantages significatifs par rapport aux rayons conventionnels (rayons X) utilisés en clinique. C'est cette modalité d'irradiation qui sera étudiée dans ce protocole.

Contrairement à ces rayons conventionnels, cette technologie permet de déposer le maximum d'énergie au sein d'un volume cible circonscrit (la tumeur), tout en épargnant les tissus sains en amont et en aval. Grâce à ces propriétés, alliées à une faible diffusion latérale, la dose déposée dans les tissus peut être strictement confinée au volume cible avec une précision nettement plus grande qu'en radiothérapie conventionnelle. Ainsi, la dose d'irradiation reçue par le patient et la morbidité sont moindres.

Notre étude consiste à comparer, dans un modèle tumoral induit par injection en sous cutané de cellules cancéreuses chez la souris NMRI immunodéficiente, les effets biologiques d'une irradiation proton associée à une chimiothérapie sur la tumeur en imagerie. Ces effets seront comparés à ceux obtenus lors d'une chimiothérapie seule. La chimiothérapie employée est le topotecan administré aux doses de 1.25 voire 2 mg/kg/j pendant 2 semaines

L'irradiation sera faite au début de la 1ère ou de la 2ème semaine de chimiothérapie afin de comparer les effets biologiques de l'irradiation en fonction du temps. Les effets biologiques induits par cette irradiation unique de 10Gy seront évalués par une étude longitudinale en imagerie TEP de 20 jours au cours de laquelle la souris aura 3 séances d'imageries avec un traceur ciblant soit la prolifération soit le métabolisme cellulaire.

Afin d'obtenir des données significatives du point de vue statistique, nous utiliserons des lots de 10 souris par condition, ce qui amènerait le nombre total d'animaux à 60. En fin d'étude après la mise à mort des animaux, les tumeurs seront prélevées pour des études histologiques et biochimiques complémentaires. Les animaux sont hébergés dans des cages ventilées avec des filtres à l'entrée et à la sortie de la cage.

La règle des 3 R sera appliquée car l'utilisation de l'imagerie permet de suivre l'évolution de paramètres biologiques sur le même animal sur plusieurs jours, réduisant ainsi le nombre d'animaux. La douleur et la souffrance seront prises en compte par un suivi quotidien des animaux avec une grille de notation de la douleur et de la croissance tumorale qui déterminera les points limites ( 20% de perte de poids et volume tumoral de 2000 mm<sup>3</sup> ) nécessitant une éventuelle mise à mort de la souris. En cas de douleur, des analgésiques seront utilisés pour y remédier. Les animaux sont hébergés à plusieurs par cage avec un enrichissement. Cette étude ayant pour objectif de suivre les effets biologiques d'une irradiation proton sur la tumeur, celle-ci ne peut s'appliquer sur une étude in vitro car nous n'aurions pas l'implication du tissu environnant (vascularisation) sur les effets de cette irradiation.

2876. Les progrès réalisés dans le domaine de l'endoscopie digestive interventionnelle thérapeutique en passant par la voie naturelle du tube digestif ont permis de lui accorder une place grandissante dans le traitement curatif des lésions précancéreuses et cancéreuses superficielles du tube digestif. Contrairement à la plupart des techniques d'exérèse chirurgicale, les techniques d'exérèse endoscopique telles que la polypectomie, la mucosectomie et, plus récemment la dissection sous-muqueuse permettent un traitement conservateur de l'organe atteint associé le plus souvent à un risque moindre de morbidité/mortalité.

L'objectif de ce projet est de former des médecins gastroentérologues à des techniques d'exérèse endoscopique sur modèle vivant de porc. A cette fin, il sera organisé 4 ateliers sur une journée (3 ateliers destinés à des médecins séniors et un atelier destiné à des médecins juniors en formation) nécessitant chacun un porc anesthésié pour la réalisation de cette formation. Au total, il y aura donc 4 cochons par séance soit un total de 8 cochons par an soit 40 cochons pour 5 ans. Chaque atelier sera encadré par un médecin expert formé aux techniques d'exérèse endoscopique.

Le principe des 3R a été réfléchi comme suit :

Remplacement : La formation à une technique chirurgicale complexe ne peut se faire in fine que sur modèle vivant si nous voulons reproduire exactement les conditions opératoires. Afin de préparer au mieux cette phase sur animaux vivants, en début de séance, une mise au point orale théorique sera présentée aux participants sous format d'un diaporama power point, de films et d'images concernant la technique et les différents outils utilisés. Seront réalisées lors de cette formation la dissection sous-muqueuse et la mucosectomie œsophagienne et gastrique auxquelles seront associées des procédures de traitements endoscopiques des complications éventuelles (hémorragies, perforations). La mise en place et le recours à ce type de formation est un pré-requis indispensable à la pratique et à la diffusion ce type de technique en clinique pour la prise en charge des patients atteints de lésions précancéreuses et cancéreuses superficielles du tube digestif et la formation théorique ne peut être qu'un préambule à l'acquisition et la maîtrise de ces techniques. Le porc, de par ses similarités anatomiques avec l'Homme et sa facilité d'élevage, est le modèle idéal à cet apprentissage.

Réduction : Quatre porcs par séance seront anesthésiés pour ces travaux pratiques. Chaque porc sera opéré par un groupe de deux à trois stagiaires afin d'optimiser le nombre d'animaux : un maximum de gestes seront réalisés sur chaque animal afin d'optimiser l'apprentissage et réduire l'utilisation d'animaux.

Raffinement : Les porcs seront maintenus en groupe sociaux. Il était prévu un hébergement sur copeaux la veille de l'intervention pour éviter toute prise alimentaire mais il s'avère que les animaux ingèrent les copeaux et cette ingestion gêne fortement l'endoscopie. Il a donc été décidé de les héberger sur tapis plastiques dans un local chauffé. Un monitoring des fonctions vitales (fonction cardiaque, respiratoire, oxymétrie) permettra de s'assurer du maintien de l'anesthésie et de sa profondeur. Les animaux ne seront pas réveillés en fin de procédure.

2877. La sclérose en plaques (SEP) est une maladie neurologique caractérisée par la perte de la gaine protectrice de myéline du système nerveux central (SNC), engendrant une paralysie progressive et des troubles cognitifs. Elle constitue la première cause d'invalidité non traumatique chez les adultes de 20 à 40 ans et touche en France 1 personne sur 1000, avec 4000 nouveaux cas par an. C'est une maladie auto-immune au cours de laquelle les cellules du système immunitaire s'activent et créent une réaction inflammatoire au sein du SNC entraînant l'attaque de la myéline.

Les progéniteurs hématopoïétiques sont des cellules immatures de la moelle osseuse. Certains protocoles d'activation leur confèrent des propriétés suppressives envers la réponse immune, mises en évidence envers une autre maladie auto-immune, le diabète de type 1. Nous procéderons cette fois à l'évaluation préclinique de plusieurs de ces populations de progéniteurs hématopoïétiques activés en thérapie cellulaire dans le modèle expérimental de choix pour l'étude de la SEP qu'est l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE). L'EAE est induite chez la souris par immunisation avec une molécule issue de la myéline et suivie sur 35 jours dans sa version chronique et sur 60 jours dans sa version à rémissions et rechutes. Les progéniteurs seront injectés aux différentes phases de la maladie, afin d'étudier à quelles étapes s'exercent leurs effets : l'activation, la migration des cellules immunitaires vers le SNC ou la neuro-inflammation. Les mécanismes d'action moléculaires qui sous-tendent leur effet protecteur seront déchiffrés en préparant les progéniteurs à partir de souris invalidées pour certains gènes. Le nombre de souris nécessaires à l'évaluation de 3 populations principales de progéniteurs et leurs variants, en tout 10 populations, est estimé à 998. La règle des 3R sera mise en œuvre 1) en sélectionnant des populations de progéniteurs déjà démontrés suppresseurs in vitro, ce qui permet de réduire le nombre d'expériences, 2) en induisant la maladie avec une préparation commerciale calibrée donnant une incidence reproductible, 3) en plaçant les animaux dans des cages où ils disposeront de refuges et de gels nutritif et hydratant. Ils y seront monitorés tous les jours dès les premiers signes de perte de poids et euthanasiés si les signes cliniques dépassent un seuil critique. 4) De plus, nous réduirons le nombre de groupes témoins, multiplierons les mesures sur un nombre limité de souris et adopterons les tests statistiques appropriés.

A terme, les résultats de ce projet formeront une base indispensable pour proposer certains de ces progéniteurs comme de nouvelles thérapies cellulaires, administrés soit en remplacement soit en complément des greffes de cellules souches hématopoïétiques, déjà effectuées chez les patients présentant une SEP sévère et réfractaire aux traitements actuellement disponibles.

2878. Le syndrome du côlon irritable (IBS) fait référence à un trouble qui implique notamment des douleurs viscérales (cisaillement, tension, brûlure, crampe...) en absence d'inflammation. Cette pathologie affecte 10-20% de la population générale. Les causes de l'IBS sont mal connues et les traitements actuels ne sont pas satisfaisants.

Les méthodes alternatives, permettant une évaluation nociceptive viscérale, sont inexistantes. Ainsi, ces limitations rendent incontournables le recours à l'expérimentation animale afin de valider de nouveaux candidats médicaments pour le traitement des douleurs viscérales. Le modèle d'hypersensibilité viscérale induit par le butyrate chez le rat se rapproche de la pathologie humaine puisque l'hypersensibilité viscérale se développe en absence d'inflammation. Ce modèle, peu invasif, demande une manipulation minimisée des animaux et met en jeu deux méthodes d'évaluation non invasive permettant une évaluation au cours de temps sur le même animal.

Le butyrate sera administré par voie intra-colique deux fois par jour pendant trois jours successifs. La réponse nociceptive sera évaluée à l'aide de 2 méthodes non-invasives : la première méthode évaluera la douleur référée en réponse à des stimuli mécaniques (filaments de von Frey) et la seconde, évaluera la réponse viscéromotrice en réponse à la distension colorectale. Ces 2 méthodes pourront être faites en parallèles, sur les mêmes animaux, au cours du temps, permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés et de répondre ainsi à la règle des 3-R.

