



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR,
DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION

Résumés non techniques des projets autorisés (43)

4301. Les maladies rétinienne, cause majeure de perte de vision à travers le monde, sont caractérisées par une dégénérescence des photorécepteurs. Aujourd'hui, elles restent malheureusement incurables. Afin de pouvoir un jour soigner ces maladies, il est essentiel de mieux comprendre les processus de développement et de survie des photorécepteurs. Les études menées chez les patients étant à l'évidence très limitées, des modèles animaux sont nécessaires pour décrypter les mécanismes mis en place dans ces cellules. Dans ce contexte, l'objectif du projet est d'étudier le rôle de nouveaux gènes spécifiques des photorécepteurs. L'originalité du projet est qu'il repose sur l'utilisation d'une nouvelle méthode de modification ciblée du génome, appelée CRISPR/Cas9. Cette méthode ouvre de nouvelles perspectives technologiques pour l'étude de gènes par perte de fonction («knock-out») ou par l'insertion d'un gène rapporteur de leur activité («knock-in»).

Nous souhaitons donc analyser l'impact de la perte de fonction de gènes candidats via la méthode CRISPR/Cas9 sur les processus de spécification et de différenciation des photorécepteurs au cours du développement de la rétine, et sur leur survie à des stades post-embryonnaires.

D'autre part, nous voulons utiliser la technique CRISPR/Cas9 pour insérer un fragment d'ADN permettant l'expression d'une protéine fluorescente dans un type cellulaire rétinien donné. Les lignées générées constitueront des outils essentiels pour suivre facilement le comportement d'une population cellulaire fluorescente dans la rétine.

Avantages et dommages escomptés

Le xénope est un organisme modèle majeur en embryologie. L'embryon est accessible à tous les stades développementaux favorisant ainsi l'observation.

L'essentiel de nos expériences concernent des larves non-autonomes. Les phénotypes attendus affectent une population précise de cellules dans un organe non-vital. Il est important de souligner que la déficience visuelle consécutive à une perte des photorécepteurs, comme dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou la rétinite pigmentaire, est indolore, mais potentiellement handicapante chez le xénope bien que la vision ne soit pas un sens essentiel. Le niveau de sévérité attendu est donc de classe légère.

Nombre et types d'animaux utilisés sur 5 ans

4688 au total : 2608 pour établir les lignées et 2080 pour analyses aux stades larvaires autonomes.

Conformité avec les exigences 3R

Le choix du modèle et des procédures repose sur les propriétés suivantes :

- i) La fécondation in vitro permet d'obtenir plusieurs milliers d'embryons à partir d'un nombre restreint d'adultes permettant plusieurs expérimentations simultanées, une réduction de la variabilité et une analyse statistique robuste des résultats.
- ii) Le développement embryonnaire externe et l'utilisation de rapporteurs fluorescents permettent des observations/manipulations non-invasives.
- iii) De nombreuses expériences se restreignent aux formes larvaires non-autonomes.
- iv) La période de reproduction étant de 15 ans, le xénope représente un excellent modèle pérenne pour les études génétiques.
- v) Le xénope est le premier amphibien au génome décodé permettant des approches de bio-informatique en amont, voire en substitution, du vivant.
- vi) Les femelles peuvent être induites à pondre tous les 4 mois pendant 15 ans ce qui contribue à les habituer aux manipulations et réduit le stress.
- vii) L'utilisation d'anesthésiques/analgésiques n'est pas contre-indiquée.

4302. L'arthrose est une maladie articulaire qui touche environ 10 à 15% des personnes de plus de 60 ans, selon l'OMS. D'ici 2050, on estime que 130 millions de personnes dans le monde souffriront d'arthrose, et 40 millions d'entre elles seront fortement handicapées par la maladie. Bien qu'elle puisse aussi affecter les plus jeunes, sa prévalence augmente fortement avec l'âge (elle atteint environ 80 % des plus de 75 ans) et l'obésité, entraînant des symptômes de gravité variable. L'impact socio-économique de cette maladie est conséquent puisque des analyses ont montré que les coûts directs représentaient, en France, déjà plus de 1,6 milliard d'euros en 2002, soit environ 1,7% des dépenses de l'assurance maladie.

Il s'agit d'une maladie articulaire dégénérative (non réversible) d'étiologie complexe. Elle se caractérise par la dégradation progressive du cartilage articulaire mais touche également l'ensemble des tissus articulaires et péri-articulaires. Les symptômes cliniques occasionnés par la maladie sont la douleur chronique, la raideur, la déformation des articulations et le bruit articulaire. En plus de séquelles physiques, elle entraîne de lourdes séquelles psychologiques, une baisse de la qualité de vie et une mortalité accrue lors de co-morbidités cardio-vasculaires.

Il n'existe pas de schéma précis pour le traitement de l'arthrose. Le but du traitement est de réduire la douleur, d'améliorer la qualité de vie ainsi que la mobilité afin, si possible, de ralentir ou stabiliser la progression de la maladie afin de retarder l'arthroplastie, consistant en un remplacement synthétique total ou partiel de l'articulation.

En l'absence de traitement structural efficace, les médicaments prescrits sont à visée antalgique avec notamment les anti-inflammatoires ou les AASAL (anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente). Parmi les AASAL, la viscosupplémentation est de plus en plus proposée pour les symptômes douloureux de l'arthrose. Elle consiste en une ou plusieurs injections intra-articulaires d'acide hyaluronique (AH), l'un des constituants naturels du liquide synovial.

Les études récentes menées dans notre laboratoire montrent que le ménisque est un marqueur précoce de l'arthrose du genou. Dans ce cadre une injection de viscosupplément 15 jours après une rupture du ligament croisé antérieur du genou (LCA) modifie fortement la surface en la rendant beaucoup plus lisse et en permettant un contact beaucoup plus glissant. Cependant les propriétés mécaniques internes du ménisque restent dégradées suggérant une altération dès les premiers jours suivant l'opération.

Cette évaluation ne peut se faire que chez l'animal, car elle nécessite une articulation entière arthrosique. Le modèle expérimental retenu est un modèle chirurgical par rupture du LCA chez le lapin, car il est adapté pour notre étude et bien décrit dans la littérature. Douze 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 (morbidité et mortalité du modèle faible) et de la variabilité limitée des réponses (n=6 par groupe et 2 groupes).

L'intervention chirurgicale visant à induire l'arthrose, ainsi que les injections intra-articulaires, seront réalisées par un chirurgien vétérinaire et les animaux recevront systématiquement un traitement anti-douleur avant, pendant et après (3 jours) l'opération. Des soins post-opératoires adaptés à l'espèce seront mis en place, deux fois par jour, afin d'assurer un rétablissement rapide.

Durant toute l'étude, les animaux seront hébergés dans des cages individuelles équipées d'une cachette et d'une tablette de repos. Ils auront à leur disposition des blocs de bois à ronger, ainsi que des carottes et des jouets en plastique.

La mise à mort des animaux sera effectuée suivant les bonnes pratiques relatives à l'espèce (injection létale intraveineuse) et l'ensemble des tissus des articulations du genou seront exploités.

4303. Evaluation de l'efficacité alimentaire chez la brebis Lacaune

Dans un contexte économique (volatilité des prix des aliments), environnemental (changements climatiques) et sociétal (demande pour une agriculture raisonnée) en pleine évolution, les élevages de ruminants sont amenés à réduire l'utilisation d'aliment concentré et à valoriser au maximum les ressources alimentaires dont ils disposent (fourrages et pâturages). Cependant, ces ressources, sensibles aux aléas climatiques, peuvent avoir une disponibilité et une qualité moindres et plus fluctuantes dans le temps. Dans ce contexte, disposer d'animaux capables d'utiliser le plus efficacement possible leur alimentation tout en maintenant leur production devient un enjeu clef des systèmes d'élevages laitiers. L'efficacité alimentaire peut-être décomposée en deux grandes capacités : celle à ingérer la juste quantité d'aliments et de nutriments nécessaire pour vivre, produire et se reproduire, et celle à constituer puis mobiliser des réserves lipidiques pour faire face à des variations de disponibilité et/ou de qualité d'aliment (dynamique des réserves corporelles). Pour ces deux composantes, on observe de grandes différences entre les individus sans connaître les mécanismes qui les expliquent.

A travers ce projet nous cherchons à répondre aux questions suivantes :

- Les différences d'efficacité alimentaire entre individus sont-elles dépendantes du numéro de lactation et/ou de la densité énergétique de la ration disponible?

- Existe-t-il un lien entre aptitude génétique à la persistance laitière et efficacité alimentaire ?

- Quels sont les composantes du déterminisme génétique de la capacité à mobiliser/reconstituer les réserves corporelles ?

Il s'agit ici de répondre à une problématique des filières de ruminants laitiers. Le projet nécessite donc d'utiliser des animaux ruminants vivants placés dans des conditions classiques d'élevage, sans remplacement possible par des modèles murins ou des approches in vitro. Il reposera sur des brebis laitières de race Lacaune. Pour répondre aux questions posées il sera nécessaire de mesurer les quantités d'aliments ingérées par les animaux, ainsi que des marqueurs sanguins du métabolisme. Les manipulations spécifiques au protocole seront réalisées sur un nombre restreint d'animaux (n= 96), lors de leurs 3 premières lactations. Elles consisteront en un contrôle en lot ou individuel des quantités d'aliments ingérées en période de bergerie durant 1 mois avant mise-bas et 70 jours pendant la lactation, et à 8 prélèvements sanguins au cours d'une année de production. Aucun effet indésirable de ce contrôle d'ingestion (sans contention, ni isolement) ou de ces prises de sang n'est attendu. En troisième lactation, ces animaux recevront pendant 30 jours une ration couvrant 80% des besoins en énergie, mimant ainsi une situation classique en élevage lorsque par exemple les fourrages sont de mauvaise qualité. Le contrôle d'ingestion sera prolongé pendant cette période et 4 prises de sang supplémentaires seront réalisées. L'effectif de ce premier groupe d'animaux a été raisonné pour explorer la variabilité interindividuelle et obtenir des réponses statistiquement significatives sur la relation entre aptitude à la persistance laitière et efficacité alimentaire. Pour l'analyse du déterminisme génétique de la dynamique des réserves corporelles, un protocole allégé de prises de sang (à 3 reprises aux moments physiologiques clefs du cycle de production) sera appliqué à un deuxième groupe de 344 brebis du troupeau, en lactation en même temps que le premier groupe, pendant les 3 années du projet afin de mesurer les marqueurs du métabolisme.

Les conditions de conduite des brebis sont similaires à celles habituelles en élevage ovin laitier Lacaune : en bergerie l'hiver puis au pâturage dès le printemps. Les procédures expérimentales sont légères et limitées dans le temps. Au terme de l'expérience, les animaux seront conservés en vie et replacés dans le cycle normal d'un l'élevage classique.

Les attentes de ce projet sont, d'une part une meilleure connaissance des mécanismes biologiques liés à l'efficacité alimentaire des ruminants laitiers au cours de leur carrière, et d'autre part des premiers éléments sur le déterminisme génétique de ce caractère.

Les résultats devraient permettre à plus long terme d'élaborer des stratégies de sélection génétique d'animaux mieux adaptés à l'utilisation de ressources fourragères.

Le projet débutera en Août 2016 et durera 3 ans.

4304. Les maladies infectieuses sont fréquentes en élevage bovin, elles sont responsables de pertes économiques qui fragilisent les exploitations agricoles et impactent le bien-être des animaux. Le développement des connaissances sur l'immunologie des bovins est nécessaire pour améliorer les moyens d'intervention, notamment par la sélection d'animaux résistants aux maladies, permettant ainsi de réduire la fréquence et la sévérité des infections.

Le protocole expérimental consiste à étudier la réponse inflammatoire de la mamelle chez des vaches sélectionnées pour être plus résistantes ou plus sensibles aux mammites. Cet essai a pour objectif de mettre en évidence un lien entre la sensibilité des animaux aux mammites et une réponse inflammatoire de plus ou moins grande intensité. Ce protocole s'inscrit dans une démarche visant à mieux comprendre les mécanismes de l'inflammation et, à terme, d'améliorer la résistance aux mammites des vaches laitières.

L'essai concerne 30 vaches laitières de race Holstein, une moitié appartenant au lot « résistantes » et l'autre au lot « sensibles ». L'essai sera mené en fonction des dates de vêlage des animaux pour mesurer la réponse inflammatoire dans les deux mois après-vêlage.

L'inflammation sera induite par une infusion dans un des trayons des vaches d'un composé non infectieux mimant une infection bactérienne. L'infusion de l'agent inducteur d'inflammation se traduira par une inflammation modérée avec un pic 8h post-infusion et une résorption puis un retour à la situation d'origine dans les 4-5 jours suivant.

Une diminution de la production laitière est attendue dans les quelques jours suivant le déclenchement de la réponse inflammatoire avec un retour au niveau de production initial après cette période.

Le projet est conçu pour être en conformité avec les exigences 3R :

Remplacement : les informations collectées lors de ce protocole ne porteront pas sur des espèces modèles (souris) mais sur une espèce concernée par les mammites (vache). Par ailleurs, il n'existe pas de méthode alternative à cette approche du fait de la nécessité d'une évaluation globale de la réponse au niveau de l'animal.

Réduction : deux groupes de 15 vaches seront suffisantes pour obtenir une puissance statistique permettant de comparer la réponse des animaux avec leur appartenance au lot résistant ou au lot sensible.

Raffinement : l'utilisation d'un composé non infectieux pour le déclenchement de l'inflammation réduit l'intensité de l'inflammation et permet de mimer les premières étapes d'une vraie infection. Les prises de sang réalisées ne nécessitent qu'une contention minimale, les animaux étant habitués à être pris au cornadis pour la distribution des aliments. La douleur causée par l'aiguille ne nécessite pas d'anesthésie.

4305. Le cancer de l'ovaire est la quatrième cause de décès par cancer chez la femme derrière le cancer du sein, du côlon et du poumon. À cause de ses symptômes discrets et peu spécifiques, il est souvent découvert tard, au stade métastatique. Il est ainsi responsable de 3150 décès par an en France. A ce stade de la maladie, les chimiothérapies disponibles aujourd'hui n'ont pas ou peu d'effet. Les intégrines sont une famille de protéines intervenant dans l'adhésion des cellules entre elles et aussi avec leur environnement. Dans les cellules tumorales une modification d'expression de ces protéines joue un rôle dans la prolifération, la migration de celles-ci et par conséquent l'apparition des métastases. Il a été montré récemment que l'une des intégrines, joue également un rôle dans l'apparition de la résistance des cellules aux agents anticancéreux.

Une nouvelle molécule, ayant comme cible cette protéine, est disponible. Cette molécule in vitro et in vivo a montré son efficacité sur des modèles précliniques résistants aux thérapies anticancéreuses tels que les glioblastomes. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité anti-tumorale de cette nouvelle thérapie ciblée, seule ou en association avec les chimiothérapies, sur nos modèles de xénogreffes de cancer de l'ovaire. Ces modèles sont obtenus à partir des fragments de tumeurs de patientes implantées directement sur les souris immunodéprimées afin de pallier le rejet de la greffe. L'analyse de ces modèles montre qu'ils sont représentatifs des tumeurs humaines dont ils sont issus. Pour tester l'efficacité de cette nouvelle molécule, sur les xénogreffes de l'ovaire, le nombre total de souris nécessaire est de 555 souris. Ce nombre est réduit à son strict minimum nécessaire et tient compte d'une part du taux de prise tumorale (67%) sur les animaux et d'autre part d'un nombre minimum d'animaux nécessaire, ici 10 souris par groupe, pour une évaluation statistique robuste. En tenant compte de ces 2 paramètres, il faut greffer 15 souris par groupe de traitement.

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

4306. Les macrophages sont des composants cellulaires du système immunitaire inné. Ils résident dans tous les tissus des vertébrés y compris ceux de l'Homme où ils contribuent à l'immunité, la réparation et l'homéostasie tissulaire. Historiquement, les macrophages sont considérés comme étant des cellules à durée de vie courte qui sont continuellement remplacés par de nouvelles cellules produites par la cellule souche hématopoïétique (CSH) présentes dans la moelle osseuse. Bien que ce mode de production se produise, principalement dans des conditions inflammatoires, il n'est pas majoritaire et des données récentes de la littérature démontrent que les macrophages tissulaires proviennent de progéniteurs embryonnaires, qu'ils se développent dans les tissus de résidence et y persiste à l'âge adulte en proliférant localement. Puisqu'ils ont une durée de vie longue et que le stock est maintenu dans le tissu grâce à la prolifération locale, les macrophages sont eux aussi soumis au vieillissement et nous avons montré

récemment que les capacités de prolifération des macrophages tissulaires diminuent avec l'âge. Par ailleurs, en dehors d'être des acteurs centraux de la réponse immunitaire innée, les macrophages sont aussi impliqués dans des processus de régénération. Ils sont par exemple nécessaires à la remarquable capacité des vertébrés inférieurs, tels que des salamandres et des poissons, de guérir des blessures sans cicatrice et de régénérer des parties complexes du corps telles que les membres. Bien que les capacités de régénération des mammifères soient plus limitées, la régénération de certains organes tels que le muscle, le foie et le cœur chez le nouveau né, est aussi dépendante des macrophages. De manière intéressante, nous avons récemment observé que les macrophages cardiaques résidents ainsi que les macrophages alvéolaires (ceux des alvéoles pulmonaires) ont un taux de prolifération qui diminue drastiquement avec l'âge et cette perte de prolifération est corrélée avec la perte de capacité de régénération du muscle cardiaque ou de la fonction pulmonaire. Sur la base de ces observations, il devient central de comprendre si le vieillissement, ou ses conséquences moléculaires, peut être inversé afin de « relancer » la prolifération locale et ainsi retrouver de meilleures fonctions immunitaires et régénératives des macrophages chez les personnes âgées. Ainsi, nous souhaitons analyser les mécanismes moléculaires contrôlant la fonction et la prolifération des populations de macrophages tissulaires de différentes origines ontogénétiques dans différents contextes inflammatoires ou d'historiques de prolifération. De plus, nous voulons étudier l'implication, dans la prolifération locale des macrophages tissulaires, des facteurs de transcription connus pour contrôler la prolifération des cellules souches et tenter d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans ce processus. Nous étudierons principalement les macrophages cardiaques et alvéolaires pour lesquels nous avons déjà de nombreuses données. Dans l'impossibilité d'obtenir des échantillons de macrophages de différents tissus humains (nécessitant des prélèvements invasifs), l'utilisation de modèles animaux est indispensable. De plus, la seule manière d'aborder de manière efficace et pertinente les questions que nous posons est de combiner des expériences *in vivo*, en utilisant les différents modèles de souris génétiquement modifiées que nous avons développées ces dernières années dans l'équipe, avec des analyses moléculaires et cellulaires. Ne pouvant donc pas remplacer le modèle murin, nous réduirons autant que possible leur utilisation. Ainsi pour chaque expérimentation, les macrophages de plusieurs tissus seront analysés et répartis entre les différents membres de l'équipe pour une analyse aussi complète que possible de chaque lot d'animaux. Durant l'ensemble de l'étude, les souris seront hébergées dans des conditions conformes à la réglementation européenne en vigueur (environnement contrôlé : température et ventilation régulées, lumière avec un cycle de 12h, hygrométrie), avec un accès continu à la nourriture et à l'eau. Les souris seront maintenues en groupes de 3 à 6 animaux par cage. L'environnement est enrichi par des dômes en carton ou du coton. Le nombre d'animaux nécessaires pour l'expérimentation sur 5 ans, prenant en compte 11 lignées différentes décrites dans l'annexe1, s'élève 2250 animaux soit l'équivalent de 450 souris par an.

4307. Thème de Recherche

Ce projet vise à l'évaluation préclinique d'un nouveau design de trocart permettant un abord intra gastrique par voie transpariétale dans le cadre de chirurgie hybride (endoscopique et laparoscopique).

L'insertion dans l'estomac d'un trocart laparoscopique standard permettant la réalisation de chirurgies hybride intra-gastrique est encore aujourd'hui un processus long et lourd. De plus les trocarts standards ne sont souvent pas hermétiques et peu stables. A l'heure actuelle, de nombreuses pathologies nécessitent une intervention intra gastrique tel que la dissection submucosale endoscopique (ESD) hybride, la pyloroplastie endoluminale, la fundoplicature endoluminale, le placement et la fixation d'un stent duodénal, l'exploration retro péritonéale trans-gastrique et la résection gastrique dite « full thickness ».

Le dispositif testé est un nouveau système de port intra gastrique, permettant la réalisation de procédures intra gastriques par laparoscopie hybride. Sa mise en place se fait selon la procédure endoscopique connue de pose de sonde gastrique (pull technique). La stabilité du système est permise grâce à un bulbe intra gastrique stabilisant la paroi gastrique au dispositif. Une fois le dispositif mis en place, le chirurgien déconnecte le cône d'introduction de la canule et un disque monté sur la canule stabilise cette dernière au niveau de l'abdomen. Le chirurgien connecte alors un système de valve permettant l'insufflation de l'estomac tout en assurant l'étanchéité du système tout au long de la procédure chirurgicale.

En fin d'intervention le chirurgien retire le dispositif par une simple traction qui va permettre le repli du bulbe intra gastrique qui va alors passer au travers de l'incision. L'incision est suturée selon les techniques chirurgicales connues.

Ce projet rempli les conditions des 3R :

Remplacement : Pour tester la sécurité et l'efficacité (temps de procédure, complications) du dispositif d'accès trans-gastrique par voie pariétale en phase préclinique, le recours à l'animal vivant est nécessaire. Le porc est un modèle de choix, par sa taille, permettant d'utiliser des dispositifs de chirurgie hybride conçus pour un usage chez l'homme.

Réduction : il s'agit d'une étude pilote et il n'y a pas de bases statistiques pour définir le nombre d'animaux. Le nombre de procédures chirurgicales réalisées sur chaque animal et le nombre d'animaux utilisés ont été optimisés pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés et obtenir des résultats significatifs. Dans le respect du principe de réduction, et sur la base de notre expérience dans le développement de nouvelles procédures, nous estimons que 40 animaux représentent un nombre nécessaire et suffisant.

Raffinement : le projet prévoit des procédures réalisées sous anesthésie générale conventionnelle avec contrôle de la douleur peropératoire. Le cas des études avec survie, (14 jours) n'inclut pas de gestes diagnostiques ou thérapeutiques et un suivi journalier des animaux sera assuré. Le sacrifice après évaluation de la qualité de la cicatrisation sera effectué sans réveil pour ne pas engendrer de souffrances animales.

Le projet prévoit des procédures mini-invasives engendrant des douleurs post-opératoires modérées. Toutefois, les animaux recevront un protocole de soins post-opératoires comprenant une évaluation clinique quotidienne, des antidouleurs et des anti-inflammatoires et un régime standardisé. Des critères d'arrêt anticipé de l'expérimentation en cas de survenue d'une complication ont été identifiés.

4308. L'Europe, à travers la Directive Cadre sur l'Eau, a établi une politique communautaire durable dans le domaine de l'eau dont l'objectif ultime est d'assurer l'élimination des substances dangereuses prioritaires et d'atteindre un bon état écologique des eaux. En Europe, des études ont mis en évidence un haut niveau de contamination des eaux par des substances chimiques et plus particulièrement par des perturbateurs endocriniens : substances susceptibles d'interférer avec le fonctionnement normal du système endocrinien des organismes vivants et de générer des effets sur plusieurs générations. En France, des plans gouvernementaux ont été initiés pour préserver les milieux aquatiques et réduire les pollutions des eaux par les pesticides, les médicaments et les perturbateurs endocriniens. D'un point de vue de santé publique, il est également nécessaire de pouvoir identifier si des molécules présentes un effet de perturbation endocrinienne dans des biens de grande consommation (cosmétiques, emballages, nourriture..)

L'identification d'un effet perturbateur endocrinien dans un échantillon d'eau ou d'une substance chimique pure nécessite de réaliser des tests *in vivo*. Ces molécules peuvent en effet agir à toutes les étapes d'un axe hormonal : elles peuvent perturber la synthèse de l'hormone, son transport dans le sang, son action aux niveaux des tissus et son élimination par l'organisme. Aucun test ou combinaison de tests *in vitro* ne sont actuellement capables de récapituler ou de modéliser ces différentes étapes cibles potentielles de l'action des perturbateurs endocriniens.

Les tests qui sont classiquement mis en œuvre pour détecter les perturbateurs endocriniens utilisent principalement des rongeurs. Ces tests utilisent un grand nombre d'animaux et font appel à des procédures invasives comme la castration ou l'ovariectomie des animaux avant de les exposer plusieurs semaines à l'échantillon à tester. Un petit nombre de tests offrant une alternative aux tests sur les rongeurs ont été développés sur des poissons adultes ou des têtards d'amphibien en cours de métamorphose. Il s'agit par exemple des lignes directrices OCDE 229, 230 et 231 qui consistent à exposer à un produit chimique des poissons ou des têtards sur une longue période allant de 21 jours à plusieurs mois et de suivre respectivement la différenciation sexuelle des poissons et la métamorphose des têtards. Ces protocoles nécessitent également l'utilisation d'un grand nombre d'animaux sur une durée de plusieurs semaines.

WatchFrog propose des tests basés sur les modèles animaux et les critères physiologiques utilisés dans les tests OCDE : la métamorphose de l'amphibien *Xenopus laevis* et la production des œufs du poisson *Oryzias latipes*. Ces modèles sont utilisés à des stades embryonnaires, les durées des tests n'excèdent pas 72h et un petit nombre d'embryon est utilisé pour chaque test.

Les deux organismes aquatiques modèles choisis présentent une physiologie, et en particulier un système endocrinien, similaire à celui de l'homme. Les tests proposés évaluent la capacité d'un échantillon à activer ou réprimer les voies hormonales. Il s'agit d'une mesure réalisée en quantifiant l'expression d'une protéine fluorescente exprimée par l'animal sous le contrôle spécifique des hormones endocriniennes. La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de perturbateurs endocriniens : plus l'embryon est fluorescent, plus l'échantillon est perturbateur. Cette détection *in vivo* par fluorescence permettent d'obtenir des résultats pour des échantillons d'eaux très variés et également pour des matières premières ou substances chimiques pures.

Les espèces choisies présentent l'avantage de produire un nombre important d'embryons pour peu d'animaux d'élevage maintenus et satisfont la règle des 3R du règlement REACH et au décret n°2013-118 sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, dans le cadre de méthodes alternatives. Nous disposons de 1080 xénopes et 1250 médaka reproducteurs qui nous permettent dans les cinq prochaines années : d'assurer le test de 800 échantillons par an à Evry, de fournir des embryons à des laboratoires partenaires pour tester l'équivalent de 800 échantillons, de fournir des adultes dans le cadre d'essais multi laboratoires pour l'OCDE ou de collaborations scientifiques. Ces animaux sont également utilisés pour notre recherche et développement afin de développer de nouveaux tests ou de raffiner les tests existants.

La réglementation européenne distingue les stades embryonnaires des vertébrés aquatiques de la définition d'animaux de laboratoire au sens utilisé officiellement par les réglementations encadrant l'expérimentation animale. Nos tests sont effectués sur de jeunes stades de développement, ce sont des embryons non autonomes qui répondent au besoin de remplacement du décret n°2013-118.

Les animaux répondants à la définition d'animaux de laboratoire que nous utiliserons dans ce projet seront des adultes reproducteurs qui seront exclusivement utilisés pour produire des embryons. Ces animaux ne seront soumis qu'à des procédures de sévérité légère : injection d'hormones (pour les xénopes uniquement), récolte des œufs et des embryons. Ces reproducteurs ne sont sacrifiés que lorsqu'ils ne sont plus capables de se reproduire : après un an et demi pour les poissons et après 10 à 15 ans pour les xénopes.

4309. Le surpoids et l'obésité se définissent comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé (définition de l'organisation mondiale de la santé). En 2014, plus de 1,9 milliard d'adultes étaient en surpoids. Sur ce total, plus de 600 millions étaient obèses. L'obésité est un facteur de risque pour de nombreuses pathologies, dont les maladies cardiovasculaires, le diabète et certains cancers. Face à ce problème majeur de santé publique, plusieurs approches sont utilisées, dont l'utilisation de compléments alimentaires permettant de limiter la prise de poids et/ou les désordres métaboliques associés à l'obésité (notamment l'insulino-résistance).

Dans ce projet nous chercherons à mettre en évidence l'effet d'un extrait végétal (de composition confidentielle) sur l'obésité et les désordres physiopathologiques qui lui sont associés, dans le but ultime de développer un complément alimentaire chez l'homme. Cet extrait végétal a été choisi suite à une première étape de sélection utilisant des tests *in vitro*.

Nous étudierons l'effet biologique de l'extrait en utilisant deux approches complémentaires :

- soit lors du développement de l'obésité induit par l'alimentation (effet préventif) : dans ce cas les souris seront nourries pendant 12 semaines avec un régime riche en lipides (HF45, 45% de l'énergie apportée) supplémenté ou non avec une dose faible ou plus élevée de l'extrait (3 groupes expérimentaux).

- soit lorsque que le phénotype obèse a déjà été induit (effet curatif) :

des souris mâles de souche C57Bl6j seront rendues obèses par la consommation d'un régime riche en lipides (HF45, 45% de l'énergie apportée) pendant 6 semaines puis seront suivies pendant 6 semaines supplémentaires et consommeront le régime HF supplémenté par l'extrait végétal à la dose la plus élevée.

Un groupe recevant un régime à teneur normale en lipides (régime d'entretien AIN-93M) pendant toute la durée de l'étude (12 semaines) servira de groupe contrôle normopondéral.

L'intérêt d'étudier ces deux aspects en parallèle est d'utiliser des groupes contrôles identiques pour les deux aspects, et ainsi de réduire le nombre d'animaux.

Le nombre total d'animaux nécessaires sera de 60.

Afin de mettre en évidence le développement de l'obésité et de ses conséquences métaboliques, une combinaison de mesures sont prévues :

- pesée hebdomadaire et mesure de la consommation alimentaire ;
- prélèvements sanguins afin de mesurer l'évolution de la glycémie et de l'insuline plasmatique ;
- passages en cage calorimétrique pendant 24 heures afin de mesurer différents paramètres permettant d'affiner la caractérisation du phénotype obèse (consommation d'oxygène et expiration de dioxyde de carbone, prise alimentaire et hydrique) ;
- collection de fèces en début puis au cours du protocole pour caractériser le microbiote et mettre en évidence d'éventuelles modifications en fonction du régime ;
- mesure de la réponse glycémique à une charge orale en glucose (semaine 11) afin de mettre en évidence des anomalies du métabolisme glucidique.

A l'issue des 12 semaines de régime, les animaux seront sacrifiés sous anesthésie générale.

Cette étude prend en compte la règle des 3 R :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution in vitro pour étudier l'impact de compléments alimentaires sur le microbiote et la prévention de l'obésité. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observables chez l'homme.

Réduction : le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Raffinement : les méthodes utilisées sont en majorité non invasives et l'utilisation de cages calorimétriques permet de recueillir un grand nombre de données (enregistrement sur 24 heures) en utilisant un faible nombre d'individus (8 souris/groupe). L'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de nid végétal.

4310. Les troubles anxieux et les troubles liés au stress sont particulièrement fréquents dans les pays industrialisés. Ainsi, il est estimé 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. L'évaluation de l'efficacité de nouveaux composés pour traitement de l'anxiété nécessite d'observer le comportement animal dans des conditions adéquates.

Le test de la boîte clair-obscur est l'un des modèles d'évaluation de l'anxiété les plus utilisés chez la Souris. Il présente l'avantage majeur d'être sensible à de nombreux types de molécules utilisées en clinique humaine. Sa sensibilité aux molécules pharmacologiques telle que la buspirone en plus des anxiolytiques plus classiques comme les benzodiazépines, rend ce modèle très pertinent pour l'évaluation des effets anxiolytiques des molécules en cours de développement. 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).

Ce test est basé sur l'aversion naturelle des rongeurs pour la lumière.

Le dispositif expérimental est composé de 2 compartiments juxtaposés, le compartiment clair aux parois blanches qui est ouvert, et le compartiment sombre aux parois noires qui est fermé. Une ouverture dans la cloison centrale permet le passage de l'animal d'un compartiment à l'autre. Au cours du test l'animal peut explorer librement le dispositif pendant 5 minutes. Dans cette situation, le compartiment clair induit un état de stress plus important pour l'animal que le compartiment sombre, on dit qu'il est plus anxiogène. Le niveau d'anxiété sera évalué par la comparaison entre le temps passé dans chacun des compartiments, le nombre de transitions entre les compartiments ainsi que la distance parcourue. Ainsi par exemple plus un animal sera anxieux plus il passera de temps dans le compartiment sombre ; en revanche l'administration d'un traitement anxiolytique devrait permettre aux animaux de diminuer le temps passé dans le comportement sombre au profit du compartiment clair.

L'objectif de ce projet est double, 1) tester une nouvelle méthode de planification d'expérience connue pour identifier les conditions optimales d'une situation expérimentale; ainsi, alors que la méthode classique nécessiterait l'utilisation de 640 souris, la méthode de planification utilisée permet de réduire l'effectif à seulement 32 souris (réduction, raffinement) ; 2) définir les conditions optimales en fonction de la souche de souris, de l'intensité lumineuse (entre 200 et 400 lux), l'effet d'une mise à jeun avant le test (environ 12h) , l'impact des expérimentateurs et de l'efficacité de molécules pharmacologiques de référence (diazépam et buspirone) qui seront administrées par voie orale une heure avant le test par du personnel qualifié (raffinement).

Pour ce projet nous utiliserons donc 40 souris mâles de 2 souches différentes, C57BL/6J et CD-1 IGS. Une première étape nécessitera l'utilisation de 8 souris, 4 de chaque souche, pour la validation du dispositif de vidéo tracking utilisé (procédure 1). Les

32 autres souris du projet seront traitées par voie orale avec un placebo pendant les 3 jours précédents le test pour les habituer au gavage et le jour du test avec le placebo ou les composés pharmacologiques de référence 1 heure avant leur passage dans la boîte clair-obscur (procédure 2). Certaines souris seront mises à jeun pour évaluer l'impact de celle-ci sur les résultats du test (procédure 3). Le test de la boîte clair-obscur sera effectué pendant 5 minutes pour chaque souris comme décrit précédemment (procédure 4). Les animaux seront hébergés à 2 par cage avec un enrichissement du milieu (feuille de papier absorbant). Des points limites concernant une perte de poids de 20% du poids maximum ou de 15% cumulés sur 3 jours consécutifs, une souffrance (cachexie, affaiblissement, hypothermie persistante), difficulté à bouger ou à manger, diarrhée pendant au moins 48h, seront suivis et toute atteinte de l'un de ces points limites entrainera la mise à mort des animaux en conformité avec les recommandations éthiques (Raffinement).

A la fin des expérimentations, les animaux seront mis à mort par injection d'une surdose d'anesthésique.

4311. L'objectif de ce projet consiste à opérer au maximum 10 vaches de réforme de troupeaux laitiers commerciaux pour poser une canule ruminale permettant ensuite de mesurer la valeur nutritionnelle des matières premières (céréales, coproduits, graines, tourteaux, huiles, ...) qui entrent dans la composition des aliments destinés aux ruminants. Pour ce faire, le recours à des vaches fistulées au niveau du rumen est nécessaire et permet d'obtenir les cinétiques de dégradation des aliments, le protocole expérimental standard nécessite que les échantillons à étudier soient introduits dans un certain nombre de petits sachets en tissu synthétique puis placés dans le rumen des vaches fistulées via la canule ruminale. Ces sachets sont ensuite retirés au bout de temps d'incubation échelonnés. Les travaux qui résultent de ces essais sont régulièrement publiés pour bénéficier l'ensemble de la filière alimentation des ruminants. Pour bien formuler les aliments, les nutritionnistes utilisent des tables d'alimentation qui caractérisent les matières premières (MP) utilisées. Cette matrice doit être mise à jour régulièrement car elle doit prendre en compte les variabilités annuelles (composition, origine) des MP et les nouveaux coproduits sur le marché (drêche de blé, drêche de maïs, valorisation en fourrage des CIPAN (couverts végétaux qui permettent d'éviter le lessivage des nitrates en hiver). Si ce travail n'est pas réalisé, la table d'alimentation et donc la formulation seront en décalage avec la réalité du terrain, l'aliment sera mal valorisé par l'animal : il faudra une quantité supérieure d'aliment pour couvrir ses besoins, les rejets via les fèces et les urines voire les éructations seront plus importants, augmentant ainsi l'impact environnemental des élevages. Une mauvaise valorisation de l'aliment peut également entraîner une diminution du bien-être animal (perte d'état pendant la période de production laitière, risque d'acétonémie et de stéatose, ...etc.). Cette caractérisation à partir d'analyses chimiques uniquement reste problématique et les techniques in vitro ne permettent pas une détermination précise de la digestibilité des différents nutriments. Ainsi, la mesure in vivo reste indispensable. Pour mener ces essais, le renouvellement du cheptel de vaches fistulées des stations expérimentales est nécessaire. Dans le respect des 3Rs : Remplacement et Réduction : Par rapport à la méthode de digestibilité sur montons, les essais réalisés sur vaches fistulées limitent le nombre d'animaux utilisés (réduction de 50% minimum) tout en permettant d'obtenir des résultats fiables sur un plus grand nombre de matières premières. Les techniques in vitro, en cours de développement ne permettent pas pour le moment de supprimer les essais sur animaux. Le renouvellement des vaches fistulées est rare les essais conduits sur ces animaux nécessitent peu d'individus (4 par essai en moyenne), les essais sont non invasifs. Un essai dure 1 semaine. Une vingtaine d'essais sont menés chaque année sur une dizaine de vaches. Ces vaches sont peu sollicitées car elles sont taries. D'ailleurs, leur durée de vie peut atteindre 20 ans comparativement à une vache laitière en production (5-6 ans). Raffinement : Lorsque les animaux sont en essai (de fin septembre à fin juin), les vaches sont élevées dans un bâtiment sur une aire matelassée. Cela permet d'assurer le confort des vaches sans utilisation de litière car elles en consommeraient, ce qui biaiserait les essais.

En été, pendant la période hors essai, les animaux sont mis à l'herbe. Le reste de l'année, elles sont nourries avec un régime composé de foin de luzerne, foin de Crau et d'un aliment composé.

4312. Le choc septique est un syndrome représentant le stade ultime de progression des infections sévères et résulte d'une réponse de l'hôte disproportionnée et dysrégulée. En effet, la mise en jeu du système immunitaire inné, fondamental dans la lutte anti-infectieuse, peut s'avérer excessive, avec notamment à la phase initiale, une synthèse accrue de médiateurs pro-inflammatoires, la génération d'un état pro-coagulant, le tout participant de la défaillance d'organes à distance du site primitif d'infection.

Malgré une physiopathologie de mieux en mieux connue, aucun traitement spécifique n'a à ce jour fait la preuve définitive de son efficacité : la prise en charge demeure largement symptomatique, ce qui explique la persistance d'une mortalité associée à ce syndrome inacceptable.

Plusieurs travaux précliniques concernant l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (CSM) au cours du sepsis ont clairement montré une amélioration de la survie, une diminution de la défaillance d'organes, une diminution de la bactériémie et une modulation de la réponse inflammatoire à l'agression.

Cependant, seules les CSM de moelle osseuse (MO) ou issues du tissu adipeux ont été étudiées. Or nous avons montré au sein du laboratoire une efficacité similaire des CSM issues de la gelée de Wharton (GW) du cordon ombilical à celles issues de la MO dans un modèle murin de péritonite. Ce projet vise à étudier les effets de cette source de CSM plus avantageuse que la MO au cours du choc septique chez le cochon.

En effet, si l'emploi de petits animaux, rongeurs en particulier, permet d'émettre des hypothèses pathophysiologiques, leur confirmation requiert l'emploi de modèles expérimentaux plus proches de la pathologie humaine : de par la grande similitude qui existe entre cochon et homme en terme notamment de système cardio-vasculaire, l'étude sur cet animal nous semble donc pertinente.

Après stabulation 1-2 semaines en groupe dans un box enrichi par des jouets adaptés (balles..), un choc septique sera induit en administrant par voie intrapéritonéale 1,5 g/ kg de selles autologues à 16 cochons anesthésiés par isoflurane et sufentanil. Les animaux seront randomisés pour recevoir les CSM ou une solution saline par voie intra veineuse.

La prise en charge est ensuite identique à celle d'un patient (maintien de la volémie, de la pression artérielle moyenne, d'un débit cardiaque adéquat) et sera assurée par un réanimateur expérimenté.

Des prélèvements biologiques (effectués via un cathéter artériel) seront analysés sur place et permettront de guider la prise en charge : gaz du sang, lactatémie, ionogramme, numération sanguine

Vingt-quatre heures après le choc, l'animal sera sacrifié par surdosage de barbituriques concentrés sous anesthésie profonde. Au cours de l'expérimentation, si la pression artérielle moyenne demeure inférieure à 50 mmHg durant plus de 30 minutes malgré un support vasopresseur maximal autorisé l'animal sera sacrifié de la même façon.

La douleur et l'angoisse éventuelles sont en permanence maîtrisées par l'anesthésie générale (isoflurane et sufentanil).

4313. La capacité à prédire la survenue des événements est capitale pour la survie des organismes. Cette capacité repose sur de multiples processus élémentaires qui sont largement conservés chez les mammifères, et notamment chez le Rat. Leur intégration dans les fonctions cognitives de haut niveau ne peut s'étudier qu'à l'échelle de l'organisme entier. Cette étude est un enjeu important à la croisée entre diverses disciplines. Ainsi, la neurobiologie a bénéficié ces dernières années de l'apport de théories de l'apprentissage issues des Sciences de l'Ingénieur. Récemment, une tâche d'apprentissage Pavlovien chez le Rat où la présentation d'un levier annonce une distribution de nourriture a fait l'objet d'un regain d'intérêt car elle met en évidence des différences interindividuelles au sein d'une population supposée homogène. Cette tâche révèle deux types de comportements possibles selon les individus, les « goal-trackers » (GT) qui vont anticiper l'arrivée de la nourriture et les « sign-trackers » (ST) qui vont interagir avec le levier alors même que ce dernier est entièrement dépourvu d'effet. Un travail de modélisation suggère que ces comportements sont sous-tendus par des processus computationnels différents. Certains animaux (GT) pourraient avoir une représentation détaillée des conséquences des événements, alors que d'autres (ST) se contenteraient de leur attribuer une valeur motivationnelle. Cette hypothèse peut être testée expérimentalement. En outre, il a été proposé que ces deux types de comportements dépendent de manière différente des signaux dopaminergiques phasiques fournissant un signal d'erreur de prédiction de récompense. Ce projet vise par conséquent d'une part à clarifier les principes computationnels sous-tendant les réponses ST et GT, en s'appuyant sur les prédictions développées par la modélisation, et d'autre part à comprendre leur dépendance vis-à-vis de la signalisation dopaminergique en modulant cette signalisation au niveau de circuits cérébraux précis. Pour ce faire, après validation des procédures comportementales, nous procéderons dans une première série d'expériences à des analyses comportementales modélisant des aspects spécifiques des processus de prédiction. Une seconde série d'expériences visera à manipuler sélectivement une sous-population neuronale dopaminergique sur la base de ses projections pour en évaluer l'effet sur les deux types de comportements. Nous utiliserons pour cela une souche de rats transgéniques (TH:Cre, phénotype non dommageable), qui expriment une enzyme particulière (la Cre-recombinase) sélectivement dans les neurones dopaminergiques. Ces rats recevront ensuite dans différentes régions du striatum un vecteur viral non infectieux et non toxique (CAV-2) capable de migrer de manière rétrograde le long d'un circuit neuronal, et codant pour un récepteur particulier (DREADD). Lorsque le vecteur viral parviendra à des neurones possédant la Cre-recombinase, le récepteur DREADD pourra s'exprimer. L'avantage des animaux transgéniques est donc de permettre de manipuler sélectivement la population des neurones dopaminergiques. De plus, l'approche proposée ne nécessite qu'une seule intervention intracérébrale. Ceci minimise le stress et l'inconfort des animaux et garantit des conditions optimales pour les expériences comportementales. Lors de deux phases de l'expérience (avant ou après l'entraînement), les animaux recevront une injection journalière (intrapéritonéale) d'un agent pharmacologique neutre (CNO) qui inhibe ou excite de manière réversible l'activité des neurones transfectés. Le projet nécessite enfin des vérifications histologiques, neurochimiques et électrophysiologiques de l'effet des injections sur des tranches de cerveau in vitro. S'agissant d'études comportementales impliquant des processus cérébraux de haut niveau, le recours à l'animal entier est indispensable et ne peut être remplacé. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et l'invasivité des procédures (démarche 3R), ce projet s'appuie sur une approche neurocomputationnelle et des procédures comportementales fortement standardisées. Le raffinement des procédures inclut l'emploi d'animaux transgéniques qui permettent de n'effectuer qu'une seule injection intracérébrale. De plus, la douleur éventuelle est prise en compte par des critères objectifs décrits dans les paragraphes 3.3.5 et 3.4.13 et l'observation des animaux. Pour la réalisation de ce projet d'une durée de 4 ans, le nombre total d'animaux nécessaires est évalué à 396 compte tenu des nécessités de puissance statistique et de la variabilité interindividuelle qui est au centre de l'étude. Les rats seront élevés au laboratoire en colonie hétérozygote à partir d'un petit nombre de progéniteurs génétiquement modifiés au phénotype non dommageable, croisés avec des rats normaux de souche Long Evans. Ils seront hébergés par groupes de 2 dans des cages standard en présence d'un tunnel en plastique au titre de l'enrichissement du milieu. Ils seront sacrifiés à l'issue des expériences pour faire l'objet de contrôles histologiques.

4314. Le projet a pour objectif de valider l'acte chirurgical, la taille ainsi que la rigidité d'un nouveau dispositif médical implanté dans l'espace extra-péritonéal à court et moyen terme chez le porc.

Le dispositif a déjà fait l'objet d'essais in vitro (biocompatibilité des matériaux, propriétés mécaniques sur banc d'essais ...), in vivo (chez le rat, le primate et le porc). Les précédentes études menées chez le porc ont permis d'évaluer la faisabilité de la technique opératoire visée en clinique. Néanmoins, celle-ci reste à valider. Les dernières implantations réalisées, après avoir réalisé un renforcement mécanique interne du dispositif, ont révélé de fortes collections liquidiennes sur le site d'implantation du dispositif. A l'heure actuelle il est impossible de connaître avec précision si ces collections liquidiennes découlent de l'acte

chirurgical, de la taille du dispositif ou de sa rigidité. Il est nécessaire aujourd'hui d'évaluer ces trois paramètres afin de collecter les informations précliniques nécessaires à une autorisation d'essai clinique.

Pour ce faire, l'implantation à court et moyen terme de produits de différentes tailles et rigidités doivent être réalisées afin d'évaluer leurs impacts sur les tissus avoisinants par l'intermédiaire de technique d'imagerie médicale utilisable en clinique telle que le CT scan ou la cœlioscopie qui permettent toutes deux de contrôler et vérifier la présence de collections liquidiennes et l'intégration globale du produit sur son site d'implantation. Des prélèvements anatomopathologiques compléteront cette approche par l'évaluation macroscopique et microscopique des tissus prélevés.

Le choix de l'espèce animale est donc justifié par la similitude du site d'implantation par rapport à l'Homme et la taille du dispositif qui ne pourrait être implanté sur un autre animal que le porc. Ce protocole prévoit l'implantation de 15 animaux répartis en 5 groupes de 3 animaux avec 3 implantations successives (à une semaine d'intervalle) et 2 implantations successives (espacées d'une semaine) indépendantes des 3 premières.

Ce projet remplit les conditions des 3R :

- Remplacement : Il n'y a pas de méthodes de remplacement. Les simulations virtuelles et études préliminaires ont été effectuées. Il n'existe pas de tests ou de bancs d'essai capables de reproduire à la fois les contraintes mécaniques subies par l'implant à son site d'implantation, et la réaction des tissus au matériau. Le recours à l'animal est donc nécessaire et constitue un impératif avant toute entrée en phase clinique

- Réduction : Il ne s'agit pas ici de réaliser des études statistiques mais d'évaluer l'impact de la taille et de la rigidité des produits implantés sur la réaction tissulaire et la collection liquidienne. L'utilisation de 3 animaux par groupe semble donc suffisante dans un premier temps.

- Raffinement : Il interviendra en premier lieu au niveau des conditions d'hébergement : les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur, ainsi que de cages enrichies par des jouets. De plus, la procédure suit la pratique chirurgicale humaine, avec les mêmes équipements et les mêmes conditions de stérilité. Enfin, nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de pré-anesthésie, d'anesthésie et de prise en charge post-opératoire. Les études précédentes, validées par le comité d'éthique, ont démontré la qualité de la prise en charge des animaux

4315. Suite à une infection ou une vaccination, notre système immunitaire monte une réponse impliquant différentes cellules et molécules qui combattent l'infection et nous protègent contre une future exposition.

Les lymphocytes B jouent un rôle central dans cette réponse en reconnaissant de façon spécifique les agents infectieux et en produisant des anticorps de forte affinité qui vont se fixer à ces agents infectieux et ainsi favoriser leur neutralisation et leur élimination.

Nous travaillons sur une molécule qui contrôle la réponse immune au niveau des lymphocytes B en favorisant la production d'anticorps. Nous avons obtenu un modèle murin génétiquement modifié pour cette molécule qui nous permet de l'éliminer uniquement dans les lymphocytes B.

Afin de comprendre comment cette molécule agit sur la qualité de la réponse immune et comment cela pourrait impacter l'efficacité de la vaccination nous allons étudier la réponse vaccinale dans ce modèle animal.

Les souris utilisées dans ce projet proviendront d'un élevage entretenu et maintenu localement. Au total ce projet nécessite l'utilisation de 480 animaux tous génotypes confondus.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, nous appliquerons la règle des 3R (Réduction, raffinement et remplacement). Tout d'abord, nous utiliserons des protocoles qui ont été discutés et élaborés afin d'utiliser un nombre optimal de souris, nécessaire et suffisant, pour des expérimentations statistiquement exploitables. De plus, seules les expériences indispensables à notre projet seront réalisées.

A chaque fois que cela sera nécessaire, nous veillerons au bien-être animal en élaborant des méthodes permettant de réduire, supprimer, soulager l'angoisse et la détresse subit par les animaux, par exemple, en enrichissant les cages avec des rouleaux en cartons. Un suivi journalier sera effectué pour chaque souris de chaque procédure, et des fiches de bien-être animal seront établies faisant état des points limites à surveiller.

4316. Suite à une infection ou une vaccination, notre système immunitaire monte une réponse cellulaire et humorale qui combat l'infection et nous protège contre une future exposition. Les lymphocytes B jouent un rôle central dans cette réponse en reconnaissant de façon spécifique les agents infectieux et en produisant des anticorps de forte affinité qui vont se fixer à ces agents infectieux et ainsi favoriser leur neutralisation et leur élimination. Les réponses immunes sont des processus complexes dépendants de nombreux types cellulaires et de l'organisation tridimensionnelle des organes lymphoïdes. Il est donc nécessaire d'avoir un organisme vivant entier pour cette étude afin de reproduire toutes les interactions in vivo entre les différents types cellulaires impliqués dans ces processus. Cette approche nous permettra de mieux comprendre les mécanismes de la réponse vaccinale afin de pouvoir l'améliorer chez les individus à risque (patients immunodéprimés ou atteints de cancer, population âgée, nourrissons) mais aussi de l'inhiber dans les patients atteints de maladie auto-immune. Nous travaillons sur une molécule qui contrôle la réponse immune au niveau des lymphocytes B. La leupaxine semble importante pour contrôler l'affinité avec laquelle les anticorps se fixent aux agents infectieux. Nous avons obtenu un modèle murin génétiquement modifié dans lequel la leupaxine n'est pas exprimée. Afin de comprendre comment la leupaxine agit sur la qualité de la réponse immune et comment cela pourrait impacter sur l'efficacité de la vaccination nous allons étudier la réponse vaccinale dans ce modèle animal. Pour ce projet, nous utiliserons des souris C57/BL6 knock-out homozygotes (Lpxn -/-) hétérozygotes (Lpxn +/-) ainsi leur contrôle sauvage (Lpxn +/+).