L'objectif de cette étude sera donc d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques dans le modèle d'hypersensibilité viscérale induit par le butyrate chez le rat. Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 1800 rats en raison de 12 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement adapté à l'espèce sera rajouté aux animaux. Les animaux seront mis en communauté, ce qui leur permet de mettre en place une hiérarchie. Les rats seront hébergés dans des cages à couvercles filtrants ou ventilées (type III techniplast) à raison de 3 animaux/cage.

De plus, ce projet fera l'objet d'une évaluation rétrospective étant donné que les procédures sont de type sévère.

2879. *Pseudomonas aeruginosa* est une des bactéries majoritairement impliquées dans les infections broncho-pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose : d'abord minoritaire dans l'enfance par rapport à *Staphylococcus aureus*, son incidence croît progressivement durant l'adolescence, pour représenter quasiment 80 % des infections à l'âge adulte. Ce pathogène opportuniste se caractérise par des capacités d'adaptation à l'environnement et d'acquisition de résistances aux antibiotiques qui font que les cliniciens se retrouvent régulièrement confrontés à des bactéries multirésistantes voire totorésistantes vis-à-vis de l'arsenal antibiotique disponible. Cet arsenal n'est d'ailleurs plus alimenté depuis plusieurs décennies par l'apport de nouveaux antibiotiques, du fait d'un relatif désintéressement de l'industrie pharmaceutique pour ce type de médicaments. Face à cette situation, l'exploration de nouvelles pistes thérapeutiques est cruciale : des thérapeutiques qui pourraient agir en complément ou en remplacement des antibiotiques, et permettraient de limiter la pression de sélection exercée par ceux-ci sur les flores microbiennes des patients, et par conséquent sur l'apparition de souches résistantes. La phagothérapie n'est pas précisément une nouveauté, puisque cette approche thérapeutique a été développée dès le milieu du 20ème siècle mais l'avènement des antibiotiques dès les années 1950 a empêché son développement jusqu'ici. Le Plan national d'alerte sur les antibiotiques 2011-2016 du Ministère chargé de la Santé préconise d'ailleurs d'encourager la recherche sur les alternatives thérapeutiques aux antibiotiques, dont les bactériophages. Les avantages des bactériophages sur les antibiotiques sont les suivants : les bactériophages se multiplient au site de l'infection ; ils sont spécifiques d'une

bactérie et sont capables de s'adapter aux bactéries résistantes. Leur absence d'impact sur les flores bactériennes du patient est donc évidente, ainsi que leur absence d'effets pharmacologiques collatéraux (par exemple hépatiques ou rénaux comme avec les antibiotiques). De nombreux bactériophages spécifiques de *P. aeruginosa* sont répertoriés. Mais peu de travaux ont été réalisés sur les infections pulmonaires. Or, l'approche thérapeutique non systémique a fait ses preuves dans la mucoviscidose avec l'utilisation notamment d'aérosols à la colimycine et à la tobramycine, qui offrent l'avantage de fortes concentrations au site de l'infection tout en ayant une diffusion systémique marginale, ce qui permet de limiter les risques d'effets indésirables et d'impact sur les flores bactériennes notamment digestives. L'efficacité des bactériophages étant déterminée par leur application au site de l'infection, la colonisation ou l'infection broncho-pulmonaire par *P. aeruginosa* offrent des cibles séduisantes pour ce type de thérapeutique.

Objectifs principaux de l'étude :

L'efficacité d'une solution de bactériophages a été démontrée dans un modèle de pneumonie aiguë à *P. aeruginosa* chez la souris. Cette nouvelle étude a pour but de répondre à plusieurs questions :

1- La solution de phages testée est-elle efficace dans un modèle d'infection chronique chez la souris, en comparaison avec l'efficacité obtenue dans le modèle de pneumonie aiguë ?

2- Quel est l'impact de l'administration des phages sur la réponse immunitaire innée dans le modèle de pneumonie chronique : Etude de la réponse inflammatoire locale sous traitement par bactériophages par l'étude anatomo-pathologique de coupes de poumons infectés, par détermination de l'activité myéloperoxydase des polynucléaires neutrophiles, et dosage des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , et chimiokine MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein 2-alpha).

Objectifs secondaires :

1- Le modèle chronique permet-il de réduire le MOI (ratio phages/bactéries) nécessaire à une efficacité thérapeutique ?

2- Y-a-t-il un impact de la phagothérapie sur le microbiote bronchopulmonaire : la phagothérapie favorise-t-elle la colonisation du tractus bronchopulmonaire par d'autres agents bactériens une fois *Pseudomonas aeruginosa* éradiqué ?

3- Le nombre de souris nécessaires à la réalisation de l'ensemble de l'étude (2 ans) est de : 864

Cette étude sera menée en appliquant la règle des 3R. Le nombre de souris par groupe a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable (Réduire). Afin de limiter les sources d'angoisse ou de souffrance, la réalisation du modèle infectieux ainsi que l'euthanasie sont faites sous anesthésie générale. Les souris sont conservées dans des cages de taille suffisante et avec accès libre à l'eau et à la nourriture. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude en évaluant l'état général des souris deux fois par jour avec analyse des signes généraux et des points limites seront mis en place. En cas d'éventuels signes de souffrance avec symptômes non réversibles, l'animal est euthanasié (Raffinement). La corrélation in vitro - in vivo n'étant pas satisfaisante, le recours à l'utilisation de modèles animaux est indispensable (Remplacer).

2880. Les syncytines, des gènes d'enveloppe de rétrovirus endogènes, jouent un rôle structural essentiel dans le développement placentaire. Des expériences réalisées sur des lignées de cellules, ont révélé que ces gènes possèdent également une activité immunosuppressive. Cette propriété pourrait jouer un rôle important dans l'établissement de la tolérance immunologique de la mère vis-à-vis de l'unité fœto-placentaire (en effet, le fœtus porte des antigènes étrangers à la mère et susceptibles de déclencher la reconnaissance et la destruction du fœtus par le système immunitaire maternel). Cependant, l'étude du phénomène de tolérance materno-fœtale, qui met en jeu un dialogue complexe entre les systèmes immunitaires de deux individus vivants, nécessite maintenant de faire appel au modèle animal.

Des souris génétiquement modifiées dans lesquelles le gène de syncytine B a perdu sa fonction immunosuppressive (souris syncytin-B KI (Knock In)) seront analysées dans différentes conditions de croisements : des femelles syncytin-B KI ou normales seront accouplées avec des mâles identiques (croisements contrôles) ou différents (croisements allogéniques dont certains peuvent provoquer des avortements spontanés). Nous sacrifierons les femelles à différents stades de la gestation et rechercherons si les embryons mutés pour la syncytine présentent un taux d'avortement ainsi qu'une réponse immunologique placentaire accrue par rapport aux fœtus normaux. Les souris gestantes seront suivies régulièrement, auront une nourriture adaptée (hypercalorique), un milieu enrichi (cocoons pour faire leur nid) et hébergées à 2 par cage. Il faut noter que chez les femelles présentant des avortements on n'observe pas d'altération de l'état de santé général ni de signes de souffrance. De plus, les embryons se résorbent rapidement, permettant le maintien de la gestation et la survie des embryons viables. Le sacrifice des souris se fera en utilisant les protocoles d'euthanasie appropriés.

Un total d'au maximum 40 mâles et 170 femelles KI (idem pour les animaux sauvages), soit 420 animaux en tout sera requis pour cette expérience. Le nombre d'animaux utilisés sera de taille équivalente à ce qui a déjà été publié dans la littérature pour des études comparables et qui a été suffisant pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

Ce modèle devrait nous permettre de déterminer l'impact de la fonction immunosuppressive des syncytines sur la physiologie placentaire. La mise en évidence d'un rôle des syncytines dans la tolérance materno-fœtale ouvrirait des perspectives innovantes non seulement en terme de biologie fondamentale mais aussi pour le développement d'approches thérapeutiques. La souris présentant une placentation très comparable à celle de l'homme (tant en terme de structure, que de fonctions physiologiques et immunologiques), les résultats obtenus pourront être étendus à l'homme. Ils contribueront à mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la grossesse, à détecter, et à terme traiter certaines pathologies de la grossesse chez la femme.

2881. L'arthrose est une des pathologies chroniques les plus coûteuses des pays développés car elle atteint 30 % des sujets de plus de 65 ans. Cette pathologie est caractérisée par des lésions du cartilage. Il n'existe actuellement aucun traitement pour ralentir ou traiter la perte de cartilage qui génère des douleurs et une incapacité fonctionnelle, source de forte morbidité.

Cette pathologie est causée par plusieurs facteurs qui associent une surcharge mécanique, des facteurs génétiques et hormonaux auxquels s'ajoutent l'âge et l'obésité qui figurent parmi les risques majeurs.

Il existe dans le tissu osseux des cellules appelées ostéocytes caractérisées par une morphologie semblable à celle des neurones. Les ostéocytes sont sensibles aux contraintes mécaniques et sont capables de communiquer avec d'autres cellules partenaires afin d'adapter l'architecture osseuse en fonction des contraintes mécaniques exercées. Notre hypothèse est qu'au cours de l'arthrose où il y a un excès de contraintes mécaniques, les ostéocytes vont communiquer avec d'autres cellules présentes dans le cartilage et participer à la destruction du cartilage articulaire. L'objectif de ce projet est d'identifier pourquoi et comment les ostéocytes communiquent avec les cellules du cartilage lors de l'arthrose. L'identification de ce moyen de communication pourrait permettre de trouver une nouvelle stratégie thérapeutique.

Le recours à l'animal dans le cadre de ce projet est indispensable puisque nous souhaitons observer un effet des ostéocytes sur le cartilage dans un système biologique complet. Il permettra de compléter la première partie de notre travail qui est effectuée *in vitro* afin de diminuer autant que possible l'utilisation d'animaux.