Nous utiliserons aussi des souris C57BL/6 CD45.1 pour des expériences de reconstitution de l'hématopoïèse. Les souris utilisées dans ce projet proviendront d'un élevage entretenu et maintenu localement. Au total ce projet nécessite l'utilisation de 627 animaux tous génotypes confondus. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, nous avons appliqué la règle des 3R (Réduction, raffinement et remplacement). Tout d'abord, nous utilisons des protocoles qui ont été discutés et élaborés afin d'utiliser un nombre optimal de souris, nécessaire et suffisant, pour des expérimentations statistiquement exploitables. De plus, seules les expériences indispensables à notre projet seront réalisées. A chaque fois que cela sera nécessaire, nous veillerons au bien-être animal en élaborant des méthodes permettant de réduire, supprimer, soulager l'angoisse et la détresse subit par les animaux, par exemple, en enrichissant les cages avec des rouleaux en cartons. Un suivi journalier sera effectué pour chaque souris de chaque procédure, et des fiches de bien-être animal seront établies faisant état des points limites à surveiller.

4317. Suite à une infection ou une vaccination, notre système immunitaire monte une réponse cellulaire et humorale qui combat l'infection et nous protège contre une future exposition. Les lymphocytes B jouent un rôle central dans cette réponse en reconnaissant de façon spécifique les agents infectieux et en produisant des anticorps de forte affinité qui vont se fixer à ces agents infectieux et ainsi favoriser leur neutralisation et leur élimination. Les réponses immunes sont des processus complexes dépendants de nombreux types cellulaires et de l'organisation tridimensionnelle des organes lymphoïdes. Il est donc nécessaire d'avoir un organisme vivant entier pour cette étude afin de reproduire toutes les interactions in vivo entre les différents types cellulaires impliqués dans ces processus. Cette approche nous permettra de mieux comprendre les mécanismes de la réponse vaccinale afin de pouvoir l'améliorer chez les individus à risque (patients immunodéprimés ou atteints de cancer, population âgée, nourrissons) mais aussi de l'inhiber dans les patients atteints de maladie auto-immune. Nous travaillons sur une molécule qui contrôle la réponse immune au niveau des lymphocytes B. La leupaxine semble importante pour contrôler l'affinité avec laquelle les anticorps se fixent aux agents infectieux. Nous avons obtenu un modèle murin génétiquement modifié dans lequel la leupaxine n'est pas exprimée. Afin de comprendre comment la leupaxine agit sur la qualité de la réponse immune et comment cela pourrait impacter sur l'efficacité de la vaccination nous allons étudier la réponse vaccinale dans ce modèle animal. Pour ce projet, nous utiliserons des souris C57/BL6 knock-out homozygotes (Lpxn -/-) hétérozygotes (Lpxn +/-) ainsi leur contrôle sauvage (Lpxn +/+). Nous utiliserons aussi des souris C57BL/6 CD45.1 pour des expériences de reconstitution de l'hématopoïèse. Les souris utilisées dans ce projet proviendront d'un élevage entretenu et maintenu localement. Au total ce projet nécessite l'utilisation de 627 animaux tous génotypes confondus. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, nous avons appliqué la règle des 3R (Réduction, raffinement et remplacement). Tout d'abord, nous utilisons des protocoles qui ont été discutés et élaborés afin d'utiliser un nombre optimal de souris, nécessaire et suffisant, pour des expérimentations statistiquement exploitables. De plus, seules les expériences indispensables à notre projet seront réalisées. A chaque fois que cela sera nécessaire, nous veillerons au bien-être animal en élaborant des méthodes permettant de réduire, supprimer, soulager l'angoisse et la détresse subit par les animaux, par exemple, en enrichissant les cages avec des rouleaux en cartons. Un suivi journalier sera effectué pour chaque souris de chaque procédure, et des fiches de bien-être animal seront établies faisant état des points limites à surveiller.

4318. Des carences nutritionnelles pendant la vie fœtale peuvent altérer le développement cérébral du fœtus. Ceci peut se traduire par des défauts au niveau des processus de différenciation neuronale, qui obéissent à une régulation spatio-temporelle stricte. Un défaut de développement cérébral pendant les périodes embryonnaire, fœtale et postnatale précoce peut avoir des conséquences à court, moyen ou long terme sur les capacités motrices, cognitives et métaboliques de l'individu. Le développement de l'hypothalamus en particulier peut influencer les capacités d'un individu à contrôler son métabolisme énergétique et sa prise alimentaire, ceci pouvant se traduire par une prise alimentaire excessive ou incontrôlée. L'hypothalamus est une petite structure située au cœur du cerveau qui joue un rôle majeur dans le lien entre le système nerveux et le système endocrinien. Il intervient dans de nombreuses fonctions dont en particulier la régulation de l'équilibre énergétique et de la prise alimentaire. L'hypothalamus agit comme un centre capteur et intégrateur du corps. Il reçoit des informations hormonales, humorales ou nerveuses issues d'organes périphériques ou d'autres structures nerveuses et y répond par la sécrétion de neuro-transmetteurs et de neuro-hormones hypothalamiques. La régulation de l'appétit en particulier résulte de l'intégration au niveau de l'hypothalamus de différents types de signaux, en particulier ceux indiquant les besoins énergétiques et la quantité de masse grasseuse du corps. Ces signaux vont entraîner une réponse hypothalamique se traduisant par une stimulation ou au contraire une inhibition de la sensation de faim ayant pour rôle d'adapter la prise alimentaire aux besoins de l'organisme. L'hypothalamus se forme pendant le développement embryonnaire et fœtal et, chez les rongeurs, la mise en place des projections et connexions neuronales se poursuit au cours des 2 premières semaines de vie. L'environnement nutritionnel pendant ces périodes peut avoir une influence importante sur le développement de l'hypothalamus en agissant sur le nombre et les caractéristiques des cellules qui vont former les différentes populations cellulaires mais également sur la migration de ces cellules au cours du développement de la structure et sur les projections qu'elles vont initier entre les différentes zones de l'hypothalamus. Ce projet a pour but d'identifier d'éventuels défauts de mise en place des structures hypothalamiques en réponse à une restriction protéique maternelle et de comprendre les mécanismes moléculaires. Pour cela, nous émettons l'hypothèse que le destin cellulaire des cellules souches neurales (NSCs) qui sont à l'origine des différentes populations cellulaires constituant l'hypothalamus est influencé de façon précoce par l'environnement nutritionnel, en particulier au niveau épigénétique. Méthodologie : Nous utiliserons des femelles Sprague Dawley vierges qui seront, à l'issue d'une période d'acclimatation, mises en présence d'un male pendant la nuit. La saillie sera confirmée le lendemain par un frottis vaginal et les rates recevront à partir du premier jour de gestation (G0) soit un régime contrôle contenant 20% de protéines, soit un régime restreint en protéines (8%). Les femelles gestantes seront sacrifiées au 17ème jour de gestation (G17) et l'hypothalamus de l'ensemble des fœtus sera prélevé pour différentes applications (culture de cellules souches

neurales, immunohistochimie, extraction ADN et ARN). Pour chaque fœtus, un autre tissu (tissu cérébral ou foie ou sang) sera prélevé afin de faire un sexage ultérieur par test génétique. Ces différents prélèvements seront utilisés pour (1) quantifier et caractériser les différentes populations cellulaires et leurs capacités de prolifération et de différenciation en culture in vitro (2) analyser l'expression de différents facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la différenciation neuronale, (3) analyser les caractéristiques épigénétiques des cellules en culture et des hypothalamus directement prélevés sur les animaux. Application de la règle des 3R : Remplacement : La complexité des effets de l'environnement nutritionnel et la complexité des processus de développement neuronal ne peuvent être reproduits autrement que par l'utilisation d'un modèle animal. Le modèle de rat né avec un retard de croissance intra-utérin suite à une restriction protéique maternelle est couramment utilisé dans le monde et parfaitement caractérisé au niveau physiologique dans notre laboratoire. Réduction : Le nombre de femelles gestantes requis pour le projet a été évalué afin d'obtenir un nombre suffisant de fœtus de chaque sexe pour chacune des analyses (culture de cellules, immuno-histochimie, extraction ADN et ARN), l'objectif étant d'avoir un minimum de 1 individu de chaque sexe par portée pour chaque application, soit 4 mâles et 4 femelles. Cependant, comme le sexage des animaux ne pourra être fait qu'à posteriori, nous aurons obligatoirement des portées pour lesquelles cette condition ne sera pas remplie. Afin de garantir un nombre minimum de 8 portées « validées » pour chacun des 2 groupes expérimentaux, nous prévoyons un maximum de 15 portées par groupe, soit 30 rates gestantes. L'acquisition des animaux, les accouplements et les sacrifices étant échelonnés dans le temps, ce nombre pourra être réduit si le nombre de portées validées est atteint plus tôt. Deux mâles seront utilisés pendant toute la durée du protocole pour l'ensemble des accouplements. Raffinement : Les femelles seront hébergées en cages individuelles pendant la période d'acclimatation et la gestation et ne seront manipulées que pour une pesée 3 fois par semaine. Elles seront observées quotidiennement (consommation de nourriture, comportement défensif éventuel, signe de souffrance) et leur courbe de poids sera surveillée afin d'apprécier le bon déroulement de leur gestation. Les 2 mâles seront hébergés dans la même cage.

4319. Le mélanome est le sixième cancer le plus commun et également l'un des cancers cutanés les plus agressifs pour lequel il n'existe pas de traitement efficace à l'heure actuelle (source Cancer Research UK). Il existe donc un besoin important d'identifier de nouveaux agents thérapeutiques prolongeant la durée de survie et contrecarrant les résistances qui se mettent en place face aux traitements existants. Dans l'optique du développement de telles molécules, le modèle murin syngénique de mélanome B16 chez la souris C57Bl/6J constitue un excellent modèle pour étudier la biologie de la tumeur face à de nouveaux traitements, tout en présentant l'avantage de conserver un animal immunocompétent ; ce paramètre pouvant fortement influencer la progression tumorale. Un précédent projet de recherche a permis de valider le potentiel anti-tumoral in vivo d'un nouvel agent médicamenteux ciblant une interaction moléculaire impliquant une protéine jouant un rôle fondamental dans la progression du mélanome et dans la mise en place de résistances aux traitements actuels. La molécule en question a déjà fait état de fortes propriétés anti-angiogéniques (altérant la formation d'un réseau vasculaire fonctionnel) dans des modèles in vitro et ex vivo, ainsi que dans un modèle de greffe de mélanome murin in vivo. En ciblant cette protéine fortement exprimée au sein du microenvironnement tumoral, ce nouvel agent médicamenteux a pour effet de limiter la vascularisation associée à la tumeur. Afin de consolider ces résultats pré-cliniques dans l'optique d'une valorisation industrielle de ce nouveau produit thérapeutique, il est aujourd'hui indispensable de reproduire ces résultats dans un modèle de souris déficientes pour l'expression de la protéine en question, en présence ou en absence du peptide anti-tumoral, et ce dans le but de confirmer la spécificité d'action du peptide d'intérêt vis-à-vis de sa cible moléculaire. Après avoir validé l'effet anti-tumoral du peptide dans un modèle de tumeur sous-cutanée, en considérant l'inoculation de cellules de mélanome murin B16F1 chez la souris C57BL/6J, ce projet complémentaire vise donc à confirmer dans ce même modèle in vivo la spécificité d'action du médicament vis-à-vis de sa cible moléculaire. Pour ce faire, les expériences d'allogreffe seront reproduites dans des souris possédant le même fond génétique (C57BL/6J) mais n'exprimant pas la protéine ciblée (un nombre maximal de 20 souris par lot seront considérées, pour un total de 2 groupes correspondant chacun à des conditions expérimentales différentes, soit un nombre total maximal de 40 souris). Une étude préliminaire permettra de déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir un résultat statistiquement significatif. Cette étude inclura un nombre minimal de 5 souris par groupe (les souris de cette étude pilote étant incluses dans le nombre maximal d'animaux préalablement indiqué). Les propriétés anti-angiogéniques de la molécule d'intérêt ayant déjà été largement démontrées in vitro, ex vivo et in vivo, et l'intérêt thérapeutique de cibler l'interaction visée étant par ailleurs particulièrement bien décrit dans la littérature, ces expérimentations complémentaires constituent un prérequis indispensable afin de consolider la preuve de concept de la spécificité d'action moléculaire du médicament avant d'envisager son utilisation dans le cadre d'essais cliniques. Afin de limiter le nombre d'animaux, le développement tumoral ainsi que la vascularisation associée à la tumeur seront suivis de manière longitudinale par micro-tomographie à rayons X, afin de quantifier l'évolution du volume tumoral et/ou de la longueur et du volume moyens des vaisseaux sanguins alimentant la tumeur. De même, la présence d'éventuels signes de thrombose, d'embolie ou d'hémorragie consécutives à l'utilisation d'un tel agent anti-angiogénique sera évaluée par cette même méthode d'imagerie. Par ailleurs, un suivi quotidien des animaux sera assuré afin de limiter toute souffrance. Ainsi, toute modification du comportement (isolement, anxiété, ataxie) sera une indication pour l'euthanasie des animaux. Il en est de même pour toute perte importante de masse corporelle (15% de la masse des animaux), en cas d'ulcération de la tumeur qui se produit parfois consécutivement à une nécrose importante sous l'effet d'un agent anti-angiogénique, ou lorsque la tumeur atteint un volume critique de 1 cm³.

4320. Le mycosis fongoïde (MF) et le syndrome de Sézary (SS) sont les deux principaux sous-types de Lymphome T Cutané Epidermotrope (LTCE). Le taux d'incidence annuelle est de 1/100000. Le MF correspond à un infiltrat dermique monoclonal de lymphocytes T CD4+. La maladie débute par une atteinte exclusivement cutanée, sous forme de plaques non infiltrées, qui évoluent vers des plaques infiltrées, des lésions tumorales et enfin vers une érythrodermie. Elle peut prendre une forme

leucémique appelée syndrome de Sézary. Dans les stades avancés, le pronostic est mauvais : la survie à 5 ans est de 20%. La prise en charge thérapeutique n'est pas standardisée et les traitements actuels ne permettent qu'une rémission de courte durée. Récemment, le brentuximab-vedotin (BV), un anticorps monoclonal anti-CD30 conjugué à une drogue (la monométhylque auristatine E, MMAE) a montré une efficacité dans le traitement des MF réfractaires, mais l'expression de CD30 à la surface des cellules tumorales est variable. Le BV ne montre qu'une efficacité, transitoire, chez 70% des patients. Les LTCE représentent donc un défi thérapeutique. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons mis en évidence sur une lignée de LTCE, MyLa, une expression forte d'un récepteur de co-stimulation, Inducible T-cell COStimulator (ICOS). Une étude récente a montré une expression importante d'ICOS à la surface de cellules de LTCE sur des biopsies cutanées de patients. Par ailleurs, un essai clinique de phase I évaluant un anticorps anti-ICOS bloquant dans les lymphopathies T malignes est en cours. Comparativement au BV, nous avons couplé un anticorps anti-ICOS (ICOS 314.8) à la MMAE. Nous avons alors développé, conformément aux objectifs de remplacement et de réduction, de nombreuses étapes de validation in vitro de l'efficacité de cet anticorps en comparaison du BV et d'un anticorps irrelevant à inhiber de façon sélective la croissance de LTCE. Ainsi par exemple, in vitro, le pourcentage de toxicité des cellules MyLa en présence de cet antibody drug-conjugate (ADC) anti-ICOS est d'environ 80%, contre 50% avec le brentuximab pour une même concentration de traitement confirmant son intérêt thérapeutique. Toutefois l'obtention des données sur l'efficacité anti-tumorale in vivo de cet ADC anti-ICOS est essentielle au futur développement de cette stratégie thérapeutique innovante. Pour cela, nous utiliserons la méthode des 3 R afin de réduire à son minimum le nombre d'animaux et, chaque fois que cela sera possible, le modèle in vivo sera remplacé par des modèles in vitro. Dans ce contexte, la lignée humaine MyLa, exprimant ICOS et CD30, sera transplantée chez des souris immunodéficientes. Dans un souci de raffinement, cette phase de greffe sera réalisée sous anesthésie gazeuse (Vetflurane 3%). Après apparition des tumeurs, les souris seront alors réparties aléatoirement dans les différents groupes de traitements. Le volume tumoral sera alors mesuré au pied à coulisse pour évaluer la capacité des anticorps à inhiber la croissance tumorale de ce sous-type de cancer. Les résultats seront confirmés dans une seconde expérience ce qui implique que ce projet fera appel à 80 souris au total. Durant l'ensemble de ces procédures, afin de réduire le stress et d'améliorer le cadre de vie des animaux, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux, par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton), et par le maintien des animaux en groupes de 4 à 6 afin d'éviter le stress de l'isolement. Le projet s'inscrit donc dans la recherche de nouvelles formes thérapeutiques. En effet, le développement de stratégies ciblées en cancérologie est devenu une option incontournable pour faire avancer la recherche médicale et améliorer les traitements des patients. L'objectif de ce projet est de développer une thérapie plus efficace pour les patients. Le résultat attendu serait donc la validation in vivo de l'efficacité d'un anticorps couplé à une toxine dans le traitement des LTCE exprimant ICOS.

4321. La propagation des bactéries multirésistantes et l'absence de nouveaux antibiotiques font courir un risque d'impasse thérapeutique de plus en plus fréquent. Pour faire face à cette situation, l'idée n'est pas de trouver une solution permettant d'éviter l'apparition de résistances, car les bactéries trouveront toujours un moyen de s'adapter. Il convient plutôt de préserver le plus longtemps possible l'efficacité des antibiotiques disponibles ou d'utiliser une molécule permettant d'améliorer leur efficacité. *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* sont des bactéries de la flore commensale pouvant être responsable d'infections nosocomiales et d'infections communautaires. Ces infections sont en générales traitées par bêta-lactamines. Mais ces bactéries ont particulièrement tendance à développer des mécanismes de résistances aux antibiotiques d'où la nécessité de trouver de nouvelles options thérapeutiques. Le but de notre projet est d'étudier in vivo l'association du cinéole, un booster potentiel d'antibiotique, avec un antibiotique de la famille des bêta-lactamines, l'amoxicilline. Dans un premier temps, nous étudierons la pharmacocinétique de cette association puis nous évaluerons son efficacité in vivo à travers plusieurs modèles expérimentaux tels les modèles murins d'infection de cuisse et de pneumopathie ou l'endocardite expérimentale chez le lapin. Pour l'ensemble de l'étude, le nombre total d'animaux sera de 2992 souris et 156 lapins. Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'évaluation et la comparaison de l'activité d'un antibiotique sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées in vitro (faible corrélation in vitro-in vivo). Le nombre de souris et de lapins a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude.

4322. Malgré les avancées dans le traitement des cancers, les patients porteurs de tumeurs cérébrales les plus agressives (glioblastomes) présentent un pronostic très sombre. L'échec des traitements radiothérapeutiques des pathologies cérébrales est principalement corrélé à la radiosensibilité des tissus cérébraux sains péri-lésionnels qui limite la dose de rayonnement déposable au niveau de la tumeur. Une nouvelle méthode de radiothérapie expérimentale, fractionnée spatialement permet d'augmenter la dose déposée au niveau de la tumeur en limitant les effets secondaires au niveau du tissu sain. Nous avons établi que ce type d'irradiation permet de ralentir la croissance de tumeurs cérébrales chez le rongeur tout en préservant les tissus cérébraux sains. Ceci permet d'envisager son utilisation en complément de l'arsenal thérapeutique déjà disponible. Nous proposons dans le présent projet d'optimiser chez le rongeur porteur de tumeur cérébrale, les paramètres de notre irradiation délivrée comme boost thérapeutique combinée à un traitement radiothérapeutique conventionnel afin de déterminer le schéma d'irradiation le plus efficace et le moins délétère pour les tissus sains. Dans le cadre de l'utilisation de ces animaux, nous avons évalué la possibilité de remplacer, réduire et raffiner nos expériences selon la règle des 3R. Remplacement : Le projet portant sur l'étude de la réponse d'organe entier et de tissus complexes (cérébraux et tumoraux), il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Réduction : Le nombre d'animaux utilisé a été évalué grâce des méthodes statistiques, ce qui nous a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Le nombre minimum d'animaux permettant de réaliser l'expérience

sans compromettre les objectifs du projet sera ainsi utilisé. Raffinement : L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Dans ces conditions le nombre maximal d'animaux nécessaire à l'intégralité de ce projet est de 350. Aucune procédure expérimentale n'exécède un niveau de sévérité de classe modérée, sauf la procédure de sacrifice des animaux (procédure n4) qui est de classe sévère.

4323. Le cortex préfrontal est une zone corticale fondamentale dans la gestion cérébrale de la communication sociale. Les grandes pathologies du système nerveux central (autisme, schizophrénie, dépression) sont associées à un dysfonctionnement du cortex préfrontal. L'autisme, ou désordre du spectre autistique, est un trouble neuropsychiatrique touchant jusqu'à 1% de la population, majoritairement des hommes. Il se caractérise par des troubles du comportement, déficit dans les interactions sociales et troubles de la communication. Nos travaux visent à identifier le rôle de certains gènes comme facteurs de risques dans ces pathologies. Nous avons établi notre projet de recherche en tenant compte de la règle des 3Rs. Ainsi, nous avons mis en place un protocole expérimental permettant de réduire au maximum le nombre de souris nécessaire. Notre objectif est d'évaluer le rôle de ces gènes à l'aide d'études réalisées soit sur des tranches de cerveaux soit par des tests comportementaux. Ainsi, nous avons estimé qu'il nous faudra 1580 souris pour garantir la validité statistique de l'étude réalisée sur trois ans. Un modèle animal est utilisé car une étude sur le comportement sociale est nécessaire pour tester ces facteurs de risques. A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour cette étude selon la référence « the European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL-ECVAM). Dans un souci de raffinement, nous allons veiller au bien-être des animaux qui seront élevés en milieu enrichi. La douleur sera prévenue en utilisant des anesthésiques les plus appropriés. Les procédures expérimentales ont été conçues de sorte à supprimer toute souffrance psychique et/ou physique des souris et un point limite a été défini pour les souris. Il comporte une évaluation de la perte de poids, de l'apparence physique et du comportement de l'animal.

4324. Plusieurs médicaments et produits de diagnostic font appel, dans leur composition à des anticorps. Ils sont utilisés dans la thérapeutique contre le rejet des greffes d'organes en médecine humaine, pour certaines préparations homéopathiques, ou plus rarement, pour le diagnostic de maladies humaines et animales. Même si des méthodes in vitro permettent la production industrielle d'anticorps dits "monoclonaux", il n'existe pas de méthode suffisamment efficace et fiable pour la production d'anticorps dits "polyclonaux", qui sont ceux que nous souhaitons produire dans ce projet. Nous devons donc recourir à une production par immunisation d'animaux. Pour l'utilisation chez l'Homme de ces anticorps, les produits obtenus doivent être parfaitement stériles, et ne doivent pas provoquer de réactions allergiques lors de l'administration au patient. C'est la production d'anticorps avec des lapins qui remplit le mieux ces conditions. Notre projet vise un objectif scientifique de production d'anticorps de qualité pour des antigènes connus, mais aussi un objectif d'amélioration de nos méthodes de production, afin de réduire la souffrance induite par l'immunisation et le prélèvement sanguin de récolte des anticorps. La méthode est la suivante : les animaux reçoivent une injection de produit immunogène qui déclenchant la réponse immunitaire, avec ou sans adjuvant. Puis des prises de sang sont réalisées régulièrement lorsque le taux d'anticorps circulants chez le lapin est suffisant. Les animaux peuvent éprouver une gêne ou une irritation lors de l'immunisation et des affaiblissements lors des prises de sang. Le développement des méthodes de production tient compte de ces dommages et, au fur et à mesure de nos progrès, nous faisons en sorte de réduire ces dommages en choisissant des adjuvants peu irritants, voire en supprimant ces adjuvants et nous essayons de limiter les volumes de sang prélevés. En revanche, la procédure a été vue également à obtenir la plus grande quantité de matière active par animal et donc de limiter le nombre de sujets utilisés. Il s'agit donc d'un travail sur plusieurs années, pour optimiser notre méthode et faire une balance équilibrée entre la réduction du nombre d'animaux utilisés pour cette production et le raffinement de nos méthodes pour atténuer les dommages. Lorsque le produit est déjà commercialisé, l'Autorisation de Mise sur le Marché définit le protocole de production et comme tout dossier réglementaire lié à l'agrément d'un médicament, elle fige les modalités d'obtention de la matière active. Cependant, au terme du projet, nous comptons mettre en application toutes les méthodes de raffinement qui pourront être acceptées par les autorités de santé. Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet sera fonction de la quantité de produits dont nous aurons besoins : anticorps utilisés dans la prévention du rejet des greffes, sérum immunisé utilisés en homéopathie, anticorps utilisés en diagnostic. Si la demande est au maximum de nos prévisions, nous devrions utiliser 2000 lapins sur 5 ans. Au cours de ces procédures, nos lapins, issus d'élevages spécifiques et contrôlés, seront maintenus dans des conditions d'élevage sous barrière dans des conditions d'hygiène stricte, dans des cages comportant des abris, un fond plein qui ne blessent pas les pattes. On leur fournit une nourriture adaptée avec, en complément du foin et des objets à grignoter. Pour les projets standards, figés dans la pharmacopée la prévention de la souffrance consiste à examiner les animaux pendant les prélèvements et les arrêter si l'animal montre un signe de faiblesse. Pour les protocoles des mesures médicales pourront être prises pour atténuer les effets des protocoles, sur prescription de vétérinaires spécialisés.

4325. Les eaux marines côtières sont soumises à deux sources de variabilité physico-chimique, l'une naturelle (ex : saisonnière, tidale, météorologique...) l'autre résultant des activités anthropiques (ex : eutrophisation, contamination, changements climatiques...). Ces sources de variabilité combinent leurs effets et affectent, de manière plus ou moins prévisible, les caractéristiques abiotiques (ex : salinité, température, oxygénation) mais également biotiques (ex : prédateurs proies) de l'habitat des organismes marins. Face à cette variabilité environnementale, les poissons disposent de capacités d'ajustement importantes, tant physiologique, que morphologique, que comportementale, préservant ainsi leur capacité à exploiter les ressources présentes dans leur environnement. L'analyse de la littérature montre que les auteurs ont considérés la relation poisson-milieu essentiellement sous l'angle de la physiologie, laissant de côté les aspects morphologiques et comportementaux. L'objectif du

présent travail vise à améliorer notre compréhension de la relation poisson-milieu en développant le volet comportemental. Quelques soient les traits étudiés, qu'ils soient physiologiques, morphologiques ou comportementaux, on note généralement une forte variabilité inter-individuelle au sein des populations de poissons. Cette diversité phénotypique est une des composantes de la résilience des populations à la variabilité environnementale. En effet, face à une même perturbation, un groupe d'individus est ainsi susceptible d'exprimer une large palette d'ajustements comportementaux, favorisant ainsi l'émergence d'une réponse adaptée garantissant la pérennité de la population. A titre d'exemple, des animaux téméraires vont plus profiter des opportunités (e.g. ressource alimentaire, abri, habitat) présentes dans leur environnement mais seront également plus sujet à la prédation. En revanche, les animaux moins téméraires profiteront moins de opportunités pouvant s'offrir mais seront également moins soumis à la prédation. Les activités anthropiques sont à l'origine de nombreuses perturbations environnementales. Parmi celles-ci les rejets accidentels d'hydrocarbures ont des impacts qui restent mal évalués tant sur le plan économique qu'écologique. Chaque année plus d'un milliard de litres d'hydrocarbures sont rejetés dans les océans, majoritairement en relation avec la production de pétrole, son transport et son utilisation. De nombreuses études ont examinés les effets des hydrocarbures sur la physiologie des poissons. En revanche, très peu d'études ont examiné leurs effets sur les performances comportementales. Les quelques études disponibles suggèrent pourtant qu'une exposition à des hydrocarbures est susceptible d'altérer la capacité des animaux à percevoir les stimuli environnementaux affectant ainsi l'étendue de leur registre comportemental (ex : distribution, migration, relation prédateur/proie). Parmi les comportements écologiquement important, des études ont montrées que le comportement social (sociabilité) présente une forte variabilité interindividuelle et semble être le trait de caractère le plus sensible aux variations environnementales ou à l'état physiologique (ex : jeûne). La sociabilité est particulièrement pertinente chez notre modèle biologique (*Dicentrarchus labrax*), les juvéniles de cette espèce vivant en groupe. En cas d'une marée noire, une des stratégies de réponse est l'utilisation de dispersants chimiques pour le traitement de la zone touchée. Mais les répercussions d'un tel traitement ne sont pas encore bien évaluées, cela pourrait notamment augmenter la biodisponibilité du pétrole. Aussi leur utilisation reste controversée. Dans ce contexte, l'étude dans laquelle s'inscrit la présente demande d'autorisation de projet a pour objectif d'évaluer l'impact de trois situations rencontrées suite à une marée noire (exposition à du pétrole ; du pétrole + dispersant ou du dispersant) sur trois réponses comportementales : la témérité dans un nouvel environnement ; la réponse à une stimulation sociale positive et la réponse à une stimulation sociale négative. Le modèle choisi dans cette étude est le bar européen (*Dicentrarchus labrax*), une espèce importante tant en termes écologique qu'économique. Cette étude, qui a déjà fait l'objet d'une demande d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques (APAFIS #7783) comprend deux étapes se déroulant dans deux établissements utilisateurs distincts. La première étape qui est l'objet de la présente demande d'autorisation de projet, consiste à exposer les poissons aux trois traitements expérimentaux : pétrole, pétrole + du dispersant ou dispersant, dans un établissement possédant des installations expérimentales appropriées. La seconde étape est réalisée après transfert des animaux dans le second établissement utilisateur (porteur du projet) et elle porte sur le suivi temporel des réponses comportementales des individus sur une période de deux mois suivant l'exposition aux différents traitements. Le projet faisant l'objet de la présente demande s'inscrit dans une étude dont le but est l'analyse de l'expression des traits de caractères, ce qui implique l'utilisation d'animaux vivants (Remplacement). Le projet mobilisera 360 poissons, répartis en groupes de 60 individus. Les nombres de groupes et de poissons ont été déterminés par des calculs de puissance statistique reposant sur la mise en œuvre d'analyses de variance. Ces nombres sont optimisés afin de permettre 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).

4326. Les autorités de santé vétérinaires exigent la démonstration de l'activité, de l'inactivation et de l'identité des lots commerciaux de chaque vaccin via des contrôles qualité qui ont pour finalité l'autorisation de mise sur le marché (AMM). De ce fait, la sécurité des lots de vaccins peut être évaluée sur des modèles animaux. Objectifs : Le projet a pour objectif d'être en conformité avec les exigences réglementaires de la Pharmacopée Européenne et des pays tiers destinataires dans la constitution d'un dossier d'AMM. Les tests ont pour but de garantir l'activité, l'inactivation ou l'identité virale d'un vaccin destiné aux animaux de compagnie chien et chats. Les tests sont effectués soit sur espèce cible soit sur espèce alternative pour limiter le recours à l'espèce cible. Dommages/avantages : Les animaux peuvent présenter une légère augmentation de stress due aux injections, aux prélèvements sanguins et aux manipulations. Toutes les manipulations sont réalisées par du personnel formé et compétent. Les animaux témoins peuvent montrer des symptômes liés à la maladie virale. Ces symptômes sont relativement légers et disparaissent en moins de cinq jours. Ces tests permettent la libération d'un nombre important de doses de vaccins améliorant considérablement la santé et le confort des animaux de compagnie ainsi que des propriétaires. Informations sur les espèces utilisées : Pour libérer le nombre nécessaire de doses de vaccins sur le marché des animaux de compagnie nous utiliserons au maximum 40 chats, 250 cobayes, 500 hamsters, 4000 souris et 100 lapins sur 5 ans. Mise en œuvre des 3Rs : Remplacement : la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays tiers destinataires du vaccin demandent des tests sur animaux pour l'AMM. Il n'est actuellement pas possible de les remplacer sans un changement de la réglementation de tous les pays. Réduire : le nombre d'animaux est imposé par la réglementation. Une réduction du nombre d'animaux est possible grâce à la mutualisation de lots témoins chez les rongeurs. Raffinement : De légers symptômes sont attendus uniquement pour les animaux témoins. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort. De ce cas, des points limites liés à l'espèce sont mis en place. Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être. Tous les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements adaptés du milieu ont été mis en place dans les hébergements. La Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

4327. La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est la leucémie aiguë de l'adulte la plus commune. En Europe et aux Etats-Unis, l'incidence et le taux de mortalité de la LAM sont d'environ 4/100.000 et 3/100.000 par an, respectivement. En dépit d'un taux élevé de rémissions complètes après traitement avec les agents génotoxiques, le taux de rechute demeure très important. La survie globale à 5 ans est seulement de 30-40% chez les patients de moins de 60 ans, et de 20% pour les plus de 60 ans. La chimiothérapie de première ligne est souvent efficace pour éliminer les cellules leucémiques, mais des rechutes éloignées sont observées chez la majorité des patients, caractérisées par l'amplification de clones leucémiques chimiorésistants. L'ensemble de ces données justifie le besoin urgent d'augmenter le répertoire actuel de l'option thérapeutique. Dans ce contexte, notre plateforme propose à ses partenaires de réaliser des tests précliniques chez la souris afin d'évaluer l'efficacité de leurs différentes stratégies thérapeutiques innovantes les plus prometteuses *in vitro*. Pour cela, les modèles que nous souhaitons utiliser sont basés sur la transplantation de cellules leucémiques humaines à des souris immunodéficientes. En effet, la xénogreffe de leucémies primaires humaines constitue le modèle préclinique à même de « mimer » la maladie observée chez le patient et de prédire la réponse thérapeutique d'une leucémie donnée à un traitement précis. Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode satisfaisante qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale durant cette étape préclinique. Ces études seront réalisées de manière séquentielle pour déterminer l'action des candidats thérapeutiques sur le développement leucémique. Si nécessaire, des études pilotes seront menées sur un petit nombre d'animaux (maximum 12) afin de s'assurer de leur bonne tolérance à ces molécules et d'adapter les doses à administrer à notre souche de souris. Pour chacun des composés, nous nous limiterons au nombre minimum d'animaux permettant de caractériser leur efficacité sur au moins 2 modèles de xénogreffe LAM. Pour mener ces tests d'efficacité, au maximum 4 groupes de 8 animaux seront utilisés, incluant un groupe contrôle qui recevra le véhicule de solubilisation du composé et un groupe contrôle recevant la chimiothérapie de référence en clinique: la cytarabine. Lorsque possible, ces groupes contrôles seront communs à plusieurs tests d'efficacité. Nous utiliserons la méthode des 3 R pour réduire à son minimum le nombre d'animaux et, chaque fois que cela sera possible, le modèle *in vivo* sera remplacé par des modèles *in vitro*. Dans un souci de raffinement et de réduction, le suivi du développement leucémique se fera par des mesures cinétiques utilisant des procédés peu (prélèvement sanguin sous anesthésie) ou pas invasifs, à savoir les techniques de cytométrie de flux ou de l'imagerie par bioluminescence, respectivement. De même, l'ensemble des procédures de transplantation, de prise d'échantillons sanguins et d'imagerie sera réalisé sous anesthésie gazeuse (Vetflurane 3%). Afin de réduire le stress et d'améliorer le cadre de vie des animaux au cours des procédures nécessaires à la réalisation de nos objectifs, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux, par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton), et par le maintien des animaux en groupes de 4 à 6 afin d'éviter le stress de l'isolement. Nous avons estimé pouvoir gérer au maximum 4 études de ce type par an pendant 5 ans, le nombre maximal d'animaux utilisé au cours de cette période sera donc de 2220 souris.

4328. La tuberculose représente encore aujourd'hui une menace importante pour la santé dans de nombreux pays du monde, et ce, malgré l'existence d'un traitement antibiotique et d'un vaccin. En 2013, 8,6 millions de personnes ont développé une tuberculose et 1,3 million en sont mortes. Seules 10% des personnes infectées par *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), l'agent infectieux responsable de la tuberculose, sont incapables de contenir l'infection et développent une tuberculose active. Dans la majorité des cas, les bacilles seront confinés à l'état dormant au sein d'une structure multicellulaire appelé granulome. Si cet état de latence peut perdurer des dizaines d'années, une réactivation est possible à tout moment, notamment en cas d'immunodépression. L'apparition de souches résistantes aux antibiotiques et l'efficacité controversée du vaccin BCG à l'âge adulte justifient la recherche de nouveaux traitements. L'approche de notre laboratoire consiste à développer un produit thérapeutique qui cible les différentes phases de la tuberculose. Pour cela, plusieurs antigènes de Mtb ont été sélectionnés qui couvrent les différentes phases de la maladie : active, latente et de ressuscitation. Ils sont exprimés par un vecteur viral non propagatif, le MVA (Modified Vaccinia Ankara), sous forme de différentes protéines de fusion. L'immunogénicité de nos produits a été démontrée chez la souris, en injectant nos candidats et en mesurant l'interféron gamma (IFN γ) produit par les splénocytes en réponse aux antigènes. Ainsi, ce nouveau projet a pour but de documenter l'impact de la voie d'administration sur l'efficacité de notre produit en termes de réponses cellulaires et anti-mycobactérienne. Ceci nous permettra de sélectionner la voie d'administration optimale pour notre produit. Bien que le modèle murin ne reflète pas complètement la réponse cellulaire et granulomateuse observée chez l'Homme, il reste une bonne alternative. En effet il permet d'évaluer la capacité des produits d'immunothérapie à induire une réponse immunitaire efficace contre le bacille de la tuberculose. La réponse immunitaire induite par l'immunisation est multicellulaire et associe probablement différents organes selon la voie d'immunisation choisie. Cette complexité implique que les approches *in vitro* ne peuvent être envisagées pour cette étude. Le coût et le nombre d'animaux peuvent être réduits au minimum sans pour autant affecter la qualité des observations et de l'analyse statistique. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit au minimum sans compromettre les objectifs de ce dernier. La quantité des données accumulées au cours de ce projet sera suffisante pour répondre aux questions posées. Les données obtenues sur chaque animal seront utilisées de manière optimale afin de limiter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées, telles que l'administration d'anesthésiques, seront appliquées pour respecter le bien-être de l'animal et limiter au maximum sa souffrance. Ce projet inclura un maximum de 3240 animaux.

4329. La tuberculose (TB) reste la maladie due à un agent infectieux unique la plus meurtrière avec encore plus d'un million de décès recensés dans le monde chaque année. L'infection se fait par inhalation de l'agent étiologique de la maladie, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Parmi les axes principaux de recherche dans cette pathologie figurent la recherche de cibles thérapeutiques (sur l'hôte ou la mycobactérie elle-même) ainsi que la recherche d'un vaccin plus efficace que le vaccin actuel, le BCG. Notre

équipe contribue à ces deux axes de recherche en tentant de comprendre les mécanismes de l'interaction hôte-pathogène dans cette pathologie. Réemment nous avons inclus le microbiote comme troisième partenaire pouvant avoir un rôle au cours de l'infection par Mtb. En effet, l'utilisation de modèles animaux a permis de montrer un rôle protecteur et bénéfique des commensaux pour l'hôte suite à une infection par des pathogènes pulmonaires (*Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*) ou intestinaux (*Salmonella enterica*, *Citrobacter rodentium*). Le présent projet vise à caractériser l'interaction hôte-pathogène-microbiote dans le modèle murin de tuberculose afin de mettre en évidence la contribution du microbiote à la fois dans la colonisation des poumons par Mtb et dans le développement du système immunitaire de l'hôte en réponse au pathogène. Ainsi nous voulons utiliser le modèle murin C57BL/6 de dysbiose induit par traitement antibiotique pour caractériser la réponse de l'hôte, la colonisation des poumons par Mtb ainsi que les modifications du microbiote (pulmonaire et intestinal) dans ces conditions. Par ailleurs, des souches mutantes de Mtb dont nous avons démontré le caractère atténué dans des modèles cellulaires ou murins lors de projets précédents ou en cours, seront également testées dans ce modèle. De plus, l'utilisation de flores commensales contrôlées (c'est-à-dire la réinsertion d'une flore murine normale) suite au traitement antibiotique, permettra de démontrer l'effet du microbiote sur l'infection par Mtb. Enfin, d'autres pathogènes pulmonaires (*Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) seront utilisés comme contrôles afin de valider notre modèle murin de dysbiose. En effet il a été rapporté qu'une dysbiose résulte en une plus grande susceptibilité des souris à ces trois pathogènes. Dans l'ensemble de ces études, les animaux infectés sont utilisés pour déterminer des paramètres de sensibilité à l'infection (survie, charges bactériennes, histologie), des paramètres immunologiques (moléculaires et cellulaires) ainsi que des données de métagénomique (sur fèces, poumons, lavages broncho-alvéolaires (BAL)). Le nombre maximal d'animaux utilisé sera de 2607 souris C57BL/6. Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 4 étapes dans notre raisonnement. Tout d'abord les expériences proposées sont réalisées au stade où les méthodes de remplacement de l'expérimentation animale ne sont pas possibles. En effet la mise en évidence du rôle global et complexe du microbiote, ici dans le cas de la tuberculose ou d'autres pathologies pulmonaires, nécessite un organisme entier puisque le microbiote et l'hôte sont en symbiose. Ensuite, certaines étapes de nos projets (clairement identifiées dans les procédures détaillées) pourront en effet être suivies de décisions de poursuite ou d'arrêt de l'étude en fonction des promesses offertes par les résultats. De plus, nous avons développé des approches expérimentales permettant d'analyser sur un même lot d'animaux des paramètres qui étaient avant mesurés sur des lots d'animaux séparés (exemple : préparation d'ARNs, d'ADN et d'extraits protéiques, cytométrie de flux et charges bactériennes peuvent maintenant être réalisées sur le même échantillon). Finalement, l'expérience des années précédentes nous a fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir en première intention des résultats statistiquement significatifs. La souffrance et/ou le stress animal sont présents à deux niveaux dans nos expériences : i/ lors de l'inflammation pulmonaire induite par l'infection et ii/ lors des traitements administrés. Ces deux niveaux de douleurs font l'objet d'une prise en charge spécifique indiquée dans les procédures respectives et déjà appliquées dans nos projets antérieurs.

4330. Le trouble de stress post traumatique (TSPT) est un trouble fréquent qui se développe après l'exposition à un événement mettant la vie du sujet en danger. Le TSPT est caractérisé par des reviviscences pénibles du trauma comme des souvenirs intrusifs et des cauchemars, et ces symptômes peuvent perdurer des années après le trauma. Actuellement, aucun traitement pharmacologique n'est vraiment efficace. Toutefois, le propranolol, un antagoniste β -adrénergique, inhibe la reconsolidation de la mémoire aversive chez les animaux et suite à cette découverte, il a été démontré que 70% des patients TSPT traités avec le propranolol pendant la réactivation du souvenir traumatique présentaient une guérison totale contrairement aux patients non traités. Cependant, le mécanisme d'action du propranolol chez les patients TSPT est encore inconnu et de plus, nous ne savons pas pourquoi 30% des patients ne répondent pas positivement à ce traitement. Par conséquent, ce projet vise à mieux comprendre l'effet du propranolol sur la reconsolidation mnésique chez les souris afin d'améliorer le protocole thérapeutique utilisé chez les patients TSPT. Parmi les patients TSPT ne répondant pas au traitement, un certain nombre d'entre eux ont été exposés à des événements stressants durant l'enfance. Pour vérifier l'influence de ce stress peri-natal sur le traitement du TSPT, nous allons dans un premier temps, déterminer l'effet d'un stress précoce (postnatal et prénatal) sur la reconsolidation d'un souvenir traumatique chez la souris. Puis, nous allons étudier l'influence du stress précoce sur l'efficacité du traitement du TSPT par le propranolol, et sur la concentration de corticostérone plasmatique, une hormone qui semble lié à la fois au niveau de stress mais également à la mémorisation. Les performances mnésiques des animaux vont être mesurées dans le conditionnement de peur et dans un nouveau dispositif comportemental nommé « évitement à 4 secteurs » qui présente l'avantage de réaliser une réactivation contextuelle partielle dans un milieu familier.

Puis nous utiliserons ce nouveau paradigme comportemental chez la souris afin de déterminer si le niveau basal de noradrénaline (NA) peut également expliquer la non-réponse au traitement par le propranolol chez les patients TSPT. Dans un premier temps, nous mesurerons la variation de NA cérébrale au cours de la reconsolidation mnésique, et lors des reviviscences. Pour cela, nous utiliserons une approche neurochimique in vivo (microdialyse) pour déterminer les niveaux de NA extracellulaire dans l'amygdale, l'hippocampe et le cortex préfrontal, trois structures cérébrales impliquées dans le TSPT. De plus, nous chercherons à identifier les différents sous-types de récepteurs à la NA, ainsi que les différentes voies de signalisation intracellulaire qui sont spécifiquement impliqués lors d'un traitement au propranolol sur la reconsolidation d'une mémoire traumatique. Ce projet, avec ces différentes étapes, nécessite l'utilisation maximale de 715 souris. Le nombre d'animaux utilisés dans le projet est réduit à son minimum pour obtenir dans chaque groupe étudié un nombre d'individus suffisants pour réaliser les tests statistiques. Quand cela est possible, les différentes parties du projet sont regroupées pour réduire le nombre de groupes observés. Tous les animaux seront hébergés dans l'Etablissement Utilisateur et surveillés quotidiennement par les zootechniciens en accord avec la Structure du Bien Etre Animal et en lien avec les expérimentateurs. Les expériences de microdialyse nécessitent de réaliser une chirurgie sur certains animaux. Ils seront surveillés jusqu'au réveil puis quotidiennement à la recherche de signes d'infection ou de douleur. Les animaux présentant

de tels symptômes sont traités (anti-inflammatoires et/ou antibiotiques) puis euthanasiés si les symptômes persistent. En résumé, ce projet vise à mieux comprendre l'effet du propranolol lors de la reconsolidation de la mémoire traumatique et permettra ainsi d'améliorer le protocole de traitement du TSPT.

4331. Le régime alimentaire occidental, riche notamment en graisses et en sucres, induit chez l'homme un état inflammatoire qualifié d'"inflammation métabolique", et contribue à l'établissement de pathologies telles que le syndrome métabolique regroupant obésité, diabète type II et maladies cardiovasculaires. Ce mode d'alimentation est également soupçonné de favoriser la survenue de maladies auto-immunes et de maladies inflammatoires chroniques du tube digestif. Les mécanismes intervenant dans ces phénomènes ne sont pas complètement élucidés mais il est clair qu'ils mettent en jeu une perturbation de l'homéostasie immunitaire de l'individu, peut-être via la modification du microbiote intestinal. Il est connu que le régime alimentaire riche en graisses affecte les populations de cellules immunitaires au sein de la muqueuse intestinale et des tissus lymphoïdes associés (lamina propria, plaques de Peyer, ganglions mésentériques, follicules lymphoïdes), et en particulier des populations de lymphocytes T. Une réduction de la taille des ganglions mésentériques a été également observée chez les souris soumises à un tel régime, ce qui pourrait affecter les réponses immunitaires adaptatives de l'individu. En effet, les ganglions mésentériques sont un site privilégié de rencontre entre les lymphocytes T naïfs et les cellules présentatrices d'antigènes chargées de les activer. Ce projet a pour objectif d'explorer in vivo deux phénomènes pouvant contribuer à la réduction de taille des structures lymphoïdes secondaires associées à la muqueuse intestinale chez les souris soumises au régime riche en graisses et en sucre : (1) un défaut d'entrée des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires ou (2) un défaut de migration des cellules présentatrices d'antigènes depuis la muqueuse vers les organes lymphoïdes secondaires. Ces événements ne peuvent pas être étudiés in vitro. Des souris C57BL/6 seront nourries avec une nourriture conventionnelle (groupe CONV) versus un régime riche en graisses et en sucres (groupe HFHS) depuis leur sevrage et pendant 12 semaines. Dans un premier temps, un groupe de souris CONV et HFHS seront mises à mort pour des études post-mortem et pour préparer ex vivo des suspensions de lymphocytes. Ces suspensions cellulaires seront marquées et injectées en intraveineuse à des souris CONV et HFHS afin de déterminer après euthanasie la capacité des lymphocytes CONV ou HFHS à gagner les organes lymphoïdes secondaires, en contexte CONV ou HFHS. Enfin, des souris CONV et HFHS recevront un antigène fluorescent par gavage intra-gastrique afin d'étudier après euthanasie des animaux la prise en charge de cet antigène et son transport par les cellules présentatrices vers les organes lymphoïdes secondaires. Les procédures proposées (régime alimentaire gras et sucré, injection intra-veineuse et gavage intra-gastrique) induisent un niveau de stress et de douleur léger. Chaque expérience sera exploitée au maximum (étude parallèle de différents organes et prélèvements) afin de réduire le nombre d'animaux, estimé à 128 animaux au total.