Nous avons au laboratoire un modèle de souris transgénique dans lequel il est possible d'éliminer les ostéocytes après injection d'une substance. Ce modèle nous permettra de comparer la sévérité de l'arthrose en présence ou en absence d'ostéocyte. Dans un premier temps, nous testerons l'injection de différentes doses de produit chez 10 souris sauvages et 20 souris transgéniques (30 souris total). Cela a pour objectif de trouver la dose à laquelle aucune souffrance n'est induite chez la souris et à laquelle nous obtenons l'élimination des ostéocytes. Dans un deuxième temps, nous induirons l'arthrose chez des souris sauvages ou transgéniques avec ou sans le traitement afin d'étudier l'effet sur la destruction du cartilage (12 souris par groupe soit 48 souris au total). L'induction de l'arthrose sera effectuée sur une seule patte de l'animal afin que la deuxième puisse servir de contrôle, permettant ainsi de diminuer le nombre d'animaux. Ce projet utilisera au total 78 souris. Les souris seront suivies quotidiennement y compris les jours fériés et week-end afin de détecter tout signe d'angoisse et/ou de souffrance. En cas de douleur chez l'animal, une injection d'analgésique sera effectuée afin de supprimer les signes de douleur. Dans le cas où les signes de souffrance/douleur/angoisse seraient persistants ou que les points limites seraient atteints, l'animal sera mis à mort.

2882. Le marché des matériaux nanoadditivés - c'est-à-dire contenant des matériaux de taille nanométrique comprise entre 1 et 100 nm - croît de façon exponentielle, depuis le début des années 2000. De même, le nombre de produits issus des nanotechnologies dédiés à l'habitat - produits de construction additivés de nanomatériaux comme des mortiers de béton, du ciment, des revêtements, des peintures et des matériaux d'isolation - est en constante évolution. L'association de nanomatériaux aux produits de construction du bâtiment vise généralement à améliorer ou à leur conférer de nouvelles propriétés, telles que résistance mécanique, durabilité, isolation thermique, auto-nettoyabilité, épuration, auto-modification des couleurs, etc.... Parmi les nombreux types de nano-objets actuellement employés et notamment les nanoparticules d'oxyde de zinc (nano-ZnO), de silice (nano-SiO<sub>2</sub>), d'alumine, d'argent, du noir de carbone et des nanotubes de carbone, le dioxyde de titane (nano-TiO<sub>2</sub>) est l'un des plus employés (en France plusieurs milliers de tonnes par an) notamment en raison de sa stabilité, de son faible coût et de sa facilité de mise en œuvre. Il est utilisé dans des ciments, des revêtements, des enduits, des bétons, des murs, du verre, des membranes d'étanchéité, des peintures, des tuiles, des céramiques et des sprays de revêtement.

Les problématiques sanitaires et environnementales soulevées par l'usage à grande ampleur des nano-objets sont aujourd'hui posées dans la communauté scientifique et notamment à travers l'exposition potentielle des populations aux nanomatériaux manufacturés, susceptibles d'être libérés involontairement, sous la forme de particules « grossières » produites par des usages courants tels que le nettoyage ou le ponçage, et des facteurs environnementaux tels que la pluie, la chaleur, l'abrasion et les rayonnements UV. Les observations par microscopie de ces nano-objets relargués illustre une hétérogénéité des formes : les nano-objets peuvent être isolés sous forme de nanoparticules ou plus généralement encapsulés dans la matière constituant le produit. Or les travaux toxicologiques actuellement menés sur cette problématique, s'intéressent uniquement à la toxicité du nanomatériau seul et non à la toxicité du nanomatériau mélangé aux composés du produit considéré - dans sa complexité de composition et de forme et quasiment jamais dans le contexte d'une exposition réaliste. Ainsi, l'utilisation accrue de nanomatériaux dans de nombreux produits de consommation dédiés à l'habitat, s'accompagne d'interrogations légitimes des pouvoirs publics et de la population générale quant à leur devenir et leur impact potentiel sur l'environnement et la santé humaine. En conséquence il est nécessaire et indispensable de mener des études visant à clarifier ces questions.

Le présent projet de recherche vise à apporter des connaissances nouvelles concernant l'impact potentiel des nano-objets issus de matériaux nano-additivés, relargués au cours de leur usage, sur les fonctions cérébrales. Il propose une étude à partir de peintures additivées en nanoparticules de TiO<sub>2</sub> produit d'usage courant emblématique, représentatif de la problématique. Pour atteindre ses objectifs d'évaluation d'une neurotoxicité potentielle, il n'existe pas d'alternative aux expérimentations *in vivo* et le projet s'appuie sur des expositions réalistes à l'aide d'une enceinte d'exposition par voie aérosol conçue spécialement pour répondre aux exigences de l'expérimentation animale dans le respect du bien-être animal. Le plan d'expérience prévoit d'étudier plusieurs fenêtres temporelles jusqu'à 8 semaines d'expositions chroniques. Deux lignées de souris seront exposées, une lignée sauvage comparativement à une lignée transgénique présentant une prédisposition au développement de processus neuropathologiques. Le total de 240 souris sur les 5 ans permettra d'avoir une bonne représentation statistique. L'ensemble des procédures du projet (expositions par voie aérosol dans une enceinte où les animaux sont libres de se mouvoir, tests d'adresse locomotrice, l'imagerie cérébrale) seront effectués dans le souci du respect du bien-être animal et sans générer de douleur, de souffrance ni de stress pour les animaux.

Aphanizomenon flos-aquae est une microphyte d'eau douce dite algue bleu-vert qui est présente dans de nombreux endroits dans le monde. Ces algues, qui réalisent la photosynthèse oxygénique, ont la particularité de contenir des quantités importantes de composés très différents dont des caroténoïdes, des phycocyanines, des polysaccharides, des pigments (aphanizophylle), des vitamines et des alcaloïdes monoaminés.

Le haut lac Klamath dans l'état d'Oregon (USA) bénéficie de conditions très particulières qui sont extrêmement favorables à la vie de cette algue bleue: ensoleillement de 300 jours par an dans un environnement montagneux qui fait que la température de l'eau ne dépasse pas 8°C. Le lac est alimenté par un réseau de rivière extrêmement minéralisées qui conduisent le lac à être un des pièges à minéraux les plus riches au monde. Dans cet environnement très favorable pour elles, les algues bleues prolifèrent d'une façon tout à fait exceptionnelle, mais surtout il empêche la production de toxines par celles-ci, contrairement aux environnements plus chauds et moins riches en sels.

Depuis quelques temps, cette algue bleue, filtrée, du lac Klamath est utilisée comme complément alimentaire qui aurait une activité de prévention des conséquences d'une agression tissulaire, en particulier celle des stress oxydatifs. Le mécanisme pourrait être une augmentation de la production de progéniteurs myéloïdes et leur passage dans le sang, mais sans activation des systèmes immunitaires. Ces effets ont été rapportés dans de nombreuses situations de dégénérescence organiques. Mais beaucoup de ces observations peuvent être taxées de subjectives.

Cette subjectivité des observations favorables est la raison de ce programme d'une durée de 2 mois chez le Porc comportant deux groupes de 6 animaux, ceux qui prendraient le complément alimentaire (la galénique a été étudiée et mise au point) et ceux qui n'en prendraient pas. Chez tous les animaux la présence des progéniteurs circulants, ainsi que le niveau de stress oxydatif sanguin seront réalisés. Après un mois, il sera réalisé chez la moitié des animaux de chaque groupe, dans des conditions d'analgésie profonde, il sera réalisé un accident vasculaire cérébral transitoire (donc sans conséquences physiques postopératoires) par occlusion partielle pré-définie du réseau vasculaire alimentant le cerveau.

Les conséquences seront enregistrées sur le plan électrophysiologique peropératoires, par des techniques de radiologie (CT-scan injecté, non injecté) et de médecine nucléaire (activités métaboliques) et, un mois après l'AVC-TI, l'ensemble de l'analyse morpho- et immuno-histologique de la situation cérébrale. Les paramètres biologiques et sanguins seraient suivis.

Un protocole ainsi conçu permettrait d'obtenir une évaluation chiffrée et objective de l'effet protecteur potentiel du complément alimentaire à base d'algue bleue.

2883. La myélinisation des axones est une composante fondamentale du fonctionnement du système nerveux central (SNC), puisque qu'elle assure d'une part une isolation axonale et permet d'autre part une propagation efficace du signal électrique le long des fibres nerveuses. Ainsi, pouvoir accéder in vivo à l'intégrité de la myéline permettrait une meilleure compréhension du développement du SNC chez le sujet sain, ainsi qu'une meilleure caractérisation des pathologies neurologiques de la matière blanche (e.g. Sclérose en Plaques). Plusieurs axes de recherche sont développés dans le domaine de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) afin d'obtenir des données quantitatives liées à la myéline : imagerie de diffusion, (DTI) de transfert d'aimantation (MT), et de

relaxométrie T2 (MWF). Récemment, nous avons développé une nouvelle technique dont la sensibilité et la spécificité pour la myéline sont prometteuses. Cette technique, nommée transfert d'aimantation inhomogène (ihMT), permet de mettre en évidence les groupements méthylène (-CH<sub>2</sub>) des gaines de myéline. Plusieurs expériences in vivo réalisées sur l'homme semblent confirmer cette hypothèse. L'objectif du présent projet est la démonstration/validation de la technique ihMT comme marqueur spécifique de la myéline ainsi que l'évaluation de sa sensibilité au diagnostic de pathologies démyélinisantes. Pour ces travaux, des analyses histologiques doivent être réalisées en parallèle de l'imagerie sur des prélèvements de tissus ce qui rend le recours à l'utilisation d'animaux indispensable.

Justification du choix des modèles :

La démonstration de la spécificité/sensibilité d'ihMT pour la myéline sera effectuée sur la base de mesures réalisées à différents points temporels (variables selon les modèles) sur des animaux contrôles et sur des modèles d'altération de la myéline caractérisés: modèles cuprizone, Twitcher, Shiverer et EAE (modèles murins de démyélinisation mimant les effets de la sclérose en plaques), modèle de traumatisme médullaire (rat/souris) et modèle de maturation cérébrale (rat/souris).

Taille des effectifs: L'ensemble de ce projet nécessitera au total et pour une durée de 5 ans, l'utilisation de 387 animaux répartis en 235 souris (C57Bl/6), 34 souris (BALB/) et 118 rats (Sprague-Dawley).

Stratégie de respect de la règle des 3R:

Stratégie de réduction

Afin de réduire le nombre d'animaux au maximum, les examens IRM seront réalisés de sorte que plusieurs paramètres IRM puissent être ajustés au cours d'une même session et sur des mêmes animaux. De plus, un suivi longitudinal par exploration IRM non invasive sera effectué sur tous les modèles investigués, réduisant ainsi de manière drastique le nombre d'animaux utilisés.

Stratégie de Raffinement

La stabulation des animaux sera réalisée au sein de notre unité, dans des armoires dédiées (rats ou souris) à raison de 5 souris / cage et 2 rats / cage pour les animaux contrôles. Pour les animaux modèles pathologiques, la stabulation sera faite à raison d'un animal par cage avec accès facilité à la nourriture/boisson après examen IRM, le temps de récupération. A noter également que nos cages de stabulation souris sont dotées d'un environnement enrichi (roues, tunnels... pour la stimulation des animaux). En outre, 2 semaines de repos seront systématiquement octroyées aux animaux après leur livraison afin de favoriser la récupération, les habituer à l'environnement (locaux, présence de l'animalier, visites journalières de l'expérimentateur ...) et de diminuer le stress.

## Stratégie de Remplacement

Il existe des fantômes (composés chimiques) qui présentent quelques caractéristiques similaires à la myéline et sur lesquels des ajustements de premier ordre relatifs à la technique ihMT peuvent être effectués. Ces fantômes ne peuvent malheureusement pas se substituer à la myéline dans des conditions *in vivo*. En revanche, chaque fois que cela sera possible et pour des ajustements de premier niveau, ces fantômes seront utilisés en lieu et place des animaux.

### Points limites

Notre projet implique des procédures de classe légère et sévères. Pour ces dernières, des points limites ont été clairement définis. Ils sont basés sur un examen quotidien permettant de suivre la progression des signes cliniques de la maladie/pathologie. Ceux-ci sont évalués suivant une échelle permettant de grader le handicap. Au-delà d'un certain seuil (défini suivant les pathologies), l'animal sera sacrifié.

2884. L'immunociblage de tumeurs à l'aide d'anticorps monoclonaux est une option thérapeutique qui a émergé il y a une quinzaine d'année. Actuellement 30 anticorps médicamenteux sont sur le marché (dont la moitié est utilisée dans le cancer), et 500 anticorps sont en essai clinique en oncologie thérapeutique.

Notre projet porte sur l'étude d'anticorps développés par le laboratoire à visé thérapeutique ciblant la protéase cathepsine D sécrétée en excès dans le microenvironnement tumoral dans de nombreux cancers, en particulier les cancers du sein. Nos études expérimentales ont montré que la cathepsine D sécrétée dans le microenvironnement tumoral stimule la prolifération tumorale et la formation des métastases dans le cancer du sein. Au laboratoire, nous avons donc généré des anticorps anti-cathepsine D afin de cibler la forme sécrétée de la cathepsine D. Notre hypothèse est que la neutralisation de l'enzyme extracellulaire conduira à une inhibition de la prolifération tumorale et de la formation des métastases. Ces données font donc de la cathepsine D extracellulaire, une cible thérapeutique potentielle dans le cancer du sein. Notre hypothèse est que la neutralisation de l'enzyme relarguée dans le microenvironnement tumoral par des anticorps induira une inhibition de la prolifération tumorale et de la formation des métastases. Les IgG1 E2 et F1 inhibent *in vitro* la formation de clones, la cicatrisation (test de wound healing) et la croissance tri-dimensionnelle dans le Matrigel de la lignée de cancer du sein triple-négatif MDA-MB-231. Les objectifs de ce projet comportent sont la mise en place d'une stratégie combinatoire de ciblage du microenvironnement tumoral des cancers du sein avec des anticorps anti-cathepsine D seuls ou associés avec d'autres médicaments.

Pour ces études nous proposons de greffer des souris femelles immunodéprimées âgées de 6 semaines avec les cellules tumorales.

Différentes mesures seront prises pour répondre le mieux possible à la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer).

Les souris seront surveillées quotidiennement ceci dans le but de :

- suivre le développement de la tumeur, celle-ci ne devant pas excéder 20% du poids normal de l'animal,
- détecter le moindre signe de souffrance et/ou de détresse de l'animal (exigence de raffinement).

Le nombre d'animaux sera réduit au minimum tout en ayant un nombre suffisant pour obtenir un résultat statistiquement significatif (exigence de réduction). Pour une première expérience le nombre de souris par groupe est fixé à 8 puis il est réduit à 6-8 pour une reproduction d'expérience.

Pour l'ensemble du projet nous avons prévu un nombre de souris de 1742 au maximum et de 1542 au minimum pour une durée de 5 ans.

2885. En Europe, la néphropathie épidémique (NE), une forme atténuée de Fièvre Hémorragique à Syndrome Rénal (FHRS), est devenue un problème sanitaire de premier ordre en raison d'une nette expansion géographique et d'une augmentation du nombre de cas recensés au cours des deux dernières décennies. Cette maladie infectieuse est transmise par l'hantavirus Puumala (PUUV) pour lequel le campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*) est le réservoir principal. Malgré la présence spatialement continue des populations de réservoirs, la distribution de l'incidence de la NE présente une forte variabilité aux échelles continentale et régionale. En France, la distribution de la NE est fragmentée avec une zone d'endémie sur tout le quart Nord-Est allant du Jura au Pas-de-Calais. Une meilleure appréhension du risque d'émergence de la NE est donc essentielle et doit s'appuyer sur une bonne connaissance de la distribution de PUUV dans les populations de rongeurs. Cette distribution repose sur des facteurs environnementaux et climatiques mais également sur des facteurs individuels pouvant moduler la sensibilité des campagnols à cette infection et les charges virales excrétées dans l'environnement.

Le but de ce projet est de reproduire au laboratoire l'infection des campagnols par le virus Puumala. Les campagnols seront capturés dans différentes régions de France de façon à tester la sensibilité des différentes populations à l'infection. L'infection se fera selon différentes voies de façon à mimer le plus possible ce qui se passe à l'état naturel.

L'infection sera suivie par des prélèvements sanguins réguliers mais également des prélèvements d'urine, de fèces et de salive. Les animaux seront euthanasiés en fin d'expérience et les tissus tels que les poumons, le foie et les reins seront prélevés en vue d'analyses virologiques (application du principe de raffinement de la règle des 3R).

Afin que le modèle soit le plus proche possible de la réalité du terrain, nous ne travaillerons que sur des animaux capturés ou sur des animaux F1 nés en captivité.

Ce projet qui devrait s'étaler sur 5 ans utilisera au maximum 300 animaux (60 animaux par an). Dans la mesure du possible les animaux nés en captivité seront utilisés en premier de façon à limiter les captures.

Le campagnol roussâtre est un modèle unique pour étudier le virus PUUV puisqu'il s'agit du seul réservoir naturel connu.

L'infection par le virus Puumala n'entraîne aucune pathologie chez le campagnol roussâtre. Les procédures expérimentales n'engendreront pas de souffrance ou de stress, de ce fait aucun point limite n'est associé. Les conditions d'hébergement seront

optimisées (enrichissement du milieu, hébergement individuel, nourriture à base de graines, fruits et légumes frais) pour garantir le bien être animal.

2886. Les candidoses profondes sont la quatrième cause d'infection nosocomiale. Elles concernent principalement des patients atteints de pathologies engendrant une immunodépression soit par elles-mêmes soit due à leurs traitements. Le taux de mortalité reste élevé même avec une prise en charge thérapeutique adaptée. De plus, des résistances aux traitements actuels sont décrites. Il est donc nécessaire de développer d'une part de nouveaux traitements mais aussi de mieux comprendre les mécanismes de défenses immunitaire mis en jeu par le patient pour lutter contre ces infections fongiques. Cette procédure vise donc à évaluer dans un modèle murin l'efficacité de nouveaux composés pour le traitement des candidoses invasives. Elle nécessite l'utilisation de 300 animaux. Les souris sont hébergées en groupe, dans un environnement enrichi. Les protocoles expérimentaux ont été établis de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés ainsi que la souffrance animale par un suivi quotidien de l'évolution clinique des animaux. Tout animal manifestant un signe de gravité est euthanasié.

2887. Les troubles du spectre autistique (TSA) sont des troubles du développement humain caractérisés par une interaction sociale et une communication anormales, avec des comportements restreints et répétitifs. Les symptômes sont généralement détectés par les parents dès les deux premières années de la vie de l'enfant.

Le gène SHANK3 code pour une protéine jouant un rôle crucial pour le développement des synapses. Des recherches passées ont montré que des altérations du gène SHANK3 peuvent être à l'origine de TSA chez des enfants autistes. Par ailleurs, des recherches précliniques et cliniques suggèrent qu'une carence en Lithium pourrait aggraver les TSA et qu'à l'inverse, un traitement au Lithium pourrait réduire ces troubles.

L'objectif de cette étude est d'identifier chez des souris porteuses d'altérations du gène SHANK3 les troubles comportementaux comparables à ceux présents dans le TSA et de déterminer si le Lithium et différents composés réduisent ces troubles comportementaux.

Des souris mutantes pour le gène SHANK3 seront étudiées, comparativement à des souris non mutantes (dites sauvages) dans différents tests permettant de rendre compte d'altérations comportementales comparables à celles présentes dans les TSA. Les animaux traités, mutants homozygotes (Ho), mutants hétérozygotes (Het) et sauvages (wild type : WT) recevront un traitement constitué de Lithium ou d'autres composés potentiellement efficaces pour le traitement des TSA ; les animaux témoins (Ho, Het et WT) recevront du placebo. Ces traitements (ou le placebo) seront délivrés dans la nourriture ou par d'autres moyens (administration par voie orale, injection intrapéritonéale, sous-cutanée ou intraveineuse, en fonction des propriétés du produit). Les animaux, mâles et femelles, seront soumis à des tests comportementaux permettant de mesurer différents types de troubles typiques des TSA : le test d'activité motrice spontanée en open-field, mesurant l'hyperactivité locomotrice, l'anxiété et le déficit d'habituation, les tests d'observation en cage individuelle du grooming (toilette) et du digging (creusage), qui constituent des indices de comportement répétitif, le test d'interaction sociale avec un congénère avec enregistrement vidéo et audio (émissions de vocalisations), permettant la mise en évidence de déficits de comportements sociaux, et chez les mâles uniquement, un test d'interaction avec une femelle en chaleur, permettant de mesurer le comportement sexuel.