4332. La migraine est une pathologie qui a un fort impact sur la santé publique (12-15% de la population touchée). Les traitements proposés ont une efficacité limitée, surtout au stade chronique de la maladie. Le développement et l'évaluation des effets antalgiques de nouvelles molécules est indispensable pour l'amélioration des thérapeutiques. Il a été montré récemment chez le rongeur que des protéines extraites à partir de venin de serpent (mambalgines) avaient un fort potentiel antalgique (supérieur à la morphine et sans ses effets secondaires) en bloquant certains canaux senseurs de pH (canaux ASIC). L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets, chez le rat male, en tant que traitement de fond, d'un bloqueur de ces canaux dans un modèle de migraine chronique induite par injections intrapéritonéales (i.p) répétées d'isosorbide dinitrate (ISDN). Ces effets seront comparés à ceux observés lors de l'application d'un traitement de fond (reconnu chez l'homme) de la migraine via le blocage par le propranolol des récepteurs bêta adrénérgiques (effets à caractériser dans notre modèle). L'isosorbide dinitrate (ISDN) est connu comme un donneur de monoxyde d'azote vasodilatateur et qui déclenche chez l'homme des crises de migraines. Une des signatures comportementales du passage au stade chronique de la migraine est l'hypersensibilité (à la douleur) mécanique cutanée appelée allodynie qui représente en plus de la douleur spontanée un symptôme très handicapant pour les malades. Nous proposons donc de tester les effets d'un bloqueur des canaux ASIC sur le seuil de déclenchement de la réponse motrice nociceptive à la stimulation mécanique (retrait de la face) de rats soumis à 5 injections répétées d'ISDN (1 par jour pendant 5 jours). Pour ce projet et afin de respecter la règle des 3R nous utiliserons un nombre limité de rats et de groupes tout en gardant significativité des résultats via une analyse statistique adaptée (analyse de variance suivi d'un test post-hoc paramétrique si distribution normale ou non paramétrique dans le cas contraire). Le nombre de rats par groupe a été fixé à 10 en tenant compte du fait qu'en moyenne, d'après les études précédentes, 20 % des rats ne sont pas répondeurs à l'ISDN. Connaissant par les études antérieures, l'effet allodymique de l'injection systémique d'ISDN comparée à celle de sérum physiologique, ce groupe témoin (sérum physio) ne sera pas répété dans ce projet (3R). Quatre groupes de rats seront utilisés. Ainsi chaque injection intrapéritonéale d'ISDN sera précédée 15 min avant d'une injection intraveineuse de sérum physiologique, ou du bloqueur ASIC, ou du propranolol ce qui constituera : 2 groupe témoins (un groupe avec injection IV sérum physiologique + injection IP ISDN ; un autre groupe avec administration p.o. sérum physiologique + injection IP ISDN), 1 groupe mambalgine (injection IV bloqueur ASIC mambalgine + injection IP ISDN), et 1 groupe "Propranolol" (administration propranolol p.o.+ injection IP ISDN). Au total 40 animaux seront utilisés dans ce projet. Tous ces animaux seront mis à mort à la fin de la procédure par injection létale de pentobarbital. Le test de sensibilité mécanique respecte les règles éthiques édictées par l'internationale association for the study of pain puisqu'il permet l'échappement de l'animal vis à vis du stimulus qui présente d'autre part une durée très courte (douleur évoquée de faible intensité à modérée) : 3 sec par stimulation mécanique. L'étude centrée sur la sensibilité à la douleur ne nous permet pas d'utiliser des antalgiques qui pourraient constituer un biais significatif aux résultats attendus. Cependant toute observation de signes (points limites) tels que la prostration, paralysie, convulsions, perte de poids >15%, apathie... mettraient fin à l'expérimentation pour ces animaux par une mise à mort par injection létale d'anesthésique. Toujours dans le cadre du respect de la règle des 3R, les animaux auront une période d'habituation

à l'expérimentateur et aux tests avant de débiter l'étude comportementale. Par ce projet, nous entendons : caractériser chez le rat si le bloqueur ASIC et le propranolol sont efficaces en tant que traitement de fond antalgique dans notre modèle de douleur (allodynie) migraineuse chronique (via ISDN). La comparaison des deux permettra de suggérer si le bloqueur des canaux ASIC peut constituer une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de fond de la migraine.

4334. Le présent projet est un enseignement de Physiologie Animale dispensé aux étudiant/es en 3e année de Licence. Cette licence permet aux étudiants d'accéder, en fonction de leur dossier, à divers masters. Dans cette optique, l'UE offre une formation pratique des méthodes d'études en physiologie animale auxquelles l'étudiant/e pourra être confronté/e dans son cursus ou sa carrière. L'étudiant/e est ainsi initié/e à la chirurgie chez le rat de laboratoire, doit obtenir des données et mesures physiologiques qu'il/elle doit analyser quotidiennement sous la forme d'un rapport rendu à l'enseignant/e. Optionnelle et limitée à 40 étudiants/an, cette UE peut clairement constituer un atout dans le cursus universitaire de l'étudiant/e qui se destine à la recherche en Physiologie Animale. En pratique, les étudiants travailleront essentiellement chez le Rat. Il est important de noter que, préalablement aux séances pratiques, les étudiants reçoivent, dans le cadre de Travaux Dirigés, une formation initiatique de 3h focalisée sur les règles éthiques relatives à l'expérimentation animale et au Bien-Être animal. De plus, ils ont accès à la présente autorisation. L'UE est organisée afin de satisfaire au mieux à la règle des 3R, à l'exception du Remplacement dans le sens où l'objectif de l'UE est d'initier les étudiant/es à la pratique de l'expérimentation animale qui, dans la grande majorité des laboratoires de recherche, s'effectue chez le Rat : (1) Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les étudiants travaillent en binôme. Sur le plan pédagogique, il n'est pas envisageable de les faire travailler en trinôme (ou en groupe plus conséquent encore) parce que l'implication de chacun doit être d'un certain niveau pour que les objectifs pédagogiques soient atteints. Par ailleurs, quand cela est possible, plusieurs postes de travail pourront utiliser le même animal (ex : mesures ex vivo de l'activité motrice intestinale). Enfin, chaque binôme ne peut utiliser qu'un seul animal par séance de travaux pratiques. Au total, sur le projet de 5 ans ainsi présenté, 755 rats seront utilisés (cf. justification en section 3.4.10). (2) Les animaux étant mis à mort à la fin de la séance de Travaux Pratiques (classe « sans réveil »), le Raffinement est assuré par anesthésie générale profonde et durable dont la qualité est constamment évaluée, par l'enseignant et les étudiant/es durant la séance de TP, et optimisée dès le moindre signe de réduction de l'effet anesthésique. Elle s'accompagne d'une anesthésie locale sous-cutanée dans les zones subissant la chirurgie. Notons que (i) les animaux sont placés en salle d'expérimentation plusieurs heures avant l'enseignement afin de leur permettre de s'habituer au nouvel environnement, (ii) les rats sont anesthésiés par un agent détenteur de l'autorisation d'expérimenter et auquel ils sont habitués dès leur arrivée à l'animalerie de l'établissement, (iii) chaque enseignant n'ayant que 4 ou 5 binômes à encadrer, la surveillance de la qualité de l'anesthésie est optimale, (iv) la mise à mort de l'animal, extrêmement rapide par injection intraveineuse, survient dès que les expériences sont terminées.

4335. Contexte : Les autorités de santé vétérinaires exigent la démonstration de l'activité des lots commerciaux de chaque vaccin via des contrôles qualité qui ont pour finalité l'autorisation de mise sur le marché (AMM). La Pharmacopée Européenne demande la démonstration de résultats concrets, certains devant être obtenus chez l'animal. Objectifs : Les tests ont pour but de déterminer l'activité d'un vaccin destiné aux animaux de rente Evaluation dommages et avantages : Les animaux peuvent présenter une légère augmentation de stress due aux injections des vaccins, aux prélèvements sanguins et aux manipulations. Les animaux témoins peuvent montrer des symptômes liés à la maladie virale. Toutes les manipulations sont réalisées par du personnel formé et compétent. Ces tests garantissent une commercialisation de vaccins qui sont sûrs et efficaces pour l'animal et permettent la libération d'un nombre important de doses de vaccins améliorant considérablement la qualité sanitaire des élevages et la sécurité alimentaire des consommateurs. Informations sur les espèces utilisées : 300 ovins sur 5ans. Mise en œuvre des 3R : Remplacement : les réglementations des pays destinataires du produit exigent la réalisation des tests sur animaux pour la mise sur le marché de lot commercial. Il n'est actuellement pas possible de les remplacer sans un changement de la réglementation de tous les pays. Réduire : le nombre d'animaux est imposé par la réglementation. Une réduction du nombre d'animaux est possible grâce à la mutualisation de lots témoins chez les rongeurs. Raffinement : De légers symptômes sont attendus uniquement pour les animaux témoins. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort. De ce cas, des points limites liés à l'espèce sont mis en place. Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être. Tous les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements adaptés du milieu ont été mis en place dans les hébergements. La Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

4336. Contexte : Les autorités de santé demandent la démonstration de l'innocuité, de l'activité sérologique et de la pureté d'un vaccin grâce à des contrôles qualité qui ont pour finalité l'autorisation de mise sur le marché (AMM). La Pharmacopée Européenne exige la démonstration de résultats, dont certains doivent être obtenus chez l'animal. Objectifs : Les tests ont pour but de confirmer l'innocuité, de déterminer l'activité sérologique (efficacité) et de vérifier la pureté d'une formulation vaccinale, ainsi que de confirmer l'innocuité d'adjuvants entrant dans la composition de vaccins. Evaluation Dommages / Avantages : Aucun dommage n'est attendu, un léger stress lié aux manipulations et injection des vaccins peut apparaître. Toutes les manipulations sont réalisées par du personnel formé et compétent. Ces tests permettent la libération d'un nombre important de doses de vaccins améliorant considérablement la qualité sanitaire des élevages et la sécurité alimentaire des consommateurs. Informations sur les espèces utilisées : 1855 porcs, 140 moutons, 435 bovins, 2375 cobayes, 750 rats et 4375 souris sur 5 ans. Mise en œuvre des 3Rs : Remplacement : De nombreux tests d'activité sont passés in vitro. Il n'est actuellement pas possible de remplacer les autres tests

sans un changement de la réglementation de tous les pays. Réduire : La réduction du nombre d'animaux est possible grâce au retrait des groupes témoins dans les purétés porc et à la mutualisation de groupes témoins Raffinement : dans ce projet, aucune souffrance ou stress significatif est attendu. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort. Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être. Tous les animaux sont hébergés en groupe. Des enrichissements du milieu ont été mis en place dans les hébergements. La Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

4337. Le but de ce projet est d'évaluer différents dispositifs de colles biologiques dans le cadre de l'exérèse des neurinômes. Les neurinômes sont des tumeurs nerveuses bénignes, non cancéreuses qui se développent au niveau de nerf, à partir de l'oreille, dans le conduit auditif interne, provoquant une surdité ou des troubles de l'équilibre. Sa croissance peut entraîner une compression du cerveau, du cervelet, du nerf trijumeau et du nerf facial. Il est donc nécessaire de procéder à l'exérèse de cette tumeur. En fonction de la taille de la tumeur, il est nécessaire d'effectuer un comblement de la cavité opératoire par des tissus graisseux et d'utiliser des colles biologiques afin d'éviter toute fuite de liquide céphalo rachidien (LCR). Le but de ce projet est donc d'évaluer différents dispositifs de colles biologiques afin de privilégier le meilleur afin de l'utiliser pour les interventions chirurgicales humaines. Ce projet visera à étudier 4 dispositifs de colles biologiques et nécessitera 2 porcelets d'environ 50 kg. L'intervention se déroulera en 2 phases: - La phase 1: Voie d'abord (au niveau de la base du crâne) - La phase 2: Comblement avec graisse et évaluation de l'adhérence avec les différents dispositifs. Nous utiliserons des porcelets jeunes adultes (environ 50 kg), provenant d'un élevage, pour être au plus proche de l'anatomie humaine et ainsi faire que l'étude soit réalisée dans les conditions les plus proches de la réalité. Il sera nécessaire d'utiliser 2 porcelets, ce qui est le strict minimum compte tenu du nombre de dispositifs de colle biologique à tester, 4 soit 2 par porcelet (1 dispositif par côté). La graisse utilisée proviendra de porcs déjà utilisés pour la viande, ce qui évite de faire des prélèvements supplémentaires sur les animaux anesthésiés. Tout est mis en œuvre pour éviter tout stress et toute souffrance. Les porcelets sont transportés dans des conditions confortables, jusqu'au laboratoire. Dès leur arrivée nous leur administrons des calmants (prémédication) pour leur éviter le stress des manipulations jusqu'au bloc opératoire. Les animaux seront opérés dans la condition d'un bloc opératoire "humain" mis sous anesthésie générale et sous respirateur et leur rythme cardiaque est surveillé. Nous leur administrons également des analgésiques. Des points limites ont été définis et seront décrits dans les paragraphes suivants. C'est une procédure sans réveil ce qui veut dire, que l'animal ne sera pas réveillé et sera mis à mort par surdosage d'anesthésique.

4338. Ce projet vise à compléter des données d'une étude préliminaire faite par l'un de nos partenaires. Ce projet avait fait l'objet d'une autorisation de projet éthique pour un autre établissement utilisateur et a pour but de mettre en évidence les effets thérapeutiques de traitements viraux sur des animaux porteurs de tumeurs pulmonaires. Il s'inscrit dans le domaine de la recherche préclinique, avec pour but de développer de nouveaux traitements contre certaines tumeurs chez l'Homme. Déroulement du projet: Les cellules tumorales seront injectées par voie intra-veineuse au niveau de la queue, cette technique est complexe, et 20 animaux pourront être dédiés à une session d'entraînement pour s'assurer que la technique est parfaitement maîtrisée et reproductible. Le protocole consistera à mettre en évidence sur des souris porteuses de tumeurs pulmonaire l'effet thérapeutique de virus dont le potentiel sera ou non exacerbé par l'injection d'adjuvants à plusieurs reprises. Leur état de santé et leur poids constituent des indicateurs pertinents pour définir l'efficacité de ces traitements. REMPLACEMENT: Ce type de protocole ne peut pas être remplacé par une approche alternative n'utilisant pas d'animaux, en effet, le modèle tumoral doit s'implanter dans un organisme vivant complexe, afin d'exprimer l'ensemble des marqueurs et des caractéristiques des tumeurs que l'on cherche à traiter. Des expériences cellulaires ont eu lieu au préalable pour mettre en évidence le potentiel thérapeutique des virus utilisés dans ce projet. REDUCTION: Le nombre d'animaux a été défini grâce aux données préalablement établies sur la croissance du modèle tumoral, mais aussi sur la variabilité possible de l'approche thérapeutique. Ainsi, un effectif de 15 animaux par groupe constitue un minimum acceptable d'un point de vue scientifique tout en se conformant aux principes de réduction liés à l'éthique. 105 souris seront utilisées pour ce projet afin de tester l'efficacité de deux candidats thérapeutiques sur le développement d'une lignée tumorale se développant au niveau pulmonaire. 5 groupes d'animaux seront utilisés afin de mettre en évidence l'efficacité d'un traitement avec ou sans adjuvants permettant de renforcer la réponse immunitaire face à la tumeur. 10 animaux sont aussi prévus en cas de souci durant l'injection intra-veineuse qui s'avère une technique très méticuleuse, même pour un personnel entraîné. RAFFINEMENT: Les animaux seront observés quotidiennement pour s'assurer que leur état de santé n'est pas détérioré, et pesés 2 fois par semaine. Les points limites de mise à mort pour raison éthique seront liés au poids de l'animal, à son état de santé afin d'éviter une souffrance de l'animal.

4339. Ce projet vise à compléter des données d'une étude préliminaire faite par l'un de nos partenaires. Ce projet avait fait l'objet d'une autorisation de projet éthique pour un autre établissement utilisateur et a pour but de mettre en évidence les effets thérapeutiques de traitements viraux appliqués de manière préventive, avant la mise en place de tumeurs sous-cutanées. La croissance de la tumeur sera mesurée deux fois par semaine afin de s'assurer que son volume reste inférieur au point limite décrit dans le protocole. Cette donnée constitue le principal but de cette recherche. Ainsi, le projet s'inscrit dans le domaine de la recherche préclinique, avec pour but de développer de nouveaux traitements contre certaines tumeurs chez l'Homme.

REEMPLACEMENT:

Ce type de protocole ne peut pas être remplacé par une approche alternative n'utilisant pas d'animaux, en effet, le modèle tumoral doit s'implanter dans un organisme vivant complexe, afin d'exprimer l'ensemble des marqueurs et des caractéristiques des tumeurs que l'on cherche à traiter. Des expériences cellulaires ont eu lieu au préalable pour mettre en évidence le potentiel thérapeutique des virus utilisés dans ce projet.

REDUCTION:

55 souris seront utilisées pour ce projet afin de tester l'efficacité de deux candidats thérapeutiques sur le développement d'une lignée tumorale se développant au niveau sous-cutané.

5 groupes d'animaux seront utilisés avec un groupe contrôle non traité et les autres groupes permettront de tester deux doses de chaque composé.

Le nombre d'animaux a été défini grâce aux données préalablement établies sur la croissance du modèle tumoral, mais aussi sur la variabilité possible de l'approche thérapeutique.

Ainsi, un effectif de 10 animaux par groupe constitue un minimum acceptable d'un point de vue scientifique tout en se conformant aux principes de réduction liés à l'éthique.

RAFFINEMENT:

Le protocole consistera donc en l'injection des traitements en préventif, à deux reprises, puis à l'injection de cellules tumorales visant à mettre en place une tumeur solide sur le flanc de l'animal.

Les points limites seront fixés sur le poids de l'animal, son état de santé mais aussi sur le volume de la tumeur afin d'éviter une souffrance de l'animal.

Une anesthésie sera nécessaire pour le rasage de la zone d'injection des cellules tumorales, afin de détecter de manière précoce l'apparition de celles-ci.

4340. Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées. Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP (antisérum) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie. Les antisérum sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire); lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum. Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile). L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; 4) l'utilisation prévue des anticorps. La production d'AcP chez le rat est particulièrement adaptée aux projets pour lesquels une qualité d'anticorps est requise, tout en limitant le nombre d'animaux à engager dans les programmes de production ainsi que la durée des protocoles. En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 5 protocoles, représentant 100 rats. Le temps minimum d'immunisation est de 85 jours. Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation. Les rats sont hébergés en groupe dans des cages adaptées afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (rouleau en carton,...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

4341. Chez l'homme la perte de l'odorat génère des handicaps dans la vie quotidienne des individus atteint par une pathologie dont un des symptômes est l'anosmie (perte totale) ou l'hyposmie (réduction). Par ailleurs, ces 2 symptômes peuvent être un indice dans l'évolution de maladie neurodégénérative comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson. Ainsi en médecine transnationale l'étude de l'olfaction pourrait amener à l'établissement de marqueurs diagnostics précoces. Il a été récemment établi qu'il existait un lien entre l'apparition de dysfonction sensorielle et l'apparition plus tardive des premiers symptômes de la maladie d'Alzheimer. La mise en œuvre de différents modèles sensoriels animaux mimant des maladies mettant en jeu une atteinte du système olfactif permettra d'étudier les mécanismes sous-jacents et d'évaluer l'effet thérapeutique de nouvelles molécules. L'anosmie (perte totale de l'odorat) est un des symptômes invalidants de la rhinosinusite chronique (RSC) avec polyposse nasale qui est une maladie invalidante qui touche environ 4% de la population. Les causes de cette maladie sont mal connues, mais sont vraisemblablement allergique et inflammatoire. Dans un modèle murin de la maladie, l'étude de la récupération de ce symptôme après traitement permettra d'affiner la mise en place de cette thérapeutique. Nous utiliserons les modèles expérimentaux induisant une réduction ou perte de l'olfaction qui ont déjà été développées chez la souris. De plus, cette espèce est l'espèce de choix si des modifications génétiques sont nécessaires à la réalisation de l'étude. 4000 souris seront utilisées pour les 5 ans du 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 affectant l'utilisation des animaux (l'hébergement, les soins, la manipulation, les expérimentations, la mise à mort), et ayant toutes pour objectif de prévenir ou réduire toute souffrance ou détresse chez l'animal. Dans ce projet, le signe clinique attendu est la perte de l'odorat qui peut engendrer une modification du comportement alimentaire et tout est mis en œuvre pour réduire la contrainte et la souffrance à 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. A la demande du scientifique, un support du service biostatistiques est apporté aux expérimentateurs pour l'élaboration du design expérimental, pour optimiser le nombre d'animaux utilisés dans les études et pour effectuer ou revoir les analyses statistiques. Enfin, les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques et comportementaux fondamentaux.

4342. Plus de 70% des cancers sont aujourd'hui guéris par la chirurgie qui demeure le traitement de référence en la matière. Les autres modalités thérapeutiques de l'arsenal classique sont la chimiothérapie et la radiothérapie. Bien que des progrès sans cesse croissants soient réalisés en termes d'efficacité des traitements et de réduction des effets secondaires, la nécessité de développer d'autres approches thérapeutiques persiste. Au cours des deux dernières décennies, l'immunologie des cancers a connu des avancées fondamentales qui se sont traduites en applications cliniques. Ainsi, l'émergence de nouveaux concepts a fait de l'Immunothérapie une 4^{ème} modalité de traitement du cancer après les traitements conventionnels. Ceci s'inscrit par ailleurs dans un nouveau paradigme où l'on admet que l'échappement à l'immunosurveillance est une nouvelle caractéristique fondamentale dans l'émergence des cellules cancéreuses. Notre projet vise ainsi deux objectifs complémentaires : comprendre les aspects fondamentaux des interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires qui mènent à l'immunorégulation des cancers ; et aussi mettre en application ces découvertes pour le développement de nouvelles approches d'immunothérapie anti-cancéreuse. L'importance de cellules T-régulatrices dans le développement des cancers n'est plus aujourd'hui à démontrer. Les preuves se sont accumulées ces 10 dernières années quant au rôle prépondérant que ces cellules jouent sur le développement tumoral. Il existe un lien étroit entre les cellules tumorales et les T régulatrices, tant est si bien que ces dernières représenteraient un facteur pronostic efficace pour déterminer le devenir de la pathologie. Ainsi les cellules T-régulatrices ont très récemment émergées en tant que cibles thérapeutiques de choix dans la lutte anti-cancéreuse. Ce projet vise à mettre en place de nouveaux modèles des chimères de souris humanisées qui répondent aux critères physiopathologiques de différents cancers étudiés. Il s'agit d'abord de reconstituer le système immunitaire de souris immunodéficientes (SCID +/- irradiés) à partir de cellules humaines. Ces souris seront alors xenotransplantées avec des cellules issues de lignées tumorigènes humaines représentatives de différents cancers d'intérêt thérapeutique tels que les HuH7/Carcinome Hépatocellulaire, MDA/ Cancer du sein, SKOV3/Cancer Ovarien, C666-1/Carcinome du Nasopharynx, exprimant la luciférase pour un suivi de la croissance tumorale. Ce modèle humanisé nous permettra alors d'évaluer l'activité cellulaire du système immunitaire, activé ou réprimé par diverses molécules d'intérêt immunothérapeutique, tout en réalisant des tests immunodiagnostiques. Des modalités en cours d'expérimentation seront alors testées, tels que des molécules d'Immunothérapie, ou encore des protocoles de radiothérapie. Pour réaliser ces expériences il nous faudra un nombre total de 420 animaux est requis pour 5 années. L'expérience passée du laboratoire sur la mise en place de tels modèles nous permet d'offrir des conditions expérimentales optimales. Les connaissances déjà acquises sur le modèle nous permettent ainsi de réduire un maximum le nombre d'animaux nécessaires à une conclusion scientifique. La durée même de l'étude sera par ailleurs restreinte à la fenêtre du modèle d'étude. Les animaux utilisés au cours de cette étude bénéficieront de la grande expérience des manipulateurs et de l'environnement et du savoir-faire offert par le plateau d'expérimentation d'animale de notre institut. Les animaux vivent dans un environnement dit "enrichi" qui leur permet de réaliser leur comportement naturel, par exemple, les cages contiennent toutes "une petite maison" pouvant accueillir les animaux leur permettant ainsi de se cacher. De même, en cours d'expérimentation, les animaux ayant subi une chirurgie lourde seront posés sur un papier ouaté stérile. Là encore, après leur réveil les animaux pourront conserver ce papier pour en faire un nid, dans lequel elles évoluent de manière naturelle. Ces deux objets sont de bonnes méthodes permettant de diminuer le stress des animaux notamment en cours d'expérimentation. Concernant la douleur, une prise en charge et une vigilance constante et régulière sera établie. Tout d'abord, les phases chirurgicales, considérées ici comme la phase la plus douloureuse, se fera sur un animal calmé et endormi par un anesthésique gazeux d'action très rapide, suivi d'une anesthésie profonde, empêchant les douleurs ressenties par l'animal. En fin de chirurgie, les animaux reçoivent un antidote qui les réveille et bloquent les effets de l'anesthésique, accompagné d'un antalgique qui diminue les sensations douloureuses. Cette chirurgie se fera sur un tapis chauffant à 37°C qui favorise la encore le bien-être de l'animal mais aussi favorise son métabolisme et

les chances de réussite. Enfin, le suivi strict des animaux associé à la bonne connaissance des modèles pathologiques étudiés nous permettra d'éviter le développement inutile de masses tumorales et de respecter les règles éthiques en vigueur.

4343. Les études précliniques permettent d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament, indispensable avant les essais chez l'homme. Le développement préclinique fait en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de l'administrer à l'homme. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacocinétique, de la toxicologie ou encore de l'efficacité. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament et sont donc indispensables. L'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde sont deux pathologies qui appartiennent à la famille des rhumatismes et entraînent des douleurs au niveau des articulations : - L'arthrose ou ostéoarthritis (OA), est une affection chronique inflammatoire qui se manifeste par des douleurs persistantes aux articulations causées par l'usure anormale (dégénérescence) du cartilage et de l'ensemble de l'articulation. -

La polyarthrite rhumatoïde (RA) est également une maladie inflammatoire des articulations mais qui a une origine différente. En effet, elle est due à un dérèglement du système immunitaire (maladie auto-immune). Les articulations douloureuses gonflent puis se déforment menant dans 20% des cas à une incapacité fonctionnelle. Ces deux pathologies affectent des millions de personnes chaque année. Elles ont donc des impacts sociaux et économiques majeurs sur les patients et le système de santé. Les thérapies actuellement disponibles pour traiter ces maladies ne réussissent pas à lever de façon adéquate la douleur chez beaucoup de patients, et les effets secondaires des traitements limitent considérablement leur utilisation. De plus, les traitements utilisés ne traitent que les conséquences de la maladie, c'est à dire l'inflammation et la douleur. Il y a donc un besoin urgent de trouver de nouvelles molécules efficaces. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet, le but étant d'étudier l'effet de nouveaux traitements potentiels sur la réponse à la douleur et l'inflammation dans des modèles animaux mimant l'OA ou la RA chez le rat. Pour ce projet nous pensons effectuer 30 études avec pour chaque étude, l'utilisation de 65 rats (6 groupes de 5-12 animaux), soit 1950 rats sur 5 ans. Ceci est une estimation et repose sur l'évaluation de 6 nouvelles molécules thérapeutiques potentielles par an. Pour nos études, nous utiliserons trois modèles différents induits chez le rat. Ces modèles animaux sont bien connus et employés intensivement dans la recherche sur l'arthrite ou l'arthrose et dans l'industrie pharmaceutique dans l'essai et la validation de nouveaux agents thérapeutiques potentiels. En conclusion, ce projet permet d'envisager des bénéfices cliniques et économiques évidents. Pour des groupes de 5-12 animaux, réparti sur 5 ans, le projet porte sur une estimation de 390 rats par an pour évaluer/valider 6 candidats thérapeutiques par an. Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes : - « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation : Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant, afin de pouvoir conclure sur l'efficacité du traitement. - « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") : Toutes les procédures induisant une douleur chez l'animal seront réalisées sous anesthésie (chirurgie, injection intra-articulaire ou intra-dermique). De plus, les animaux seront sous surveillance rapprochée. Les rats seront suivis quotidiennement pour pouvoir identifier les signes de souffrance caractérisés par le comportement du rat : les changements physiques (pelage, peau, yeux...), la mobilité, l'alimentation, l'agressivité, le poids du corps (mesuré 2 fois par semaine) limité à une perte de 20% maximum par rapport au poids initial, la consistance des fèces. Si les signes persistent au bout de 24h, l'animal sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié. - « Remplacer » les modèles animaux : Notre projet se focalise sur un modèle expérimental nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Ces modèles in vivo permettent de mesurer la réponse à la douleur et l'inflammation en reproduisant la physiologie d'un organisme entier. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

4344. Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une formation continue dispensée à des professionnels réalisant des expérimentations sur l'animal souhaitant valider leurs compétences de base concernant la manipulation et l'utilisation des rongeurs. Alors que ces professionnels possèdent toutes les autorisations pour réaliser ces études, ils souhaitent revalider leur savoir-faire au cours d'une formation pratique et rapide auprès de personnels qualifiés travaillant au quotidien avec des animaux. L'objectif est d'assurer la réalisation d'expérimentations de qualité tout en garantissant le bien-être des animaux. La formation « Méthodes de base de préhension administration et prélèvement d'échantillons chez le rat » est d'une durée de 7h, composée essentiellement de travaux pratiques. Le programme de formation est le suivant : 1. Ethique et respect du bien-être des animaux :

- Visite du laboratoire.
- Rappel des règles d'éthique en matière d'entretien et de manipulation des animaux utilisés à des fins d'expérimentation.

- Règles éthiques supplémentaires non prévues par la réglementation et appliquée par au sein du laboratoire permettant d'améliorer le bien-être des animaux, notamment dans le cadre d'études comportementales (cycle lumineux inversé, respect de la chronobiologie, besoins comportementaux élémentaires, enrichissement, savoir se comporter de manière adéquate avec les rongeurs).

- Règles éthiques en matière d'administrations de traitement et de prélèvements (volumes, matériels, etc).

- Rappel des conditions de mise à mort des animaux.

2. Déplacer et manipuler les animaux en réduisant le stress.

3. Apprentissage des différentes méthodes d'administration d'une substance chez le rat et applications pratiques : gavage, intraveineuse (veine caudale), intramusculaire, sous-cutanée, intrapéritonéale et intracardiaque sur animaux anesthésiés (plus rappel des principes généraux d'anesthésie).

4. Prélèvements de sang par voie IV à la veine de la queue sur tubes et traitement des échantillons.

5. Dissection d'un rat et méthodes de prélèvements d'organes.

6. Méthodes de fixation des organes.

L'ensemble des aspects réglementaires, éthiques et pratiques de la réalisation de ces procédures sera rappelé de façon théorique en début de formation.

Un total de 20 rats sera utilisé dans ce projet : 4 rats seront utilisés par le formateur pour la démonstration des différentes méthodes de traitement et de prélèvement et 16 rats seront utilisés par les personnes à former. Au cours de la formation, les rats seront observés afin d'isoler voire de sacrifier de façon éthique tout animal montrant des signes de souffrance (prostration, vocalisations, agressivité...).

A la fin du projet, si les animaux ont été anesthésiés au cours d'une procédure, ils seront mis à mort au cours de l'anesthésie par le formateur. Pour les procédures au cours desquelles les animaux restent conscients, les animaux seront conservés pour une utilisation dans un autre projet interne de formation avec procédure sans réveil dans un objectif de réduction du nombre d'animaux utilisés en expérimentation animale.

Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour ce type de formation, l'objectif étant pour les personnes formées de réaliser l'ensemble des gestes techniques enseignés lors des expériences qu'ils auront à mener chez le rat à l'issue de cette formation.

4345. Afin qu'un nouveau produit devienne un médicament sûr et efficace, un ensemble d'études expérimentales utilisant des animaux est nécessaire en conformité avec la réglementation et la loi. Dans ce contexte, il s'agit ici d'évaluer la sécurité de nouveaux potentiels médicaments à tester dans un modèle d'insuffisance hépatique chez le rat, ce qui permettra de dérisquer le test de ces nouveaux potentiels médicaments chez des patients atteint d'insuffisance hépatique. Le recours à l'animal est nécessaire car l'utilisation de cellules hépatiques seules ou de foie isolé ne permettrait pas d'atteindre l'objectif de l'étude et ne répondrait pas aux exigences de la réglementation.

Pour cela, quatre-vingt-huit rats seront utilisés dans le projet, ce nombre d'animaux correspondant au minimum afin d'évaluer plusieurs doses et plusieurs produits à tester et obtenir des résultats pertinents. L'insuffisance hépatique a été caractérisée dans le cadre d'un précédent projet. Ces animaux seront hébergés selon les standards Européen en vigueur et feront l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. Ils recevront par voie intraveineuse (perfusion continue) 2 produits à tester pour une période de traitement de 9 jours. Un certain nombre d'examen seront réalisés afin d'évaluer l'insuffisance hépatique et la toxicité des produits à tester et les mesures appropriées seront prises pour maintenir le bien-être des animaux.

4346. Une seule dent manquante peut provoquer des migrations ou une usure prématurée des autres dents, des problèmes de gencives et une mauvaise esthétique. Pour remédier à cela, 2 solutions existent : la prothèse dentaire ou l'implant dentaire. L'implantologie dentaire est une technique qui vise à remplacer une racine dentaire quand celle-ci est tombée ou a dû être extraite. Un implant dentaire est donc une racine artificielle que l'on fixe dans l'os de la mâchoire et qui est destinée à accueillir une fausse dent: les implants doivent donc assurer une parfaite cicatrisation des tissus environnant et s'intégrer parfaitement dans l'os de la mâchoire. La péri-implantite est une inflammation se formant autour d'un implant dentaire. Il s'agit d'une maladie multifactorielle dans laquelle les bactéries jouent un rôle décisif, et qui entraîne une dégradation de l'os entourant l'implant, beaucoup plus rapidement que dans le cas de dents naturelles. Si la péri-implantite n'est pas traitée correctement, il y a de forts risques de perte de l'implant, et d'atteinte des dents adjacentes ou d'autres implants. Le présent projet a pour objectif l'évaluation d'implants innovants, qui s'intègrent mieux dans le tissu osseux et limitent les phénomènes de péri-implantite. Des traitements de la péri-implantite installée pourront également être évalués. Pour cela, l'utilisation au maximum de 50 chiens beagle sur 5 ans pourra être nécessaire (évaluation de plusieurs nouveaux implants ou traitements). Ce nombre pourra être inférieur en fonction des résultats obtenus. L'utilisation d'animaux reste indispensable car il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle de substitution permettant de reproduire le parodontite et le microbisme buccal. Durant tout le projet, les animaux seront hébergés en groupes et dans des conditions respectant les besoin de leur espèce (espace, jeux, contacts humains), afin de leur éviter tout stress.

4347. Les cellules souches pluripotentes sont capables de former tous les types cellulaires spécialisés qui constituent l'organisme adulte. Cette propriété est appelée « pluripotence ». Lorsque les cellules souches pluripotentes de souris sont injectées dans un embryon, elles participent au développement de tous les organes, y compris les gamètes. Cette technologie est utilisée chez la souris depuis 25 ans pour produire des modèles de maladies génétiques et étudier la fonction des gènes. L'objectif à long terme du projet faisant l'objet de la présente demande d'expérimentation animale est de transférer cette technologie chez le lapin et le primate non-humain, dans le but ultime de fabriquer des modèles de maladies génétiques plus pertinents que les modèles murins actuellement disponibles.

Nous fabriquerons des lignées de cellules souches pluripotentes de différentes espèces, puis nous testerons leur capacité à coloniser l'embryon de souris et à participer aux premières étapes du développement embryonnaire in vivo. La souris est un animal très prolifique et représente un très bon modèle pour produire des embryons en grand nombre, notamment grâce à la technique de super-ovulation qui implique des injections d'hormones (afin de réduire le nombre de souris sacrifiées). Les animaux utilisés pour l'expérimentation sont des animaux adultes (entre 6 et 10 semaines).

La procédure expérimentale sera répétée quasiment toutes les semaines, cela représente 450 souris femelles et une dizaine de mâles par an (2305 souris sur la totalité du projet). Les procédures expérimentales envisagées sont classées de "légères" à "modérées". Aucun acte n'est mis en œuvre sur un animal présentant des signes indicatifs de douleur et/ou de gêne et le protocole

est suspendu en cas de manifestation d'inconfort (gêne et/ou douleur) de l'animal. Le laboratoire travaille en permanence à l'amélioration de la qualité des lignées de cellules souches pluripotentes ce qui devrait conduire à augmenter leur efficacité de colonisation et donc réduire le nombre d'embryons utilisés dans chaque expérience. Suivant la capacité des cellules à coloniser l'embryon, le nombre d'individus entrant dans le protocole sera diminué en conséquence.

Les souris ont à leur disposition différentes formes d'enrichissement afin de réduire l'ennui et le stress. La souffrance est contrôlée par une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude. Les animaux présentant des signes de douleur reçoivent une injection d'analgésique. En cas de douleur persistante malgré les traitements entrepris, l'animal est euthanasié.

4348. Les implants dentaires représentent une solution thérapeutique de premier plan en dentisterie restauratrice. Le nombre d'implants placés est en constante augmentation et il atteint le nombre de 600000 implants placés en France en 2013. Malgré des taux élevés de réussite, il faut noter que jusqu'à 40 % des implants posés pourront être affectés par la suite par les péri-implantites qui sont la complication la plus souvent rencontrée (La péri-implantite est une maladie inflammatoire d'origine infectieuse avec des bactéries pathogènes). Aujourd'hui, les principales attentes par un traitement contre les péri-implantites sont de disposer d'une approche peu invasive, multifonctionnelle et présentant un bon rapport coût/bénéfice. L'objectif principal de ce projet est l'évaluation d'un dispositif « nano » qui fournirait les 2 effets thérapeutiques requis dans le traitement des péri-implantites avec une application unique « One-Shot » au cours de la procédure chirurgicale habituelle. Ce traitement par définition correspond à un dispositif à libération contrôlée d'un agent antibiotique. La Clindamycine a été choisie comme antibiotique pour son affinité avec le biomatériau vecteur ainsi que pour son action antimicrobienne sur l'os. Ce biomatériau a été précédemment développé et testé in vitro et in vivo. La pharmacocinétique a également été évaluée. Le but de ce projet est donc d'évaluer ce matériel sur un modèle expérimental préclinique, chez le gros animal comme étant la dernière étape avant l'essai clinique chez l'humain. Le modèle expérimental choisi pour cette étude est celui de péri-implantites induites par la pose de ligatures chez le chien Beagle. Ce modèle représente le « gold standard » pour les péri-implantites dans les études précliniques et il permet l'évaluation de paramètres cliniques pertinents. Afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs, et dans le respect de la règle des 3 R (Remplacer : aucune autre technique ne peut remplacer les essais in vivo, l'utilisation de petits animaux tels que les rongeurs (rats ou les lapins) ne permet pas d'exploiter des sites dentaires car il est impossible d'y poser des implants comparables à ceux utilisés en clinique humaine, Réduire : six animaux est le nombre minimum nécessaire pour les tests statistiques ; Raffiner : l'ensemble des mesures nécessaires pour pallier à la douleur et réduire la souffrance des animaux sont maîtrisées et seront mises en œuvre tout au long du projet). Au total, six chiens seront utilisés et les différents groupes de traitement seront répartis comme décrit ci-dessous: Test: Traitement mécanique chirurgical anti-infectieux (TMCA) + mise en place du nano- hydroxyapatite /clindamycine Contrôle Positif 1: TCMA + nano- hydroxyapatite seule Contrôle Positif 2: TCMA + hydroxyapatite d'origine bovine (BioOss®) Contrôle négatif: TCMA et défauts laissés vides, aucun biomatériau mis en place (témoin négatif). Le résultat attendu de ce projet est que le biomatériau test « nanohydroxyapatite chargée en clindamycine » permettra un meilleur contrôle de l'infection ainsi qu'une meilleure régénération osseuse, comparé à la nanohydroxyapatite utilisée seule ou aux groupes contrôles. Par conséquent, il est attendu que cette étude préclinique fournira des preuves scientifiques fortes pour envisager une application ultérieure en clinique humaine, dans le traitement des péri- implantites

4349. Contexte :

Le projet a pour but de produire des chats porteurs d'un agent viral non pathogène. Ce modèle animal est utilisé dans les études d'évaluation de l'innocuité ou d'efficacité de produits destinés au chat. Ces études sont exigées par la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays destinataires.

Objectifs :

La mise en place du statut positif vis-à-vis de l'agent viral est un prérequis pour certaines études. Etant donné la difficulté d'obtenir des chats conventionnels, la modification du statut permet de se rapprocher du statut des chats présents naturellement. Il s'agit d'inoculer l'agent non pathogène de manière persistante chez le chat. Cet agent viral non pathogène est une infection commune et bénigne en conditions naturelles.

Avantages et dommages :

Les dommages induits par la procédure peuvent être le stress et l'inconfort liés à l'administration de l'agent viral, à la réalisation des prélèvements et aux légères manifestations cliniques de la pathologie.

Pour limiter les contraintes induites par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés. Dans de rares cas, de légers signes cliniques peuvent apparaître. Dans ce cas, un traitement symptomatique peut être mis en place.

La finalité de ces études est de permettre le soin des animaux avec des produits présentant un risque minimal.

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur l'historique du produit testé, les exigences réglementaires et des projets de Recherche et Développement à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé, au plus, à 300 chats.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : Un recueil d'information, lorsqu'il est disponible, est apporté par la bibliographie. Néanmoins, le recours à l'espèce cible est à l'heure actuelle indispensable et est une exigence réglementaire dans l'évaluation de l'innocuité et de l'efficacité de médicament.

Réduction : Le nombre minimum d'animaux à inclure est très souvent une exigence réglementaire. En amont, lors des phases recherche, les effectifs sont évalués au plus juste (analyse statistique, historique, définition des objectifs...) de façon à minimiser le nombre de chats utilisés en limitant le risque d'études non conclusives.

Raffinement : Dans ce projet, aucune douleur ou souffrance n'est attendue. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort. Une anesthésie est réalisée lors de certains actes (administration de l'agent viral non pathogène).

Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être. Tous les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements adaptés au milieu sont mis en place.

La Structure du Bien Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

4350. Le projet a pour but de d'évaluer l'efficacité d'un produit destiné au chien.

Pour qu'un médicament soit autorisé, il faut démontrer que celui-ci apporte un effet bénéfique sur l'animal pour une ou plusieurs pathologies. Les études sont réalisées sur l'espèce cible, comme exigé par la réglementation (Pharmacopée Européenne et réglementation des pays destinataires).

Pour démontrer l'efficacité d'un produit contre un agent pathogène, la mise au point d'un modèle d'épreuve est indispensable. L'épreuve correspond à l'administration de l'agent pathogène pour reproduire, de manière expérimentale, la pathologie le plus fidèlement possible à la réalité.

L'objectif du projet est donc de démontrer l'effet bénéfique du produit lors de l'épreuve.

Pour certaines pathologies, une étude d'amplification in vivo sur chiens de la souche d'épreuve (passage en série de la souche sur plusieurs chiens) peut être nécessaire pour obtenir une souche utilisable dans une épreuve expérimentale.

Avantages et dommages :

Le développement de la maladie chez l'animal peut donner lieu à des signes cliniques provoquant une gêne ou une douleur à l'animal. L'administration du pathogène et les prélèvements peuvent également générer du stress et une gêne. Pour limiter les contraintes induites par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés. De plus, des points limites spécifiques à chaque pathologie sont appliqués.

L'intérêt final de ces études est de permettre le développement de produits efficaces contre des maladies données et pour réduire l'impact des maladies infectieuses chez les chiens.

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur l'historique du produit testé, les exigences réglementaires et des projets de Recherche et Développement à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé, au plus, à 1845 chiens.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : Lorsque cela est possible, une première étape dans le projet de développement d'un produit consiste à tester in vitro différents candidats. Ceci permet une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre de candidats à tester in vivo donc le nombre d'animaux utilisés. Un recueil d'informations est aussi apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

Lorsque les modèles existent, un premier test sur des espèces alternatives (notamment des rongeurs) est réalisé afin de réduire le nombre de chiens utilisés.

Le recours à l'espèce cible est à l'heure actuelle indispensable, les résultats obtenus sur espèces alternatives n'étant pas complètement extrapolables. C'est pourquoi le test sur l'espèce cible est une exigence réglementaire.

Réduction : Pour les études réglementaires, le nombre d'animaux est fixé par les textes. En amont, lors des phases recherche, les effectifs sont évalués au plus juste (analyse statistique, historique, définition des objectifs...) de façon à minimiser le nombre de chiens tout en permettant d'interpréter les résultats des études.

Raffinement :

Des points limites spécifiques à chaque pathologie ont été définis afin de limiter le plus précocement possible la douleur des animaux. Ces critères sont en constante évolution de manière à ce qu'ils reflètent au mieux l'expérience du terrain et l'état actuel des connaissances vétérinaires. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort. Une anesthésie et une analgésie peuvent être réalisées lors de certains actes si nécessaire.

Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être.

Dans la majorité des cas, tous les animaux sont hébergés en groupe. Des enrichissements adaptés au milieu sont mis en place. La Structure du Bien Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie des animaux.

4351. Le projet a pour but d'immuniser des chiens afin de :

Evaluer l'efficacité d'un produit destiné au chien par suivi de la réponse immune,

Déterminer le seuil protecteur en anticorps d'un produit destiné au chien (immunisation passive),

Produire du sérum en tant que réactif pour les laboratoires.

Les études destinées à évaluer la réponse immune suite à l'administration d'un produit sont exigées par la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays destinataires.

Les procédures d'immunisation passives, par administration de sérum hyper-immun, doivent permettre d'évaluer le seuil protecteur en anticorps vis-à-vis d'un pathogène et ainsi limiter le nombre de procédures avec administration d'agent virulent (souvent classées en grade sévère). Cette approche est conforme à la démarche des 3Rs exigée par la Directive Européenne 2010/63/UE.

Ce projet permet également la production de sérum pour les laboratoires afin qu'il soit utilisé comme réactif. Il n'existe actuellement pas de méthodes alternatives à cette production in vivo.

Avantages et dommages :

Les dommages engendrés par les procédures peuvent être le stress et la gêne liés aux administrations de produits et aux prélèvements répétés.

Pour limiter les contraintes induites par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés.

L'intérêt final de ces études est de permettre le soin des animaux avec des produits efficaces et présentant un risque minimal.

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur l'historique du produit testé, les exigences réglementaires et des projets de Recherche et Développement à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé, au plus, à 400 chiens.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : Lorsque cela est possible une première étape dans le projet de développement d'un produit consiste à tester in vitro différents candidats, ce qui permet une première sélection, réduisant ainsi le nombre de candidats à tester in vivo donc le nombre d'animaux utilisés. Un recueil d'informations est aussi apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

Lorsque les modèles existent, un premier test sur des espèces alternatives (notamment des rongeurs) est réalisé afin de réduire le nombre de chiens utilisés.

Le recours à l'espèce cible est à l'heure actuelle indispensable, les résultats obtenus sur espèces alternatives n'étant pas complètement extrapolables. C'est pourquoi le test sur l'espèce cible est une exigence réglementaire.

Réduction : Pour les études réglementaires, le nombre d'animaux est fixé par les textes. En amont, lors des phases recherche, les effectifs sont évalués au plus juste (analyse statistique, historique, définition des objectifs...) de façon à minimiser le nombre de chiens utilisés en limitant le risque d'études non conclusives. Lorsqu'il s'agit de récolte de sérum, le nombre d'animaux est dépendant du volume de sérum nécessaire.

Raffinement : Dans ce projet, aucune douleur ou souffrance n'est attendue. Les études d'immunisation ont pour objectif de connaître le taux d'anticorps protecteur pour différents agents pathogènes et donc, in fine, de réduire le nombre d'animaux utilisés dans des procédures sévères. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort. Une anesthésie peut être réalisée pour certains actes.

Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être. Tous les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements adaptés au milieu sont également mis en place.

La Structure du Bien Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

4352. Le projet a pour but d'évaluer l'innocuité d'un produit sur le chien ainsi que sur son environnement (animaux en contact, environnement, humains).

Pour qu'un produit soit commercialisé, il faut démontrer que celui-ci ne présente aucun risque pour l'animal, ainsi que pour son environnement. Les études sont réalisées sur l'espèce cible du produit développé (le chien) ce qui permet de s'approcher au mieux des conditions réelles d'utilisation.

Ces différentes études sont exigées par la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays destinataires. Celles-ci consistent à vérifier si des réactions générales ou locales au point d'injection se déclarent après l'administration du produit chez le chien ainsi qu'à vérifier l'impact environnemental du produit.

Avantages et dommages :

Les dommages induits par les procédures peuvent être le stress et la gêne liés aux administrations de produits et aux prélèvements répétés ainsi que, dans de rares cas, l'hébergement individuel. Pour limiter les contraintes induites par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés.

L'objectif final de ces études est de permettre d'améliorer les thérapeutiques destinées aux animaux avec des produits efficaces et présentant un risque minimal.

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur l'historique des produits testés, sur les exigences réglementaires et les projets de Recherche et Développement à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans peut aller jusqu'à 200 chiens.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : Lorsque cela est possible, une première étape dans le projet de développement d'un produit thérapeutique consiste à tester in vitro différents candidats. Ceci permet une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés. Une série de tests analytiques permet de garantir un certain niveau de sécurité pour les animaux recevant le produit. Un recueil d'informations est aussi apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

Lorsque les modèles existent, un premier test sur des espèces alternatives (notamment des rongeurs) est réalisé afin de réduire le nombre de chiens utilisés.

Réduction : Le nombre minimum d'animaux à inclure est très souvent une exigence réglementaire. En amont, lors des phases recherche, les effectifs sont évalués au plus juste (analyse statistique, historique, définition des objectifs...) de façon à minimiser le nombre de chiens utilisés en limitant le risque d'études non conclusives.

Raffinement : Dans ce projet, aucune douleur ou souffrance n'est attendue. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort. Une anesthésie de l'animal peut être envisagée lors de certains actes.

Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être. Dans la majorité des cas, tous les animaux sont hébergés en groupe. Des enrichissements adaptés au milieu sont mis en place. La Structure du Bien Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

4353. Les autorités de santé demandent la démonstration de l'activité et de l'identité virale des lots commerciaux de chaque vaccin via des contrôles qualité qui ont pour finalité l'autorisation de mise sur le marché (AMM). De ce fait, la sécurité des lots de vaccins peut être évaluée sur des modèles animaux.

Le projet a pour objectif d'être en conformité avec les exigences réglementaires de la Pharmacopée Européenne et des pays tiers destinataires, dans la constitution d'un dossier d'AMM pour un vaccin. Les tests ont pour but de garantir l'activité et l'identité virale d'un vaccin ou d'un principe actif destiné aux animaux de compagnie (chien, chat, furet) ou aux bovidés, ovidés et équidés domestiques, en utilisant des espèces alternatives (rongeur).

Une équivalence entre les modèles animaux (espèce cible et espèce alternative) a été démontrée. Ceci permet d'utiliser les modèles rongeurs et d'éviter le recours aux espèces cibles afin de garantir une commercialisation de vaccins efficaces et sûres qui protègent l'animal de la maladie.

Dommages/avantages :

Les animaux peuvent présenter une légère augmentation de stress due aux injections et aux manipulations.

Les animaux témoins montrent les symptômes sévères liés aux maladies testées. Des points limites spécifiques aux pathologies sont appliqués.

Toutes les manipulations sont réalisées par du personnel formé et compétent.

Ces tests permettent la libération d'un nombre important de doses de vaccins améliorant considérablement la santé et le confort des animaux de compagnie ainsi que des propriétaires.

Informations sur les espèces utilisées

Pour libérer le nombre nécessaire de doses de vaccins sur le marché des animaux de compagnie nous utiliserons au maximum 56 050 souris et 21 750 hamsters sur 5 ans.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays tiers destinataires du produit exigent des tests sur animaux pour l'AMM. Il n'est actuellement pas possible de les remplacer sans un changement de la réglementation de ces pays.

Réduction : le nombre d'animaux est imposé par la réglementation. Une réduction du nombre d'animaux est possible grâce à la mutualisation de lots témoins.

Raffinement : Des points limites spécifiques aux pathologies sont déterminés pour les témoins non vaccinés. Le personnel vérifie l'évolution de l'état général et si les points limites spécifiques sont atteints. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort.

Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être. Tous les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements adaptés du milieu ont été mis en place dans les hébergements. La Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

4354. Les autorités de santé demandent la démonstration de l'innocuité, de l'activité sérologique et de la pureté d'un vaccin grâce à des contrôles qualité qui ont pour finalité l'autorisation de mise sur le marché (AMM). De ce fait, la sécurité des lots de vaccins peut être évaluée sur des modèles animaux.

Le projet a pour objectif d'être en conformité avec les exigences réglementaires de la Pharmacopée Européenne et des pays tiers destinataires, dans la constitution d'un dossier d'AMM et pour la fabrication d'un vaccin commercial. Les tests ont pour but de confirmer l'innocuité, de déterminer l'activité sérologique (efficacité) et de vérifier la pureté d'une formulation vaccinale, ainsi que de confirmer l'innocuité d'adjuvants entrant dans la composition de vaccins.