Une expérience est réalisée sur 150 animaux.

L'étude du Lithium comprendra une ou deux expérience (max : 300 animaux).

Dix autres produits au maximum seront étudiés (max : 1500 animaux)

Le nombre total maximum de souris utilisées sera de 1800.

Respect de la règle des 3R :

- Réduire. Le nombre total d'animaux utilisés pour une étude est fonction du nombre de produits à tester, du nombre de groupes par étude de produit et du nombre d'animaux par groupe nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement interprétables.

-Justification du nombre de groupes. Chaque étude de produit comprend 150 animaux (100 animaux expérimentaux plus 50 souris femelles partenaires pour le test d'interaction avec une femelle en chaleur). Les animaux expérimentaux sont répartis en 12 groupes (N = 8-9 / groupe) : mâles Ho, Het et WT traités, mâles Ho, Het et WT témoins, femelles Ho, Het et WT traités, femelles Ho, Het et WT témoins.

-Justification du nombre d'animaux par groupe. Compte tenu de la variabilité interindividuelle des variables mesurées dans ce test, ce nombre a été fixé à un minimum de 8 animaux par groupe. Néanmoins, ce nombre peut s'avérer insuffisant pour conclure à des différences statistiquement significatives. Le cas échéant, si les résultats sur une première cohorte le justifie, l'expérience peut être répliquée à l'identique afin d'obtenir un nombre d'animaux suffisant.

-Raffiner. Des animaux présentant des signes de souffrance sont euthanasiés. Outre la motivation éthique conduisant à cette euthanasie, celle-ci est requise pour des raisons expérimentales, la souffrance d'un animal biaisant les variables comportementales mesurées. L'utilisation de traitements pour pallier à cette souffrance est exclue, ces types de traitement étant susceptible de modifier le comportement des animaux et l'action pharmacologique des produits étudiés.

-Remplacer. Il n'existe pas à ce jour de modèle n'utilisant pas d'animaux, nécessitant un nombre plus réduit d'animaux ou ayant un degré de sévérité inférieur, et permettant d'obtenir des informations équivalentes à celles obtenues par le présent modèle d'autisme.

2888. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, elles sont à l'origine de 30% de la mortalité mondiale totale. L'institut de veille sanitaire indique qu'en 2008, l'insuffisance cardiaque a causé 22 000 décès et 200 000 séjours hospitaliers en France. Près d'un tiers de ces insuffisances cardiaques sont des cardiomyopathies dilatées d'origine non ischémique, c'est-à-dire ne résultant pas d'un arrêt ou d'une réduction de l'afflux du sang artériel au cœur comme dans le cas d'un infarctus par exemple. Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans ces cas-là sont encore mal pris en charge par les traitements actuels et nécessitent donc la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques.

Cette situation clinique peut être étudiée au laboratoire grâce aux modèles précliniques chez l'animal et ainsi permettre la découverte de nouvelles thérapies. L'insuffisance cardiaque fonctionnelle induite par une surpression du ventricule gauche consécutive à une sténose de l'aorte (c'est-à-dire une réduction de son diamètre et ainsi de son débit) est un processus intégré et complexe qui n'est à l'heure actuelle pas modélisable in vitro. Les mesures des paramètres physiologiques, tels que la fonction cardiaque, la pression artérielle, la fréquence cardiaque et les altérations de l'électrocardiogramme sont réalisables uniquement chez l'animal vivant.

L'objectif de ce projet est donc de mettre en place dans notre laboratoire le modèle le plus utilisé chez les rongeurs de cardiomyopathie dilatée d'origine non ischémique mimant l'insuffisance cardiaque chez l'homme. Pour ce faire nous réaliserons une sténose aortique chez le rat par une intervention chirurgicale sous anesthésie générale. Cette sténose a pour but d'entraîner une résistance à l'éjection à l'origine d'une augmentation de la pression à l'intérieur du ventricule gauche. Pour compenser, le myocarde s'hypertrophie alors avant de décompenser en se dilatant. S'ensuit une incapacité du cœur à éjecter une quantité de sang suffisante pour assurer les besoins de l'organisme, c'est l'insuffisance cardiaque. La dysfonction ventriculaire qui en résulte, est mesurée au moyen d'imagerie clinique (échographie) en cours d'étude, ou de mesures hémodynamiques en fin d'étude (pression intraventriculaire gauche, pression artérielle, fréquence cardiaque) et réalisées sous anesthésie. Ces examens permettent de mesurer finement les effets d'un candidat médicament et ainsi limiter le nombre d'animaux utilisés.

Le suivi longitudinal de la fonction cardiaque par échocardiographie (technique non invasive et indolore qui peut être réutilisée au cours du temps sur un même animal) permet de réduire le nombre d'animaux par étude, sa réalisation sous anesthésie gazeuse (suivie du réveil) permet quant-à-elle de limiter le stress pour l'animal.

Ce projet s'articule en 3 phases. Dans un premier temps, sur la base des données de la littérature, nous mettrons en place la technique chirurgicale, dans un second temps nous caractériserons les atteintes cardiaques induites par la sténose aortique, et enfin dans un troisième temps nous caractériserons et validerons notre modèle avec un traitement de référence.

L'état général des rongeurs sera surveillé en post-opératoire d'une part afin de s'assurer qu'ils ont bien récupéré leur état de santé normal (sutures, masse corporelle, activité locomotrice...), puis tout au long de l'installation de l'insuffisance cardiaque et de l'éventuelle survenue des symptômes caractéristiques (perte d'appétit, apathie, dyspnée). En cas de constatation d'un signe de souffrance, les animaux seront retirés de l'étude en fonction de points limites prédéfinis.

Lors des premières phases de chirurgie, l'efficacité d'une analgésie pré ou post-opératoire sera évaluée.

Les rats seront placés après la chirurgie en cages individuelles avec nourriture et eau à volonté, enrichies de bâtons de bois à ronger afin de réduire le stress occasionné par la chirurgie et l'hébergement individuel.

Ce projet prévoit l'utilisation de 235 rats sur une durée totale de 18 mois nécessaires à l'ensemble de la mise en place du modèle expérimental dans notre laboratoire.

2889. L'imagerie médicale par Résonance Magnétique (IRM) servant au diagnostic de nombreuses pathologies cérébrales (accident cérébral vasculaire, tumeurs, Alzheimer, ...) est basée sur le phénomène de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Sous l'effet d'un champ magnétique intense, certains noyaux se magnétisent. Cette aimantation macroscopique peut être exploitée pour déterminer les structures moléculaires. Conventionnellement, la RMN se focalise sur la détection des protons ( $^1\text{H}$ ) car ce noyau est de loin le plus abondant et permet une excellente visualisation des tissus mous (via la détection de l'eau -  $\text{H}_2\text{O}$ ).

A très haut champ magnétique, cette aimantation s'accroît ce qui ouvre la voie de l'imagerie de noyaux moins abondants tels que le carbone-13 ( $^{13}\text{C}$ ), le lithium-7 ( $^7\text{Li}$ ), l'oxygène-17 ( $^{17}\text{O}$ ), le phosphore-31 ( $^{31}\text{P}$ ) ou le sodium-23 ( $^{23}\text{Na}$ ). Ces nouvelles approches d'imagerie offrent des perspectives extrêmement intéressantes pour l'étude non-invasive du métabolisme énergétique (ATP, phosphocréatine), de la neurotransmission (glutamate, GABA) ou encore pour caractériser les équilibres osmotiques (distribution intra- et extracellulaire de sodium). Cette multitude d'informations physiologiques et biochimiques pourraient à terme aider dans la compréhension des processus physiopathologiques des maladies neurodégénératives et pour l'évaluation de nouvelles thérapies.

Notre objectif est le développement et la validation d'outils dédiés à la RMN à haut champ (7 et 11,7 Tesla), notamment les antennes radiofréquences, et les schémas d'acquisition optimisés pour les différents noyaux non-proton observables in vivo. La mise en place de nouveaux outils pour l'imagerie cérébrale permettra de réaliser un suivi plus précis de l'état du cerveau des patients et des modèles de primate non humain utilisés pour caractériser les mécanismes associés à ces maladies neurodégénératives.

Afin de réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire, les tests préliminaires seront systématiquement menés sur des objet-tests. Le nombre d'animaux a été réduit à un effectif de 10 nécessaire à la réalisation de 5 tests par semaine compte tenu du délai minimal de 15 jours entre chaque examen RMN. Par ailleurs, cet effectif devrait être suffisant pour acquérir des données de référence. D'autant plus que chaque animal sera réexaminé à plusieurs reprises (suivi longitudinal).

Afin de démontrer l'innocuité du champ magnétique de 11,7T et ainsi répondre aux exigences de l'ANSM, une étude ancillaire sera menée au cours de la première année de ce projet afin de suivre les fonctions mnésiques et exécutives (délivrés sur écran tactile sans restriction hydrique ou alimentaire) chez le macaque adulte exposé.

Le modèle primate se justifie par les similitudes anatomiques, physiologiques et biochimiques fortes permettant une extrapolation de nos protocoles aux conditions de la recherche clinique chez l'Homme. Les animaux utilisés pour ce projet sont nés et élevés dans des élevages agréés. Pour accumuler le maximum de données informatives après imagerie à très haut champs magnétique, les animaux seront soumis à des prélèvements sanguins. Leur hébergement enrichi suit les règles en vigueur de l'animalerie et les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance : anesthésie lors des examens RMN et paramètres physiologiques suivis en continu pour intervenir immédiatement. Des critères d'arrêt sont prévus dans ce projet afin de prendre en compte des effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation mettra en œuvre des traitements appropriés ou décidera d'une euthanasie.