Les tests sont effectués soit sur l'espèce cible (chien, chat). Lorsqu'une équivalence entre les modèles animaux (espèce cible et espèce alternative) a pu être démontrée, le recours à l'espèce rongeur est privilégié.

Dommages /avantages : Aucun dommage n'est attendu, un léger stress lié aux manipulations et injection des vaccins peut apparaître.

Toutes les manipulations sont réalisées par du personnel formé et compétent. Ces tests permettent la libération d'un nombre important de doses de vaccins améliorant considérablement la santé et le confort des animaux de compagnie ainsi que des propriétaires.

Informations sur les espèces utilisées :

Pour libérer le nombre nécessaire de doses de vaccins sur le marché des animaux de compagnie, nous utiliserons un maximum de 1500 chiens, 800 chats, 1330 cobayes et 2750 souris sur 5 ans.

Mise en œuvre des 3Rs : Remplacement : la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays destinataires du produit demandent des tests sur animaux pour la mise sur le marché de lot commercial. Il n'est actuellement pas possible de les remplacer sans un changement de la réglementation de tous les pays.

Réduire : le nombre d'animaux est imposé par la réglementation. Une réduction du nombre d'animaux est possible grâce à la mise en commun de lots témoins servant de référence chez les rongeurs.

Raffinement : dans ce projet, aucune souffrance ou stress significatif est attendu. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort

Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être. Tous les animaux sont hébergés en groupe. Des enrichissements du milieu ont été mis en place dans les hébergements. La Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

4355. La maladie de Parkinson est la deuxième des maladies neurodégénératives les plus fréquentes. Malgré cela, les causes sont encore mal connues. Dans les dernières années, de nombreuses études indiquent que l'accumulation de la forme toxique de la protéine alpha-synucléine serait une des causes de la mort des neurones dopaminergiques et des problèmes moteurs conséquents. Les mitochondries sont des organelles qui assurent l'essentiel de la production d'énergie nécessaire au fonctionnement des cellules. Ces organelles sont recyclées par des processus de fusion et de fission. Des études récentes suggèrent que l'équilibre dynamique du réseau mitochondrial par des processus de fusion et fission de ces structures est extrêmement important pour l'homéostasie cellulaire. L'homéostasie désigne la capacité d'un système à conserver son milieu intérieur en équilibre. La perturbation de ces processus serait impliquée également dans la dégénérescence neuronale. En plus des mécanismes cellulaires proposés expliquant l'effet délétère de l'alpha-synucléine agrégée, des études récentes suggèrent que la forme pathologique de cette protéine pourrait également altérer le réseau mitochondrial, provoquant un déséquilibre de l'homéostasie mitochondrial marqué par une augmentation de la fission de ces organelles.

Ce projet a pour but d'évaluer l'effet neuroprotecteur de l'inhibition génétique de la protéine Drp1, une protéine impliquée dans le processus de fission mitochondriale, dans un modèle de neuro dégénérescence induite par l'alpha-synucléine chez le rat. En surexprimant la forme mutée (inactive) de Drp1 dans les neurones dopaminergiques, nous avons montré par des approches *in vitro* que nous pouvons déplacer la forme sauvage, en inhibant la fission mitochondriale. Il est nécessaire de vérifier ce résultat *in vivo*. Nous espérons, avec cette approche, améliorer la survie neuronale et par conséquent la motricité.

En analysant la relation entre l'alpha-synucléine et le réseau mitochondrial, dans le contexte de la maladie de Parkinson, ceci permettra de contribuer à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de la pathologie.

Les animaux recevront par stéréotaxie dans une région du cerveau riche en neurone à dopamine seront injectés deux types de virus : un AAV capable d'infecter les neurones et exprimer une forme mutée de l' α -synucléine dans le but d'induire la toxicité neuronale dans les cellules dopaminergiques et un deuxième AAV exprimant la protéine mutée Drp1 afin de tester un possible effet neuroprotecteur de l'inhibition de la fission mitochondriale, par cette protéine Drp1 mutée. Les animaux contrôles seront injectés avec un AAV n'exprimant pas l'alpha-synucléine ou véhicule ou la forme mutée de Drp1. Après 8 semaines durant lesquelles l'activité locomotrice des animaux sera déterminée à l'aide du test moteur peu invasif, les animaux seront mis à mort, et les cerveaux seront prélevés pour les analyser. Dans un souci de respect du R de réduire, nous utiliserons au maximum 32 rats pour ce projet, ce qui nous permettra de limiter la variation interindividuelle et de pouvoir avoir tous les groupes contrôles nécessaires. Dans le respect du R de raffiner, toutes les douleurs consécutives à la chirurgie seront soulagées à l'aide des molécules les plus adaptées au protocole et à l'état des animaux.

4356. Chez la femme, le recul de l'âge de la maternité a pour conséquence l'apparition, de plus en plus fréquente, de problèmes de vieillissement ovarien de manière concomitante à la survenue du désir d'enfant. L'infertilité qui en résulte est inefficacement prise en charge par les techniques classiques d'Assistance Médicale à la Procréation. Nos travaux explorent les mécanismes du vieillissement ovarien dans le but de mieux les comprendre et d'apporter de nouvelles réponses aux problèmes d'infertilité.)

Le vieillissement ovarien s'accompagne d'une détérioration de la qualité ovocytaire possiblement en lien avec l'effondrement de la masse des mitochondries (organites indispensables à la production de l'énergie cellulaire) dans l'ovocyte. Cette masse deviendrait insuffisante pour soutenir les premières étapes du développement embryonnaire. Elle entraînerait, en outre, des phénomènes compensatoires délétères pour l'embryon. Nous souhaitons étudier, au cours du vieillissement ovarien, l'évolution de la masse mitochondriale par quantification de l'ADN mitochondrial dans l'ovocyte et pendant l'embryogenèse précoce ainsi que l'expression des gènes qui la régulent.

Ce projet portant sur le développement embryonnaire, il nous est impossible de remplacer l'animal par un modèle cellulaire ou *in silico*. Pour des raisons éthiques et légales, notre hypothèse ne peut pas être vérifiée sur l'embryon humain. Le modèle murin choisi a déjà été utilisé comme modèle de vieillissement ovarien. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet seront élevés à des fins expérimentales et dans des conditions d'hébergement standard de l'Unité Expérimentale.

Pour ce projet, nous utiliserons 300 souris femelles réparties en 2 groupes : l'un constitué de femelles jeunes (6 semaines) et l'autre de femelles âgées (9 mois). Les femelles seront euthanasiées pour récolter les ovocytes et les mâles pour récolter les spermatozoïdes épидидymaires. Pendant l'expérience, l'état de santé des animaux sera surveillé. Leur environnement sera enrichi par l'apport de morceaux de coton que les souris peuvent déchiqueter. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés nous procéderons à un protocole de stimulation ovarienne qui permet de collecter deux fois plus d'ovocytes par femelle. Les ovocytes seront collectés en fin de stimulation après euthanasie de l'animal. Une partie des ovocytes sera directement étudiée, l'autre fécondée par Injection Intracytoplasmique de Spermé (ICSI) et les embryons obtenus étudiés aux différents stades de leur évolution *in vitro*.

Certaines des expériences que nous réaliserons sur les ovocytes et les embryons nécessitent des lots de plusieurs embryons (10). Il est nécessaire d'avoir plusieurs lots afin de reproduire ces techniques, de garantir la fiabilité des résultats et de permettre une analyse statistique volontairement adaptée aux faibles échantillons. Nous essayerons de réduire le nombre d'ovocytes et d'embryons en optimisant les techniques pour valoriser au mieux la quantité de matériel qui nous est nécessaire. Enfin, les échantillons seront, dans la mesure du possible, mutualisés avec d'autres projets de l'établissement utilisateur.

4357. Cette formation réglementaire est destinée à former les chercheurs aux actes chirurgicaux afin de leur donner les moyens de raffiner les procédures pour éviter la souffrance des animaux, et réduire le nombre d'animaux nécessaires en évitant leur mort imprévue.

Cette formation explique et montre les différentes étapes d'une intervention chirurgicale du début à la fin, incluant la préparation de l'animal et l'anesthésie, la maîtrise et le contrôle des paramètres opératoires, la bonne conduite de l'analgésie en utilisant un monitoring automatisé, et le suivi post-opératoire.

Chaque stagiaire exécute, à tour de rôle et sous contrôle, le geste montré par le chirurgien instructeur (en reprenant le principe « du compagnonnage » de l'enseignement de la chirurgie humaine). La rigueur des gestes et la mise en pratique des descriptions de l'anatomie chirurgicale permettant d'obtenir des résultats scientifiques plus fiables et reproductibles, la particularité de cet accompagnement consiste à offrir tout le temps nécessaire au stagiaire pour parfaire ses connaissances de manière interactive sans les contraintes habituelles liées aux exigences des protocoles en matière de durée.

Le rat a été choisi pour les similitudes de son réseau artério-veineux fémoral avec les micro-vaisseaux humains. Les actes présentés sur le rat sont les gestes de base de la chirurgie, transposables à toutes les espèces. Il s'agit notamment de la laparotomie, du contrôle périculaire, de la dénudation veineuse et artérielle, ou de la résection partielle ou totale d'organe. Sont aussi enseignés les principes des sutures vasculaires et digestives, puis de la fermeture des voies d'abord dans les « règles de l'art », afin de permettre une survie prolongée de l'animal dans des conditions de confort optimales.

Lors de cette formation, l'enseignement de techniques chirurgicales chez le petit animal comportera 2 parties : une partie chirurgie classique lors de laquelle 11 rats seront nécessaires (1 animal pour l'enseignant et 1 animal par stagiaire) et une partie microchirurgie lors de laquelle 2 rats seront nécessaires. Soit au total 13 rats par session pour 10 stagiaires. Nous prévoyons la réalisation de 3 sessions par an. Le nombre total d'animaux pour les 5 années est donc de 195 rats (39 par an pour 3 sessions). Les animaux sont hébergés dans des locaux agréés à raison de 5 rats maximum par cage en respectant la surface en fonction du poids des rats, avec un enrichissement sous forme de frises et tunnels.

Afin d'optimiser la formation, le nombre de gestes chirurgicaux réalisés sur chaque animal est important pour réduire le nombre d'animaux utilisés. Avant les procédures chirurgicales sur l'animal, les stagiaires effectueront des travaux pratiques sur tissu artificiel (plaque de silicone) et sur pieds de porc (alimentation grande distribution). En complément des gestes cités précédemment, des prélèvements d'organes (rein, rate, intestin) sont réalisés de manière à utiliser les organes isolément tout en assurant la survie de l'animal.

Le choix des instruments est adapté aux techniques de chirurgie « classique » micro-invasive afin d'éviter les lésions et délabrements superflus des tissus, sources de douleurs.

4358. Ces travaux pratiques (TP) répondent au contenu du Programme Pédagogique National du DUT Génie Biologique et complètent les enseignements pratiques en Physiologie et en Pharmacologie. Les travaux pratiques réalisés par les étudiants du DUT Génie Biologique option Analyses Biologiques et Biochimiques visent à les familiariser avec les pratiques de l'expérimentation animale indispensables à leur formation de futurs techniciens de laboratoire. En complément des travaux pratiques réalisés sur animal anesthésié et analgésié, les étudiants sont initiés à l'étude comportementale à l'aide de différents tests réalisés chez la souris. Ces tests constituent des outils utilisés en routine dans la modélisation de pathologies humaines pour évaluer les déficits moteurs, sensoriels, mnésiques et tester l'efficacité de traitements pharmacologiques. Les étudiants sont répartis en petits groupes de 3 ou 4 et réalisent cinq tests différents : trois tests moteurs (test de traction préhensile, pole test, footprint test), un test mnésique (alternance spontanée) et un test de résignation (test de la nage forcée). Pour l'ensemble des étudiants (74 au maximum). Le nombre d'animaux utilisés est de 200 souris/an soit 1000 souris/5 ans au maximum.

Les animaux utilisés pour la réalisation de ces tests comportementaux sont gardés en vie à la fin des séances et réutilisés dans le cadre de travaux pratiques d'anatomie en 1ère année de DUT Génie Biologique. Les étudiants apprennent à travailler sur des animaux vigiles en respectant les conditions strictes d'environnement, nécessaires à la réalisation de tests comportementaux (silence et calme pour la manipulation des animaux). Enfin, ils sont, à cette occasion, sensibilisés à la réglementation encadrant l'expérimentation animale.

4359. Données épidémiologiques :

Clostridium difficile est une bactérie anaérobie strict, sporulante, et première cause de diarrhée bactérienne chez l'adulte dans les pays développés et en particulier en France (> 24000 cas par an, dont 14 % de formes compliquées associées à 3% de mortalité). La contamination se fait à partir des spores, formes de résistance et hautement contagieuses de la bactérie, largement présentes dans l'environnement des services de soins hospitaliers. Les infections à *C. difficile* (ICD) peuvent évoluer sur un mode épidémique avec la survenue de cas groupés d'infection dans les services de soins puis dans l'ensemble de l'établissement voire sur tout un territoire de santé (exemple de l'épidémie qui a touché tout le Nord de la France en 2006), et représente un coût sanitaire important pour nos sociétés, en raison de l'augmentation des durées moyennes de séjours et du surcoût des soins associés, entre autres. Malgré des traitements antibiotiques généralement efficaces, les récurrences des infections à *C. difficile* sont fréquentes (environ 20%) et des résistances aux antibiotiques apparaissent. Physiopathologie : La bactérie produit des toxines qui sont majoritairement responsables des signes cliniques et des lésions observées dans l'intestin. Cependant, d'autres facteurs interviennent dans l'établissement de l'infection, au cours de la première étape qui correspond à la colonisation du tube digestif de l'hôte par *C. difficile*. Notre laboratoire s'est spécialisé dans l'étude de cette étape de colonisation, et travaille notamment sur le rôle de différentes protéines de surface dans cette étape importante d'implantation de la bactérie, les processus d'adaptation de la bactérie à l'hôte. Rationnel du projet proposé et perspectives : Du fait de la localisation intestinale de cette infection, le développement d'une réponse immunitaire dirigée contre des protéines de surface par une vaccination par voie muqueuse peut être une stratégie

efficace dans la prévention des infections à *C. difficile* (ICD). L'objectif de cette étude est de réaliser des essais de vaccination par voie orale, nasale ou rectale à l'aide de différents antigènes et adjuvants. Des immunisations avec des antigènes et des adjuvants à tester seront réalisées à trois reprises. A l'aide de différentes analyses réalisées sur des prélèvements nous pourrions mettre en évidence la réponse immunitaire induite par ces immunisations. Ces essais seront réalisés dans un modèle souris qui permet de mettre en évidence le développement d'une réponse immunitaire locale et systémique lors des immunisations. Toutes les procédures de ce projet ont été conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). Remplacement : plusieurs tests *in vitro* ont permis de démontrer au préalable l'intérêt des protéines étudiées comme adjuvants vaccinaux. L'étape de vérification de leur efficacité *in vivo* est exigible réglementairement avant toute nouvelle phase de développement clinique. Le recours à l'animal est indispensable pour étudier tous les aspects d'un processus infectieux et valider de nouveaux vaccins car il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* ou *in silico* capable de reproduire la complexité du processus immunitaire dans son intégralité. Réduction : les procédures seront réalisées en plusieurs phases visant à confirmer l'intérêt des molécules testées comme adjuvant vaccinal. Les phases suivantes (effet dose et comparaison à un adjuvant de référence) ne seront réalisées que si les résultats préliminaires ont confirmé l'intérêt de ces adjuvants. Dans le cas contraire, cette étude sera prématurément arrêtée. Par ailleurs, une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude afin d'avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Les groupes contrôles des animaux non traités ont été mutualisés aussi souvent que possible. Au total, un nombre maximal de 360 souris sera nécessaire pour l'ensemble des procédures de cette étude. Raffinement : les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux subissent le minimum de stress possible. En particulier, les animaux auront un accès direct et illimité à l'eau de boisson et à la nourriture. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques permettant de limiter la souffrance des animaux.

4360. La sclérose en plaques (SEP) est une maladie qui touche le système nerveux central (cerveau et moelle épinière) de l'adulte et qui conduit notamment à des douleurs chroniques et un handicap physique important. C'est une pathologie auto-immune : les défenses immunitaires s'attaquent à la myéline qui enrobe les fibres nerveuses. Elle est liée à une inflammation chronique du cerveau et de la moelle épinière (neuroinflammation) qui s'accompagne d'une démyélinisation. La SEP n'a pas de traitement mais des thérapeutiques comme les corticostéroïdes permettent de ralentir la progression de la maladie et de préserver la qualité de vie. Il existe un modèle valide de la SEP qui reproduit sa physiopathologie notamment une neuroinflammation du système nerveux, une démyélinisation progressive et des déficits moteurs. Il s'agit du modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). La crotoxine est une neurotoxine dérivée du venin de Crotale sud-américain (*Crotalus durissus terrificus*). Il a récemment été démontré que, à dose non toxique, elle a des effets anti-nociceptif, anti-inflammatoire et immuno-modulateur induisant une analgésie et une réduction des signes cliniques chez le modèle EAE induit par le peptide MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein). Notre hypothèse est que la crotoxine interfère avec le processus de démyélinisation, ralentissant la progression des signes cliniques. Notre objectif est d'évaluer dans un organisme entier (*in vivo*) le processus de démyélinisation et le potentiel thérapeutique de la crotoxine, compte tenu de la complexité des interactions entre système immunitaire et nerveux. Pour cela, nous suivrons quantitativement le processus de démyélinisation chez le modèle murin EAE en combinant l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) et la tomographie par émission de positons (TEP). D'une part, des techniques récentes d'IRM seront utilisées pour sonder la microstructure cérébrale et la concentration de myéline *in vivo* et *ex vivo* à des résolutions spatiales sans précédents. D'autre part, des radiotraceurs TEP spécifiques de la myéline et de l'activation gliale permettront de suivre spécifiquement la progression de la pathologie. Notre étude préclinique se déroulera en deux étapes. Tout d'abord, les processus de neuroinflammation et de démyélinisation progressive seront caractérisés chez le rongeur exprimant la pathologie SEP, sans traitement. Ces données permettront notamment de calibrer et valider nos outils d'imagerie quantitative. Dans un second temps, l'action thérapeutique de la crotoxine sera évaluée en double aveugle face à un placebo et un traitement de référence corticostéroïde. Notre étude a été conçue avec la volonté de respecter les règles éthiques, en particulier de réduire le nombre d'animaux (maximum 140 animaux issus d'un élevage autorisé) en effectuant des suivis dans le temps et en utilisant l'IRM et la TEP, deux techniques d'imagerie non-invasive. Les protocoles d'anesthésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Une visite quotidienne des animaux sera effectuée pour s'assurer du bien-être des animaux. Les animaux sont hébergés en groupes dans des cages enrichies de modules leur permettant d'améliorer leur condition de vie. Une surveillance particulière de l'état de santé des animaux sera également mise en place par l'application d'échelles cliniques journalières et de critères d'arrêts tout au long de l'étude. Dans le cas d'effet inattendu, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en œuvre les traitements appropriés ou de décider de l'euthanasie. Le projet a été soumis au comité d'éthique et l'ensemble de ses recommandations seront mises en œuvre.

4361. Les pathologies neuropsychiatriques sont très nombreuses et très variées, avec le plus souvent une composante d'anxiété. La prise en charge médicamenteuse de ces pathologies est importante. Le pharmacien dans son rôle d'accompagnement et de conseil aux patients sur la prise des médicaments, doit répondre aux demandes relatives aux effets des médicaments psychotropes. De plus, le pharmacien doit connaître les méthodes de mise en évidence des effets de ces médicaments, ainsi que les effets indésirables, comme l'atteinte de la vigilance et des réflexes. Dans le cadre des études de traitement des affections neurologiques et psychologiques, il est particulièrement important d'assimiler que l'action thérapeutique d'un médicament est la résultante de multiples effets sur l'organisme. Dans le cas des médicaments anxiolytiques, il est particulièrement important de connaître et savoir faire la différence entre une composante anxiolytique et une composante sédatrice. Ainsi, nous proposons des travaux pratiques utilisant des tests pharmacodynamiques de mise en évidence d'effets sur le comportement des animaux. Les tests

pharmacodynamiques choisis sont des techniques publiées chez le rongeur. Les 7 tests utilisés explorent les paramètres suivants: anxiété, comportement exploratoire, vigilance, réflexes, force musculaire, coordination motrice. Ils sont destinés à comprendre le rôle du médicament dans le circuit physiologique de ces comportements. Il est donc indispensable d'étudier l'effet global sur un organisme entier et non pas seulement sur un organe cible ou sur des tissus. Le nombre d'animaux est de 5 ou 6 par lot selon le test. Pour certains tests, la souris est son propre témoin, un seul lot est donc nécessaire, ce qui réduit le nombre d'animaux nécessaires. Par séance, 8 postes sont proposés aux étudiants ce qui nécessite 83 souris. Pour satisfaire au R de réduire, l'animal est utilisé 1 fois par semaine pendant 5 semaines. Il y a 3 séances par semaine donc 240 souris par an sont nécessaires pour les 200 étudiants, soit 1250 souris pour 5 ans. Le nombre d'animaux est de 1,3 souris par étudiants. Les animaux sont hébergés dans des locaux agréés à raison de 25 souris par cage en respectant la surface en fonction du poids des souris, avec un enrichissement sous forme de coton végétal, frisures et tunnel. Par ailleurs, afin de réduire le stress de l'animal, les travaux pratiques sont effectués dans l'obscurité. Il est également demandé aux étudiants de parler à voix basse et de diminuer au maximum tous les bruits qui pourraient perturber l'animal. A chaque séance deux médicaments de classes thérapeutiques différentes pour chaque test pharmacodynamique sont utilisés. Le médicament est administré par voie intrapéritonéale ou éventuellement par gavage s'il n'est pas très soluble. Les séances sont réalisées dans des salles d'expérimentation agréées par les services vétérinaires et les étudiants sont encadrés par du personnel compétent et réglementairement formé, 3 encadrants pour 16 étudiants.

4362. La maladie rénale chronique (MRC) est un problème de santé publique majeur qui touche environ 10 % de la population générale. Les maladies cardiovasculaires (CV) sont la première cause de morbi-mortalité au cours de la maladie rénale chronique (MRC). Pour exemple, le risque de survenue d'un événement CV grave chez un patient dialysé âgé de 25 ans est le même que celui d'un sujet de 80 ans, non insuffisant rénal dans la population générale. Malgré cela, les essais interventionnels visant à corriger les facteurs de risque CV classiques se sont majoritairement soldés par des échecs. Cette observation souligne l'importance de comprendre les mécanismes responsables de l'atteinte vasculaire chez ces patients afin de développer des approches thérapeutiques novatrices. Les mécanismes impliqués dans l'atteinte artérielle associée à la MRC sont mal connus. Au cours de la MRC, les patients sont exposés aux facteurs de risques cardiovasculaires traditionnels comme le diabète, la dyslipidémie, le surpoids, l'hypertension artérielle, le tabagisme mais également à des facteurs de risques liés à l'urémie incluant, entre autres, les modifications biochimiques des protéines par carbamylation. La carbamylation résulte de l'interaction entre l'acide isocyanique et les protéines. L'acide isocyanique provient principalement de la dégradation de l'urée en cyanate et ammoniac. La MRC, caractérisée par des taux élevés d'urée, est une situation pathologique favorisant la formation d'acide isocyanique et la carbamylation des protéines. Si la carbamylation des protéines des tissus cardiovasculaires au cours de la MRC est un fait bien démontré, il n'est pas établi s'il s'agit d'un simple marqueur de la maladie ou si la carbamylation des protéines modifie réellement la fonction et la structure du système artériel. L'objectif de ce projet est précisément de déterminer l'effet de la carbamylation des protéines sur la fonction et le remodelage des artères de gros et de petit calibre. L'étude vasculaire sera réalisée chez la souris C57BL6 âgée de 8-10 mois. Trois groupes d'animaux seront utilisés : 1 groupe contrôle (CTRL), 1 groupe ayant eu une ablation subtotale d'un rein (CKD) et 1 groupe traité au cyanate de sodium dans l'eau de boisson (CARB). Un minimum de 15 animaux (nombre minimum pour aboutir au seuil de significativité en réactivité vasculaire si il devait y avoir des différences) par groupe qui sera constitué au départ de 20 animaux afin de tenir compte d'une mortalité éventuelle. Au total 60 souris femelles seront donc nécessaires à la réalisation de cette étude. Les retombées attendues suite à la réalisation de ce projet sont de deux types

1. Fondamentales : ces recherches devraient permettre d'identifier un nouveau mécanisme d'atteinte vasculaire au cours de la maladie rénale chronique

2. La caractérisation de l'effet vasculaire de la carbamylation des protéines ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques et constitue une cible pharmacologique qui pourra être testée dans un second temps.

Nous faisons l'hypothèse que la carbamylation des protéines au cours de la maladie rénale chronique va modifier les propriétés fonctionnelles et le remodelage des artères de gros et de petit calibre. Cette étude se fera dans le respect de la règle des 3 R de manière à assurer autant que possible Nous mettons en œuvre la règle des trois R : Remplacer : Nous ne pouvons pas utiliser de modèle alternatif pour nos expérimentations. Réduire : Le nombre minimum d'animaux est utilisé afin d'obtenir des données exploitables d'un point de vue statistique. 20 par groupes car il faut 15 minimum pour constituer un groupe statistique (perte de 25 % liées à la procédure chirurgicale néphrectomie sub total) Raffiner : Les éventuelles modifications de rythme cardiaque et respiratoire seront observées pour évaluer la souffrance, la détresse et l'inconfort des animaux pendant l'intervention chirurgicale ou le traitement hypertenseur. La réponse nociceptive des animaux, régulièrement testée en cours d'intervention (toutes les 15 minutes), conduira si elle est positive, à la réadministration d'une dose d'agent anesthésique. Pour chaque souris, l'état général de l'animal est vérifié chaque jour par du personnel d'animalerie qualifié. Si des signes apparents de douleur apparaissent (animal prostré, isolé...) une dose d'analgésique est injectée en sous-cutanée. Si le poids diminue de 10% par rapport au poids de départ, l'animal est sacrifié. Les animaux sont maximum 5 par cage suivant leur taille et leur poids. Leur milieu est enrichi par des jeux (tuyau, maison). Ils ont accès à l'eau de boisson et à la nourriture ad libitum.