2890. Cette demande est un renouvellement d'un précédent projet identique autorisé pour 3 ans arrivant à échéance. Les objectifs sont de former les étudiants de l'enseignement supérieur, dans le respect de la réglementation en vigueur, à la réalisation de projets scientifiques et l'étude de substances actives sur la pression artérielle ou le comportement, donc impossibles à tester par méthodes alternatives (remplacement). Les étudiants suivent des Unités d'enseignement de pharmacologie, de formation à la recherche et de formation réglementaire des maquettes pédagogiques de :

- 2° et 4° années des études de pharmacie

- Master 1 et 2

- DU d'Expérimentation Animale Niveau 1 (DU EA N1) (doctorants et/ou personnels)

Tous les gestes techniques (implantation de capteurs de télémétrie ou de cathéters vasculaires) sont réalisés préalablement par un enseignant-chercheur autorisé pour chirurgie qui prépare les animaux. Chaque groupe de 6 étudiants maximum (encadré par un enseignant-chercheur autorisé) travaille sur 6 à 9 animaux maximum. Les étudiants planifient et réalisent les expériences, sous surveillance de l'enseignant-chercheur qui vérifie les doses, les volumes et fréquences de prélèvement sanguin selon le poids, les méthodes d'injection, la bonne réalisation des procédures et le respect de l'éthique (raffinement). Afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés (réduction), chaque animal pourra suivre en tout et au maximum 3 procédures légères (P1, 2, 4, 7), espacées par 48 h minimum de repos, et une seule procédure modérée (P3, 5, 6) ou sans réveil (P8). Les animaux non mis à mort seront utilisés après une semaine de repos minimum comme donneurs d'organes dans des projets de recherche. Les formations concernent :

Gestes de base (rats)

- préhension, pesée, injections de liquide physiologique stérile sous-cutanée, intramusculaire, intrapéritonéale, ou administration d'eau par voie orale par gavage (P1)

- anesthésie fixe pour comparaison et choix des anesthésiques, respect des doses (P2)

- respect de l'environnement aseptique pour petites interventions et soins cutanés (P3)

Effets de substances cardiovasculaires administrées par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale chez le rat éveillé

- pression artérielle mesurée avec un manchon à la queue (P4) ou par un implant radiophonique implanté sous anesthésie minimum 1 mois avant (P5)

- mesure et recueil des urines pour dosages, après mise en cage métabolique maximum 24h (P6)

Effets de substances psychotropes chez le rat éveillé, administration sous-cutanée ou intrapéritonéale (P7)

- substances anxiolytiques ou stimulantes sur l'activité motrice et la capacité d'exploration

Effets de substances cardiovasculaires administrées par voie intraveineuse, cathéters vasculaires préalablement implantés et maintien de l'anesthésie par l'enseignant chercheur, chez le rat anesthésié (P8)

- pression artérielle et prélèvements sanguins pour dosage des substances ou de marqueurs biologiques dans le sang

Estimer le nombre total de rats qui seront inclus dans ce projet est difficile car ce nombre dépend directement du nombre de sous-groupes d'étudiants, de l'ouverture ou non de certains enseignements selon les années universitaires et des dates d'enseignement qui permettront, ou non, la réutilisation des animaux. En se basant sur 2013-2015 (373 rats en tout, dont 82 sans réveil, 75 pression artérielle à la queue + cages métaboliques, 122 psychotropes, 88 comparaison anesthésiques + suture cutanée, 6 démonstration pression radiophonique) pour une estimation large, un total de 500 rats maximum pour 3 ans seront concernés dont maximum 50 en procédure modérée télémétrie et 100 en procédure sans réveil. Soit, en détails :

- 2° année pharmacie, psychotropes : 40-45 rats / an

- 4° année pharmacie, substances cardiovasculaires, psychotropes : 30-40 rats / an

- Master 1 et 2, substances cardiovasculaires, psychotropes : 30-40 rats / an

- DU EA N1, Gestes bases – comparaison des méthodes de mesure de pression artérielle - substances cardiovasculaires : 40-45 rats / an

2891. Le développement d'un embryon nécessite toute une série d'étapes qui doivent être très finement contrôlées afin d'assurer la mise en place correcte des différents feuillets qui composent l'embryon proprement dit ainsi que des tissus nourriciers qui l'entourent. La génétique a permis de décrypter certains des mécanismes qui contrôlent le développement, en utilisant notamment les propriétés des cellules embryonnaires souches (cellules ES) dans lesquelles on peut assez facilement muter des gènes, puis étudier l'effet de ces mutations en les injectant dans des embryons puis en suivant leur devenir au cours du développement des chimères ainsi formés. Depuis quelques années, la biologie du développement s'intéresse aux mécanismes qui modulent l'expression des gènes en fonction du contexte : c'est l'épigénétique. Plus spécifiquement, nous

nous intéressons aux mécanismes épigénétiques dans les cellules dites "pluripotentes", c'est à dire celles qui vont former le fœtus proprement dit. Ces cellules pluripotentes apparaissent au stade blastocyste, 3 jours après la fécondation chez la souris puis se différencient progressivement pour former les trois lignages à l'origine de tous les types cellulaires de l'organisme. La période qui nous intéresse est donc entre le 3<sup>e</sup> et le 9<sup>e</sup> jour de gestation chez la souris. Nous nous proposons d'utiliser soit différentes cellules ES dans lesquelles certains mécanismes épigénétiques sont affectés et qui seront injectées dans des blastocystes, soit de traiter des embryons de stade équivalent avec des drogues à effets épigénétiques. Ces différents embryons, chimères ou traités, seront réimplantés dans des souris receveuses afin d'y poursuivre leur développement pendant 2 à 6 jours, jusqu'au sacrifice des souris porteuses. Le recours à l'étude des embryons in vivo est nécessaire pour étudier le devenir des cellules pluripotentes et les effets des drogues ou mutations étudiées sur la construction du fœtus dans son environnement.

Chaque expérience nécessitera de 6 à 20 souris donneuses de blastocystes et 4 à 16 receveuses, en fonction des effets observés. Sur l'ensemble du projet 920 souris au maximum seront utilisées. Afin de réduire au maximum ce nombre, nous avons choisi d'utiliser des lignées de souris qui donnent naturellement un grand nombre d'embryons (plus de 10). En outre, nous mutualiserons autant que possible les souris mâles qui servent à produire les embryons fécondés et à provoquer la gestation chez les femelles porteuses. Enfin seules les mutations et les drogues ayant montré clairement un effet in vitro sur les cellules pluripotentes en culture seront étudiées in vivo.

Le transfert d'embryons se fait sous anesthésie générale, selon un protocole qui permet une sédation profonde et un réveil rapide. Les animaux sont ensuite suivis pendant les jours qui suivent afin de contrôler leur bonne récupération. Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet sont élevés à des fins expérimentales et dans des conditions d'hébergement enrichi (pièce de coton à déchiqueter ajouté dans chaque cage) de l'Unité Expérimentale.

2892. L'objectif de cette demande d'autorisation est de valider l'ensemble des modalités d'imagerie in vivo de la plateforme d'expérimentation en cancérologie chez la souris et de former les utilisateurs.

L'imagerie in vivo chez le petit animal est en plein essor et présente un intérêt reconnu dans les domaines de la recherche biomédicale et du développement de nouveaux médicaments. Elle permet aux chercheurs d'ouvrir la voie à de nouveaux champs d'applications en imagerie diagnostique et pronostique et améliore le suivi physiopathologique au cours du temps. La mise au point d'imageurs in vivo non invasifs dédiés à l'imagerie du petit animal offre la possibilité de suivre des phénomènes biologiques complexes comme le développement d'une pathologie chronique (cancer, infection, inflammation, ...) ou l'efficacité d'un traitement par des mesures répétitives tout en évitant la mise à mort régulière de grands effectifs d'animaux en comparaison d'une approche in vivo invasive.

De plus, les technologies employées (caméras, produits de contraste...) ont maintenant des performances similaires à celles utilisées chez l'Homme, permettant ainsi une recherche biomédicale translationnelle et une meilleure prédictivité des résultats. Ce type de démarche vise à accélérer l'innovation et le passage en clinique des nouvelles thérapies. L'imagerie in vivo en cancérologie présente de nombreux avantages notamment pour l'observation du volume tumoral dans un organe profond comme les poumons, le cerveau, le pancréas... ce qui encourage l'utilisation de modèles tumoraux mieux adaptés (implantation dans l'organe d'origine, étude du microenvironnement). Il est également possible de suivre la biodistribution de molécules ou de cellules tumorales préalablement marquées et d'effectuer une validation préclinique de nouvelles molécules à visées thérapeutiques tout en étudiant les mécanismes d'actions impliqués dans l'organisme.

Les modalités d'imagerie disponibles au sein de la plateforme sont l'échographie (photoacoustique), le scanner à rayon X, la fluorescence et la bioluminescence. L'ensemble de ces systèmes d'imagerie sont complémentaires et sont non invasifs. La seule manipulation effectuée sur l'animal est l'injection d'agent de contraste ou de sonde fluorescente selon la modalité. Pour le confort de l'animal une anesthésie générale est réalisée permettant son immobilisation durant l'acquisition des images et évitant tout stress. Les utilisateurs souhaitant utiliser ces outils d'imagerie seront conseillés et accompagnés par l'opérateur de la plateforme sur les méthodologies adaptées à leur modèle expérimental (choix du système d'imagerie, fréquence d'observation et nombre d'animaux).

L'imagerie in vivo apparaît donc comme un outil adapté dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques en oncologie tout en respectant la règle des 3 R de l'éthique dans l'expérimentation animale (Réduire, Remplacer, Raffiner). Cette technologie permet notamment de réduire considérablement le nombre des animaux utilisés (suivi longitudinal sans mise à mort) et de raffiner les protocoles (absence de douleur, meilleur suivi pour tumeurs internes, meilleure définition de point limite prédictif d'un développement tumoral, étude fonctionnelle...)

Cette demande d'autorisation a pour objectif de valider l'ensemble des modalités qui seront appliquées au sein de la plateforme d'imagerie et de former les utilisateurs. Au total 442 animaux sur une période de 5 ans seront nécessaires.

2893. Pour étudier la biologie du cancer et l'efficacité de nouvelles approches thérapeutiques, les modèles animaux les plus pertinents et de plus en plus utilisés consistent à greffer un fragment de tumeur de patient (PDX pour "Patient Derived Xenograft) chez une souris immunodéprimée (présentant un système immunitaire fortement diminué voire inexistant). Cette approche permet de disséquer le comportement de la tumeur dans un environnement complexe. Cependant, ce type de modèle ne permet pas d'investiguer les interactions entre la tumeur et les cellules du système immunitaire, qui sont désormais reconnues comme jouant un rôle essentiel dans la modulation de la croissance tumorale et peuvent être manipulées à des fins thérapeutiques. Pour améliorer la pertinence du modèle, il est possible de reconstituer un système immunitaire humain dans des souris immunodéprimées par le transfert de cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34+ avant de greffer une tumeur de patient, mais les origines hétérologues (c'est à dire que la tumeur et les cellules immunitaires

proviennent de patients ou d'organismes différents) des cellules immunitaires et des cellules tumorales limitent la pertinence de ces approches en immuno-cancérologie.

Depuis 2006, il est possible de dériver des cellules souches pluripotentes (capables d'engendrer des cellules spécialisées) à partir de cellules différenciées (spécialisées) de patients. Ces cellules autologues (c'est à dire provenant du même patient), appelées iPS (pour cellules souches pluripotentes induites), présentent un très fort potentiel de différenciation et donc un intérêt majeur en médecine régénérative. Des publications récentes rapportent la différenciation de ce type de cellules in vivo, au sein de tératomes (tumeurs bénignes) en CSH capables de reconstituer un système immunitaire chez des souris immunodéprimées.

Dans ce contexte, notre projet vise à développer des modèles de PDX présentant un système immunitaire autologue pour étudier les interactions entre la tumeur et le système immunitaire du patient et à terme tester de nouvelles stratégies d'immunothérapie. Pour cela, nous proposons une stratégie expérimentale en 2 étapes :

- 1. L'injection de cellules iPS humaines, préparées à partir de cellules sanguines d'un patient, chez la souris immunodéficiente afin de former un tératome au sein duquel nous pourrions isoler des CSH CD34+ purifiées.

- 2. Les CSH CD34+ purifiées seront transférées chez de nouvelles souris immunodéficientes pour reconstituer un système immunitaire avant l'implantation d'un fragment de tumeur du même patient afin de générer un modèle PDX avec un système immunitaire autologue.

Cette approche devrait permettre de générer un modèle murin pertinent et innovant, permettant l'étude in vivo des interactions entre la tumeur et son environnement immunitaire et l'évaluation de stratégies thérapeutiques ciblant le système immunitaire (immunothérapie).

## 2- Retombées attendues

Les modèles murins PDX dans lesquels les tumeurs sont greffées chez des souris immunodéficientes sont informatifs pour suivre le développement tumoral in vivo mais inadaptés pour comprendre les interactions entre le système immunitaire et les cellules tumorales. Dans ce contexte, nous pensons que l'approche proposée dans ce projet pourrait constituer une avancée majeure en cancérologie en permettant d'étudier dans un modèle autologue les interactions cellules tumorales/cellules immunitaires.

## 3- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Les modèles PDX sont à ce jour les modèles les plus pertinents pour étudier les tumeurs humaines dans un environnement complexe in vivo. Par ailleurs, à notre connaissance, seul le passage par la formation de tératome in vivo permet la différenciation des cellules iPS en CSH fonctionnelles ; les approches de différenciation in vitro (co-culture des iPS avec des lignées stromales et des cytokines, reprogrammation...) ne génèrent pas de CSH multipotentes capables de reconstituer efficacement un système immunitaire après greffe chez la souris.

Dans chaque bloc d'expérimentation, le nombre de souris a été réduit au minimum nécessaire pour répondre à la question posée sans ambiguïté.

Les techniques utilisées minimiseront la souffrance animale (utilisations d'anesthésique et d'analgésique). Un suivi adapté des animaux et la définition de points limites précoces et prédictifs de l'apparition d'un mal être permettent de limiter au maximum toute souffrance animale.

## 4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

326 souris immunodéficientes NSG seront utilisées pour réaliser le projet.

2894. Les tendinites du tendon fléchisseur superficiel du doigt (TFSD) sont des blessures communes et potentiellement dévastatrices pour tous les chevaux de sport et particulièrement les chevaux de course. Ces atteintes restent cliniquement difficiles à traiter et ont un haut taux de récurrence. Le développement de nouvelles techniques de traitements, notamment de médecine régénérative, est nécessaire pour améliorer le pronostic de ces atteintes. Notre équipe se propose de travailler sur un traitement innovant des tendinites du tendon fléchisseur superficiel du doigt des chevaux, en utilisant la thérapie au laser.

Pour tester l'efficacité de ce traitement, nous mettons en place, sur des chevaux sains, une tendinite de façon expérimentale, par une méthode chirurgicale légère. Nous utiliserons ensuite le laser thérapeutique à haute intensité durant la phase aiguë de la cicatrisation. Nous projetons ensuite de suivre l'évolution des lésions par un suivi et une évaluation clinique régulière, et en utilisant l'imagerie médicale telle que l'échographie et l'IRM.

Nous utiliserons pour ce travail 8 chevaux adultes. C'est le nombre minimal de chevaux nécessaires pour mettre en évidence une efficacité clinique du traitement. Les animaux seront hébergés dans un haras destiné à la recherche, dans des boxes paillés couverts et soignés tous les jours ou en paddock extérieur commun. Ils resteront au repos et des mesures seront prises pour soigner toute douleur trop importante induite par la mise en place de la tendinite.

Cette étude va permettre de mettre en avant d'éventuels avantages thérapeutiques de l'utilisation du laser à haute intensité dans le traitement des tendinites du tendon fléchisseur superficiel du doigt et ainsi pouvoir proposer cette thérapie aux propriétaires et entraîneurs de chevaux atteints par ces lésions.

2895. Le fonctionnement du cerveau repose sur le transfert d'information de neurone en neurone au niveau de la synapse. Ce transfert d'information est aussi finement régulé par un troisième partenaire clé de la synapse : l'astrocyte.

Dans de nombreuses maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, la qualité de la transmission de l'information est précocement altérée, contribuant à l'apparition de symptômes invalidants. Ces maladies se caractérisent également par la transformation des astrocytes en astrocytes dit « réactifs ». Est-ce que les astrocytes réactifs jouent un rôle dans l'altération du transfert d'information ? C'est ce que nous allons étudier.

Pour cela, nous utiliserons une méthode originale nouvellement développée, basée sur des vecteurs viraux contenant des gènes transférés par injection stéréotaxique, pour induire la réactivité astrocytaire dans le cerveau de rongeurs, ou à l'inverse, la bloquer dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer. Par une approche multidisciplinaire alliant des analyses électrophysiologiques, histologiques et biochimiques, nous déterminerons quelle est la part des astrocytes réactifs dans les déficits de la communication entre neurones, afin d'évaluer leur potentiel thérapeutique.

Ce projet qui cible non pas directement les neurones mais leurs partenaires, les astrocytes, aura un impact important sur le développement de nouvelles thérapies, car les déficits synaptiques et la réactivité astrocytaire sont des éléments communs à de nombreuses pathologies cérébrales.

Le projet prévoit au maximum 330 rongeurs nés et élevés dans des élevages agréés à des fins scientifiques. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats.

Les méthodes expérimentales (injection stéréotaxiques dans le cerveau sous anesthésie et euthanasie pour prélèvement et étude du cerveau) ont été choisies en accord avec le vétérinaire de l'installation, pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Le suivi quotidien des rongeurs hébergés en groupe dans un milieu enrichi et l'application de critères d'arrêts en élevage et en expérimentation, permettra de garantir leur bien-être. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

2896. L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe des ingrédients à pouvoir sucrant, destinés à l'alimentation humaine. Les ingrédients à pouvoir sucrant permettent de réduire le taux de sucre des aliments dans lesquels ils sont additionnés et ainsi réduire le contenu calorique sans en modifier la saveur. Ces ingrédients sont donc d'un intérêt tout particulier pour la production d'aliments santé visant à favoriser la minceur.

L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'impact d'une alimentation chronique pendant 10 semaines par six régimes alimentaires de compositions différentes (dont un régime contrôle) sur la prise alimentaire, le poids corporel, la glycémie et l'insulinémie chez la souris sauvage saine. L'étude sera réalisée en aveugle, et les différents régimes seront dispensés sous la forme de granulés colorés afin d'identifier les différents régimes.

Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de mettre en évidence l'impact différentiel de leurs ingrédients à pouvoir sucrant sur les paramètres d'intérêt.

Un total de 60 souris C57BL/6 sera utilisé, divisé en six groupes de 10 animaux (un groupe par régime). Les régimes seront administrés pendant 10 semaines au cours desquels des mesures de prise alimentaire et de poids corporel seront réalisées de façon hebdomadaire. Trois prélèvements sanguins seront pratiqués, avant administration des régimes, après 6 semaines de régime et après 9 semaines de régime, pour mesure de la glycémie et de l'insulinémie. Un prélèvement d'organes (foie, tissu adipeux et muscle gastrocnémien) sera réalisé à l'issue des 10 semaines de régime.

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

- Raffinement: Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et le métabolisme glucidique. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages collectives (5 souris/cage) et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification.

Enfin, bien que le protocole soit très peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté pour chaque série expérimentale en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un régime alimentaire sur le poids corporel, la prise alimentaire et le métabolisme glucidique.

2897. Afin de faire face à la variabilité environnementale, qu'elle soit naturelle ou d'origine anthropique, les poissons disposent de quatre grandes catégories de réponses i.e., comportementale, physiologique, métabolique et morphologique. Bien que fonctionnellement indissociables les unes des autres, ces catégories de réponses sont pourtant trop souvent étudiées séparément. Cette dissociation résulte pour une bonne part de la séparation des champs scientifiques correspondants, et elle conduit à un manque de compréhension intégrée des réponses des poissons face aux contraintes du milieu. Cette situation est particulièrement préjudiciable lors de l'évaluation de l'impact biologique d'un déversement accidentel de contaminants.

Les études d'écotoxicologie conduites à ce jour ont largement démontré que lors d'un déversement, les poissons procèdent à des ajustements d'ordre comportemental (e.g., évitement), physiologique (e.g., détoxification), métabolique (e.g., dissipation d'énergie) et/ou morphologique (e.g., tube digestif, branchies). Pourtant il n'existe, à notre connaissance, aucune étude ayant tenté une approche intégrée de ces quatre types de réponses. De plus, les notions de variabilité intra- et interindividuelle sont rarement abordées dans ce contexte, limitant notamment la mise en évidence de compromis morpho-fonctionnels entre les quatre dimensions de l'enviro-régulation chez les poissons.

La première ligne de défense d'un poisson confronté à des conditions de milieu défavorables est d'ordre comportemental (e.g., détection, évitement), les autres types de réponse (notamment celles d'ordre physiologique) n'intervenant qu'une fois le répertoire comportemental épuisé ou rendu inefficace. Etablir les traits de personnalité des animaux étudiés (timide/téméraire, proactif/réactif) est donc indispensable pour comprendre comment un animal répond à des conditions défavorables.

Les objectifs de cette demande sont de :

1) Valider deux méthodes de criblage rapides des traits de personnalités des individus composant une population de poissons  
- Test en canal de nage : Il vise à distinguer des personnalités (audacieux vs craintifs) selon la position des individus dans un canal à flux laminaire.

- Test de confinement : Il vise à distinguer des personnalités (proactif vs réactif) en quantifiant le nombre de tentatives d'échappement et la durée totale de ces tentatives au cours d'un épisode de stress combinant confinement et émergence.

- Valider des méthodes d'analyses plus fines des traits de personnalité identifiés lors des criblages. Ces méthodes chercheront à mesurer le degré de témérité, d'audace et d'agressivité des individus

- Témérité/Exploration : Ces comportements seront quantifiés en observant la réaction d'un individu placé dans un nouvel environnement, faisant face à un nouvel objet et devant s'alimenter sous risque simulé de prédation.

- Agressivité : Ce comportement sera quantifié en exposant chaque individu à son propre reflet dans un miroir

Caractériser des traits de personnalité dans une population de poissons, implique l'utilisation d'animaux vivants (Remplacement). Notre modèle sera le bar (*Dicentrarchus labrax*), une espèce importante tant en termes écologique qu'économique. Ce projet mobilisera 800 poissons, répartis en 8 lots. Les nombres de lots et de poissons ont été déterminés par des calculs de puissance statistique, reposant sur la mise en œuvre d'analyses de variance. Ces nombres permettront la prise en compte de l'étendue de la variabilité interindividuelle naturelle (Réduire), tout en tenant compte des contraintes zootechniques telles que la densité minimale d'animaux requise en élevage pour ne pas induire de perturbations comportementales (Raffiner).

Des expositions éventuelles à des contaminants d'origine anthropiques (cf. introduction), seront envisagées ultérieurement en fonction des résultats obtenus, elles feront dans ce cas l'objet d'une autre demande de projet.

2898. Les lymphomes représentent le 6ème rang par ordre fréquence des cancers survenant chez les hommes et les femmes ainsi que le 7ème en terme de cause de décès par cancer en France. On diagnostique en France 11 000 nouveaux cas chaque année et près d'un patient sur deux atteint d'un lymphome décède de sa maladie. Le développement de nouveaux traitements est donc nécessaire.

Les algues du littoral français sont de bons candidats thérapeutiques notamment pour leurs propriétés immunostimulantes sur le système immunitaire. En effet, des études in vitro ont démontré l'activité immunostimulatrice d'un composé extrait à partir d'une macroalgue poussant sur le littoral français. Ce composé a ensuite été testé in vivo dans un modèle de lymphome murin exprimant l'antigène humain CD20. Les résultats obtenus ont démontré que l'association de ce composé et d'un anticorps thérapeutique, appelé le rituximab, et ciblant l'antigène CD20 permettait d'obtenir 75% de survie des animaux.

Le recours à une synthèse chimique de ce composé s'est rapidement imposé afin de préserver les ressources naturelles, mais également en raison du faible rendement d'extraction du composé à partir des algues collectées sur le littoral (0.5% de matière sèche), ceci a permis d'augmenter la disponibilité du composé. L'activité de ce composé synthétique a été testée in vitro sur cellules de patients et sur lignées cancéreuses. Les résultats obtenus ont montré qu'il avait la même activité anti-tumorale que celle du composé naturel.

En raison des résultats obtenus in vitro, nous souhaitons évaluer dans cette étude in vivo l'activité thérapeutique de ce composé synthétique en le comparant au composé naturel et au rituximab qui est actuellement le traitement de référence dans cette pathologie.

Pour ce faire nous utiliserons 108 souris C57BL6 greffées par un lymphome murin exprimant l'antigène CD20 humain qui seront scindées en 9 groupes de 12 souris afin d'avoir tous les contrôles nécessaires.

Ce projet se fait selon le respect de la règle des 3 R. La toxicité et les activités thérapeutiques de ces deux composés ont dans un premier temps été testée in vitro sur cellules sanguines saines et de patients (principe de remplacement). Le nombre d'animaux (9 souris x 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'anxiété des animaux en assurant des soins et une médication appropriée (principe de raffinement).

2899. Les médicaments destinés à traiter l'anxiété (anxiolytiques de type benzodiazépines), sont efficaces mais provoquent des effets secondaires majeurs (sommolence, tolérance et dépendance psychologique et physique) qui limitent leur utilisation. Les médicaments destinés à traiter la dépression (antidépresseurs) ne sont actifs qu'après plusieurs semaines d'administration et pour seulement la moitié des patients. Les médicaments destinés à traiter la dépendance à l'alcool ou au tabac ne sont que partiellement efficaces avec un taux de rechute très important. Il s'avère donc nécessaire de trouver d'autres médicaments plus efficaces et mieux tolérés par les patients pour soigner ces pathologies.

Pour répondre à ces besoins thérapeutiques, l'étude comportementale chez le rongeur est aujourd'hui le seul moyen permettant de reproduire certains aspects physiques et psychologiques de maladies neuropsychiatriques. Ainsi, le rongeur peut être exposé à un environnement stressant qui va induire des comportements de type déprimés ou anxieux (repli sur soi,

démotivation, perte de plaisir...) proche de ceux observés chez l'homme. Les candidats médicaments testés devront atténuer ou supprimer les comportements délétères induits.

Aucune méthode alternative ne permet à ce jour de tester les impacts physiques et psychologiques du stress, de l'anxiété ou de la dépression.

Pour la plupart des tests, des mesures objectives et bien définies des comportements permettent de réduire la variabilité des résultats et le nombre d'animaux utilisés. En dehors des phases de test, les conditions d'hébergement sont améliorées par des dispositifs d'enrichissement (tunnel par exemple) pour les rats conservés plusieurs semaines.

Un effectif maximum de 3 900 rats et 1 0600 souris sur 5 ans (soit 780 rats et 2120 souris par an) est nécessaire pour la conduite de ce programme incluant plusieurs dizaines de molécules par an.

2900. Les retardateurs de flamme bromés (RFB) sont des substances chimiques incorporées dans certains plastiques, textiles et matériaux de construction pour leur conférer une propriété ignifuge. Certains sont listés parmi les Polluants Organiques Persistants en raison de leur persistance dans l'environnement, leur bioaccumulation dans les tissus lipidiques et leur toxicité pour l'homme et la faune. A faible dose, ces composés sont considérés pour l'homme comme des neurotoxiques et des perturbateurs endocriniens. La consommation d'aliments contaminés serait la principale voie d'exposition. De ce fait, la présence de plusieurs RFB tels que l'hexabromocyclododécane (HBCD), les polybromodiphényléthers (PBDE) et les polybromobiphényles (PBB) est recherchée dans les produits animaux depuis 2008 dans le cadre de plans de surveillance européens. Les plans français en 2008 et 2009 ont révélé l'existence, très rare, d'œufs et de viandes de volailles contaminés par les HBCD à des niveaux plus de 1000 fois supérieurs au bruit de fond habituel. L'origine de ces contaminations atypiques reste à ce jour inconnue mais l'hypothèse la plus probable serait celle d'une contamination des animaux via l'ingestion directe d'un matériau de construction du poulailler, puisque certains matériaux isolants utilisés contiennent des RFB. De par son comportement naturel de picotage et de grattage, l'oiseau pourrait en effet ingérer directement ce matériau dans le cas d'une paroi de bâtiment dégradée. Néanmoins, il n'est pas actuellement prouvé que des poules ayant accès à ce type de matériau puissent se contaminer et qu'en résulte la production d'œufs contenant des RFB.

L'objectif de cette expérimentation est de démontrer la possibilité de transfert d'HBCD dans l'œuf via la mise à disposition dans l'environnement des poules d'un matériau ignifugé. Au sein d'un bâtiment expérimental, une cage aménagée de 60 poules pondeuses en fin de cycle de ponte (70 semaines) sera testée. Une plaque du matériau ignifugé sélectionné sera fixée verticalement à la paroi latérale de la cage afin de reproduire l'hypothèse de l'accès à l'isolant dans un pan de mur abîmé du poulailler.

Un point « zéro » avant la mise en place du matériau est réalisé afin de connaître la contamination initiale, qui servira de niveau témoin. Le matériau sera délité progressivement par picotage grattage des poules, vraisemblablement en quelques jours, et ne sera pas remplacé. Les animaux de la cage test sont surveillés quotidiennement, leur comportement ainsi que le niveau de production d'œufs est relevé. Tous les œufs de la cage seront ramassés une fois par jour en vue de leur analyse. Des prises de sang seront effectuées sur 10 poules à J0 et juste avant abattage. La durée maximale d'expérimentation sera de quatre semaines. Les animaux seront ensuite euthanasiés. Des autopsies seront réalisées sur 5 d'entre eux afin de réaliser des prélèvements tissulaires complémentaires. Afin de limiter au maximum le nombre d'animaux impliqués, les poules expérimentées seront leurs propres témoins. L'ingestion d'HBCD ne provoquant pas de symptômes spécifiques, le protocole expérimental n'entraînera pas de souffrance animale.