4363. Les autorités de santé vétérinaires demandent la démonstration de l'activité des lots commerciaux de chaque vaccin via des contrôles qualité qui ont pour finalité l'autorisation de mise sur le marché (AMM). De ce fait, la sécurité des vaccins peut être évaluée sur des modèles animaux.

Ce projet a pour objectif d'être en adéquation avec les exigences réglementaires de la Pharmacopée Européenne et des pays tiers destinataires dans la constitution du dossier d'AMM. Les tests ont pour but de déterminer l'activité des vaccins sur l'espèce cible. Evaluation dommages et avantages :

Les contrôles d'activité se basent sur le développement ou non de la pathologie après injection de l'agent infectieux (les animaux vaccinés sont protégés).

Les témoins non vaccinés montrent les symptômes liés à la pathologie testée qui peuvent induire une douleur.

Une légère augmentation du stress due à des prélèvements, aux injections et aux manipulations peut être observée chez les animaux.

Ces tests permettent la libération d'un nombre important de doses de vaccins améliorant considérablement la qualité sanitaire des élevages et la sécurité alimentaire des consommateurs.

Information sur les espèces utilisées :

Pour libérer le nombre nécessaire de doses de vaccins sur le marché de l'élevage nous utiliserons, au maximum, 995 porcs sur 5 ans.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays tiers destinataires du produit demandent des tests sur animaux pour l'AMM. Il n'est actuellement pas possible de les remplacer sans un changement de la réglementation de tous les pays.

Réduire : le nombre d'animaux utilisés est imposé par la réglementation des pays. La réduction du nombre est possible grâce à la mutualisation de groupes témoins.

Raffinement : Des points limites spécifiques aux pathologies sont déterminés pour les témoins non vaccinés. Le personnel vérifie l'évolution de l'état général et si les points limites spécifiques sont atteints. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort.

Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être.

Tous les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements adaptés du milieu ont été mis en place dans les hébergements. La Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

4364. Etude d'un nouvel agent d'imagerie TEMP dans un modèle de thromboembolisme chez la souris

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 (saignements) est important pour le traitement de l'AVC.

Le but de ce projet est d'évaluer in vivo un nouvel agent d'imagerie (RAM-1) dans deux modèles murin de thrombose (un localisé et un généralisé), en vue de pouvoir l'utiliser dans des essais cliniques chez l'homme. Ce projet permettra aussi de faire le suivi thérapeutique des agents anti-thrombotiques in vivo.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisé est 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). Le nombre d'animaux par groupe est de 10

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 pendant la durée de l'étude.
- Installation de l'animal sur une plaque chauffée à 38°C afin de lutter contre l'hypothermie.

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 60 souris.

4365. Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS) a une prévalence élevée chez les patients présentant une maladie rénale chronique (MRC). Il est également fréquent chez les patients atteints de maladies métaboliques. L'impact du SAOS sur le déclin de la fonction rénale chez des patients obèses diabétiques a été récemment montré sur une étude longitudinale.

Cependant, le retentissement rénal d'un SAOS chez des patients sans comorbidités reconnues comme facteurs de risque de MRC n'a jamais été démontré.

Par ailleurs, il existe très peu de données expérimentales sur l'impact rénal de l'hypoxie intermittente (HI). L'HI a été proposée comme composante majeure du SAOS, responsable des effets délétères du SAOS et est caractérisée par des séquences de désaturation-réoxygénation.

Afin d'étudier les conséquences de l'HI sur le rein, nous soumettrons des souris à l'HI pour observer son impact en conditions normales et chez des souris rendues insuffisantes rénales par un régime riche en adénine (modèle de MRC chez la souris). Pour l'ensemble de cette expérimentation nous utiliserons 38 souris.

Puis, nous explorerons les mécanismes potentiellement responsables d'un accroissement de l'insuffisance rénale chronique en s'intéressant au lien entre hypoxia inducible factor-1, facteur de transcription ayant un rôle délétère dans l'HI chronique et la siruine 3 (une déacétylase mitochondriale susceptible d'avoir un rôle majeur dans la MRC).

Il n'est pas possible de travailler sur des lignées cellulaires pour ce projet.

Tous les échantillons seront conservés de façon optimale dans le but de pérenniser notre matériel de travail. Les animaux seront hébergés par groupe dans une animalerie adaptée et autorisée, avec enrichissement du milieu de vie et l'accès à l'eau et à la nourriture sera surveillé. Les animaux des groupes contrôle de l'HI et du régime adénine seront nourris en pair fed. Un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé. Le protocole mis en œuvre entrainera un stress modéré lié au régime adénine, aux premiers jours d'HI, à deux séjours en cages métaboliques pour recueillir les urines ainsi qu'à la réalisation d'un test de tolérance à l'insuline. Un léger stress sera induit par des mesures répétées de pression artérielle de façon non invasive.

4366. Pour comprendre la fonction des milliers de gènes qui régulent la complexité du système nerveux, il est extrêmement important d'être en mesure de contrôler spatialement et temporellement l'expression d'un gène d'intérêt. Bien que les méthodes de transfert de gènes ciblées "in vitro" soient relativement bien développées, les méthodes actuelles in vivo dans le cerveau intact, sont réalisées principalement dans les neurones post-mitotiques par approche virale avec une forte limitation de la taille du gène transféré et avec des conséquences évidentes en raison de l'infection virale. Dans ce projet, nous allons combiner notre expertise de laboratoire en neurosciences de transfert de gènes et en électrochimie pour développer un nouveau procédé d'électroporation pour le transfert de gènes précis et rapide dans le cerveau de souris in vivo par stéréotaxie. Cette méthode devrait être très utile à la communauté des neurosciences. Ce projet utilisera 100 souris. Ce nombre est déterminé, dans le respect de la règle des 3R, pour pouvoir avoir des données statistiquement solides en faisant varier les paramètres qui conditionnent la qualité d'une transfection (longueur des électrodes, concentration d'ADN, temps d'expression) et leurs conséquences avec des études histologiques et électrophysiologiques. Dans le respect de la règle des 3R, la douleur générée par les gestes expérimentaux sera pris en charge par une médication adaptée, avec la définition de points limites pertinents dans le cadre de la surveillance des animaux expérimentés.

4367. La télomérase est une enzyme impliquée dans le vieillissement cellulaire et dans la cancérisation des cellules. Les télomères sont les terminaisons des chromosomes. A chaque division cellulaire, les télomères raccourcissent et au bout d'un certain nombre de divisions (40 environ), la cellule dégénère (sénescence) et meurt (apoptose). La télomérase permet la réparation des télomères et leur maintien à leur longueur initiale. Ainsi, les cellules qui expriment la télomérase ne sont pas restreintes à un nombre limité de divisions cellulaires (on parle « d'immortalité répllicative »). Chez l'homme, c'est le cas des cellules souches et de certaines cellules du système immunitaire (lymphocytes T en particulier), alors que les cellules différenciées (par exemple les fibroblastes (cellules de soutien dans l'organisme) n'expriment plus de télomérase. Par ailleurs, la télomérase est présente dans environ 80-90 % des cancers : elle est impliquée dans la multiplication des cellules cancéreuses et dans le développement et la progression des cancers. La télomérase est donc une enzyme clé dans l'organisme : son absence est la cause du vieillissement de nos cellules, sa présence est source d'immortalisation des cellules lors de la cancérisation. Ainsi, empêcher l'activité de la télomérase permet de rendre les cellules cancéreuses à nouveau mortelles : la tumeur va vieillir, puis mourir ou arrêter de se développer. Chez l'Homme, les premiers essais de vaccination thérapeutique contre la télomérase ont permis des cas de régression de cancers avancés sans effet secondaire visible sur le plan clinique. En effet, bloquer la télomérase, l'enzyme qui joue un rôle clef dans la division cellulaire, est particulièrement intéressant. En inhibant cette enzyme qui est présente dans 80 % des cellules cancéreuses, il serait possible d'inhiber la croissance des tumeurs. Des essais concluants allant dans ce sens ont d'ailleurs été menés concernant le mélanome et le cancer de la prostate.

L'objectif de ce projet est donc de tester un nouveau vaccin contre la télomérase afin de valider tout d'abord son immunogénicité (capacité à induire une réponse du système immunitaire), son innocuité, ainsi que la protection/modulation que ces effets pourraient apporter dans un modèle d'auto-immunité, vis-à-vis des cellules du système immunitaire qui produisent activement la télomérase. L'immunogénicité et l'innocuité ayant au préalable été démontrée chez le rongeur, nous aurons recours dans cette nouvelle phase du projet aux primates non humains (PNH) : en effet, l'étude de la mise en place d'une réponse immune nécessite aujourd'hui d'utiliser un organisme vivant entier dont le système immunitaire est suffisamment proche de celui de l'homme pour que les réponses vaccinales soient semblables à celles observées chez l'Homme. En l'état actuel des connaissances, le PNH est le seul modèle satisfaisant ces critères.

Le projet prévoit d'immuniser 3 PNH nés et élevés dans des élevages agréés. Ce nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : immunisations et prélèvements de sang sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte ces éventuels effets inattendus. Les animaux seront hébergés en groupe en hébergements contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule de l'établissement en charge du bien-être animal.

4368. La télomérase est une enzyme impliquée dans le vieillissement cellulaire et dans la cancérisation des cellules. Les télomères sont les terminaisons des chromosomes. A chaque division cellulaire, les télomères raccourcissent et au bout d'un certain nombre de divisions (40 environ), la cellule dégénère (sénescence) et meurt (apoptose). La télomérase permet la réparation des télomères et leur maintien à leur longueur initiale. Ainsi, les cellules qui expriment la télomérase ne sont pas restreintes à un nombre limité de divisions cellulaires (on parle « d'immortalité répllicative »). Chez l'homme, c'est le cas des cellules souches et de certaines

cellules du système immunitaire (lymphocytes T en particulier), alors que les cellules différenciées (par exemple les fibroblastes (cellules de soutien dans l'organisme) n'expriment plus de télomérase. Par ailleurs, la télomérase est présente dans environ 80-90 % des cancers : elle est impliquée dans la multiplication des cellules cancéreuses et dans le développement et la progression des cancers. La télomérase est donc une enzyme clé dans l'organisme : son absence est la cause du vieillissement de nos cellules, sa présence est source d'immortalisation des cellules lors de la cancérisation. Ainsi, empêcher l'activité de la télomérase permet de rendre les cellules cancéreuses à nouveau mortelles : la tumeur va vieillir, puis mourir ou arrêter de se développer. Chez l'Homme, les premiers essais de vaccination thérapeutique contre la télomérase ont permis des cas de régression de cancers avancés sans effet secondaire visible sur le plan clinique. En effet, bloquer la télomérase, l'enzyme qui joue un rôle clef dans la division cellulaire, est particulièrement intéressant. En inhibant cette enzyme qui est présente dans 80 % des cellules cancéreuses, il serait possible d'inhiber la croissance des tumeurs. Des essais concluants allant dans ce sens ont d'ailleurs été menés concernant le mélanome et le cancer de la prostate.

L'objectif de ce projet est donc de tester un nouveau vaccin contre la télomérase afin de valider tout d'abord son immunogénicité (capacité à induire une réponse du système immunitaire), son innocuité, ainsi que la protection/modulation que ces effets pourraient apporter dans un modèle d'auto-immunité, vis-à-vis des cellules du système immunitaire qui produisent activement la télomérase. L'immunogénicité et l'innocuité ayant au préalable été démontrée chez le rongeur, nous aurons recours dans cette nouvelle phase du projet aux primates non humains (PNH) : en effet, l'étude de la mise en place d'une réponse immune nécessite aujourd'hui d'utiliser un organisme vivant entier dont le système immunitaire est suffisamment proche de celui de l'homme pour que les réponses vaccinales soient semblables à celles observées chez l'Homme. En l'état actuel des connaissances, le PNH est le seul modèle satisfaisant ces critères.

Le projet prévoit d'immuniser 3 PNH nés et élevés dans des élevages agréés. Ce nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : immunisations et prélèvements de sang sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte ces éventuels effets inattendus. Les animaux seront hébergés en groupe en hébergements contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule de l'établissement en charge du bien-être animal.

4369. Les thérapies médicamenteuses conventionnelles exploitent les propriétés toxiques d'agents anticancéreux. Ils agissent principalement sur les cellules tumorales mais parfois sur les cellules saines, provoquant des effets secondaires responsables de l'arrêt des traitements chez les patients. Depuis quelques années, des stratégies de chimiothérapies ciblant les cellules tumorales ont émergé afin de véhiculer un agent anticancéreux vers la tumeur sous la forme d'un médicament non-toxique, puis de régénérer son activité toxique au niveau de la tumeur. De tels agents sont appelés vecteurs anticancéreux ou médicaments intelligents. Ainsi, nous créons des médicaments capables d'activer leur activité toxique uniquement après reconnaissance d'enzymes présentes dans le microenvironnement tumoral.

Notre laboratoire a développé plusieurs de ces molécules anticancéreuses programmées et nous les avons testés chez la souris selon une procédure déjà validée par le comité d'éthique et le ministère. Parmi ces molécules, l'une d'entre elles a démontré une très forte activité antitumorale sur un modèle de greffe tumorale dans des animaux ayant un système immunitaire réduit. Dans ce projet, nous souhaitons tester cette molécule sur une nouvelle souche de souris présentant un système immunitaire normal et qui développe spontanément des tumeurs mammaires et des métastases pulmonaires. Nous réaliserons ainsi deux études successives. Dans la première le traitement des souris avec notre vecteur anticancéreux commencera dès l'apparition des tumeurs mammaires afin d'évaluer son efficacité sur des tumeurs peu développées. Dans la seconde, le traitement sera initié lorsque les animaux auront déjà des métastases pulmonaires afin d'étudier la capacité de cette molécule à détruire les métastases en même temps que la tumeur primaire.

Comme mentionné plus haut, le vecteur anticancéreux a déjà été évalué sur des animaux. Les données recueillies lors de ces précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales. Par une approche statistique (Snedecor et Cochran), la « Règle des 3 R » établie par Russel et Burch, a été prise en compte afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude convaincante qui ne nécessitera pas de reproduire ces expériences (réduire). Les conditions d'expérimentation et d'élevage sont optimisées au mieux (groupe de 3 à 4 souris, nid, jouets etc...) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales (raffiner). Compte tenu des avancées de nos travaux, nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives in vitro pour étudier l'efficacité d'un potentiel médicament anticancéreux (remplacer).

Ainsi, ce projet sera composé d'une seule procédure expérimentale en 2 études successives. Dans la première, nous comparerons l'efficacité antitumorale de trois concentrations différentes de notre vecteur anticancéreux à celle du médicament d'origine non modifié, utilisé au maximum de sa dose tolérée. Dans la seconde étude, la même procédure expérimentale sera mise en œuvre mais les traitements anticancéreux seront initiés plus tardivement pour laisser le temps à des métastases pulmonaires de se former. Nous étudierons ainsi l'activité antimétastatique du vecteur anticancéreux (une concentration choisie parmi les trois testés précédemment) et du médicament conventionnel. Au total, ce projet nécessitera 160 souris (100 pour la première étude et 60 pour la seconde).

4370. La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative progressive qui est caractérisée dans ses stades précoces par des altérations de la mémoire en relation avec des déficits de la fonctionnalité synaptique dans l'hippocampe, une zone cérébrale clé de la mémoire.

La MA s'accompagne d'une composante neuroinflammatoire majeure qui joue un rôle crucial dans la progression de la pathologie. Cette composante neuroinflammatoire est portée par l'activation de cellules gliales cérébrales, astrocytes et microglie, qui produisent de nombreux facteurs inflammatoires. Parmi ces facteurs, la prostaglandine E2 (PGE2) altère spécifiquement le fonctionnement du réseau neuronal formé entre les cellules granulaires du gyrus dentelé et les neurones pyramidaux CA3 de l'hippocampe.

Nous proposons l'hypothèse que l'altération fonctionnelle de ce réseau spécifique se traduit par un déficit de mémoire et qu'il est possible de reverser ce déficit par une approche interventionniste visant à bloquer la voie de signalisation cellulaire activée par PGE2. Pour ce faire nous testerons la mémoire épisodique, une forme de mémoire altérée chez les patients atteints de la MA et modélisée chez des modèles murins de cette pathologie.

Le projet général combine une analyse électrophysiologique, immunohistochimique et une analyse comportementale (le projet général fait l'objet de deux saisines). La partie du projet décrite ici utilise des souris témoins et un modèle murin de la MA. Les conséquences comportementales de la manipulation pharmacologique et/ou virale de la voie de signalisation activée par PGE2 sera réalisée sur les deux souches de souris. Un total de 135 animaux sera utilisé pour ce projet.

Dans le respect de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) les mesures suivantes seront prises: (1) Le même animal sera utilisé pour différents protocoles électrophysiologiques afin de réduire le nombre total (réduction); (2) Les protocoles comportementaux seront suivis par des analyses immunohistochimiques afin de réduire et d'optimiser l'utilisation des animaux (réduction et raffinement) et (3) La souris constitue un modèle éprouvé pour l'étude du fonctionnement de réseaux neuronaux et permet de corrélérer ce fonctionnement à des propriétés cognitives. A ce jour, les seuls modèles animaux de la MA sont des modèles murins transgéniques et l'analyse comportementale nécessite de travailler sur l'animal entier (remplacement). Le bien-être de l'animal sera pris en compte tout au long de sa vie et toute douleur générée par la chirurgie stéréotaxique sera soulagée par des molécules adaptées.

4371. L'hémophilie est une maladie hémorragique constitutionnelle causée par un déficit en facteur VIII (FVIII) ou en facteur IX (FIX) de la coagulation. La principale complication clinique est l'arthropathie hémophilique, principalement localisée aux genoux, et causée par la répétition des saignements articulaires (hémarthrose). Le traitement actuel est basé sur la perfusion de facteur de la coagulation manquant.

Actuellement, les deux principales stratégies pour améliorer le traitement de l'hémophilie sont l'amélioration des performances des médicaments injectés (demi-vie, activité spécifique) et la thérapie génique. De nouvelles stratégies innovantes qui ne corrigent pas le déficit en FVIII/FIX mais qui agissent plutôt sur l'équilibre de la coagulation sont en cours de développement. Ces nouvelles stratégies thérapeutiques ont comme objectif d'améliorer la capacité coagulante des patients, sans modifier les taux de FVIII ou FIX et de traiter ou prévenir les accidents hémorragiques. Nous voulons maintenant tester l'effet direct de nouvelles molécules sur l'évolution de l'arthropathie hémophilique, phénomène loin d'être élucidé.

Objectifs scientifiques et/ou perspectives d'application médicale :

L'arthropathie est la conséquence de saignements successifs des articulations chez le patient hémophile. Le degré d'arthropathie chez un patient hémophile est un des critères principaux permettant de juger de l'efficacité du traitement. Le projet actuel vise à mettre au point un modèle d'arthropathie du genou chez la souris hémophile pour tester ces nouvelles molécules intervenant sur l'équilibre de la coagulation. Le protocole consiste à effectuer un traumatisme sur un genou de souris hémophiles A et B par la ponction à l'aide d'une aiguille. Ce système de traumatisme contrôlé et reproductible a été développé et validé lors d'un projet préliminaire en 2014. Ce traumatisme entraîne une hémarthrose dans 95% des cas. Par analogie avec la survenue d'une hémarthrose chez le patient hémophile, un traitement antalgique sera effectué pendant toute la durée du protocole par un analogue de la morphine inhibant ainsi toute douleur chez l'animal. Afin de reproduire les saignements répétés des patients hémophiles, trois traumatismes à 8 jours d'intervalles sont prévus afin d'induire une arthropathie, le protocole concernera 30 souris et sera mené sur un an.

Pour l'évaluation clinique des traumatismes, nous testerons chaque souris par la mesure du temps de course de l'animal sur un cylindre présentant une vitesse de rotation modulable. Un tel modèle a déjà été décrit par une équipe américaine. En collaborant avec cette équipe, depuis trois ans, nous travaillons pour mettre au point un modèle reproductible et standardisé d'arthropathie hémophilique dans des conditions « éthiquement » améliorées et adaptées aux traumatismes, en utilisant des antalgiques et des méthodes d'évaluation peu traumatisantes.

Ce projet respectera la règle des 3R :

- en évitant les répétitions inutiles et en réduisant le nombre de souris
- nos travaux préliminaires ont permis d'optimiser les méthodes qui seront utilisées, Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques fondamentaux notamment dans le domaine de l'arthropathie.
- le modèle in-vivo reste le seul modèle adapté pour un tel projet.

L'arthropathie hémophilique étant de nos jours la principale complication clinique du patient hémophile, la mise au point d'un modèle animal reproduisant cette arthropathie pourra permettre de tester et de comparer différentes stratégies thérapeutiques en se basant sur l'évolution de l'arthropathie, en l'absence de traitement d'une part et sous traitement de référence (molécules commerciales de FVIII et FIX) et en utilisant de nouvelles molécules dirigées contre les protéines inhibitrices de la coagulation,

d'autre part. Les critères d'évaluation proposés sont cliniques, biologiques, histologiques, et radiologiques, associés à un score clinique permettant de juger du degré de gravité de l'hématome induit par la ponction, qui est souvent associée à l'hémarthrose.

4372. Le tube digestif est un milieu complexe dans lequel coexistent différents types de cellules de l'hôte, une grande diversité de microorganismes et des antigènes alimentaires. Le microbiote intestinal est notamment composé de plusieurs milliards de microorganismes qui sont étonnamment bien tolérés par l'hôte. Dans certaines circonstances, la tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal est rompue, conduisant à une réponse immune et à une inflammation intestinale ou extra-intestinale. C'est notamment le cas dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) comme la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). La rupture de cet équilibre s'illustre par une dysbiose au niveau du microbiote du tube digestif, c'est à dire une modification des quantités et des proportions des microorganismes.

Le but du projet est de comprendre les interactions entre les cellules du système immunitaire et le microbiote en situation basale et au cours de l'inflammation. C'est un projet ambitieux qui s'étalera sur 5 ans et nécessitera un total maximum de 240 souris par année, conventionnelles ou mutées pour 4 gènes (dont 2 responsables dans le développement du système immunitaire, et 2 gènes impliqués dans la détection du microbiote).

Afin de précisément définir les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'inflammation et le rôle du microbiote dans ces maladies trois types de modèles d'inflammation intestinale seront utilisés. En parallèle dans ces différents modèles, le microbiote en lui-même pourra être modifié par différents moyens : traitements antibiotique, antifongique, et gavage par des souches fongiques ou bactériennes. De plus, le régime alimentaire étant connu pour impacter la composition du microbiote, nous utiliserons un modèle de régime alimentaire altéré (ex : riche en graisse ou en sucre). L'essentiel des prélèvements (sang, tissus, contenus intestinaux) sera fait post mortem à l'exception des fèces.

Afin d'appliquer au mieux la règle des 3R, nous avons prévu dans nos projets scientifiques d'utiliser des expérimentations in vitro sur des lignées cellulaires ou des cellules primaires préalablement à l'utilisation d'animaux, ce qui permet d'en réduire le nombre. Nos groupes de souris seront réduits à 10 animaux. Ce nombre d'animaux est calculé au plus juste en fonction de notre expérience antérieure pour garantir la qualité statistique des données. L'étude de ces écosystèmes impose le modèle animal pour valider les hypothèses soulevées grâce aux résultats des expérimentations in vitro. Il n'existe pas aujourd'hui de modèle in vitro récapitulant tous les paramètres du tube digestif. Les animaux sont hébergés dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (litière changée régulièrement, eau et nourriture à volonté, température et hygrométrie régulées,...). Nous avons veillé à enrichir le milieu de vie par l'ajout de feuille de cellulose dans les cages et d'un abri prévu à cet effet. Le suivi attentif et régulier des animaux sera réalisé afin de minimiser autant que possible la souffrance éventuelle des animaux.

4373. Le tube digestif est un milieu complexe dans lequel coexistent différents types de cellules de l'hôte, une grande diversité de microorganismes et des antigènes alimentaires. Le microbiote intestinal est notamment composé de plusieurs milliards de microorganismes qui sont étonnamment bien tolérés par l'hôte. Dans certaines circonstances, la tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal est rompue, conduisant à une réponse immune et à une inflammation intestinale ou extra-intestinale. C'est notamment le cas dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) comme la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). La rupture de cet équilibre s'illustre par une dysbiose au niveau du microbiote du tube digestif, c'est à dire une modification des quantités et des proportions des microorganismes.

Le but du projet est de comprendre les interactions entre les cellules du système immunitaire et le microbiote en situation basale et au cours de l'inflammation. C'est un projet ambitieux qui s'étalera sur 5 ans et nécessitera un total maximum de 240 souris par année, conventionnelles ou mutées pour 4 gènes (dont 2 responsables dans le développement du système immunitaire, et 2 gènes impliqués dans la détection du microbiote).

Afin de précisément définir les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'inflammation et le rôle du microbiote dans ces maladies trois types de modèles d'inflammation intestinale seront utilisés. En parallèle dans ces différents modèles, le microbiote en lui-même pourra être modifié par différents moyens : traitements antibiotique, antifongique, et gavage par des souches fongiques ou bactériennes. De plus, le régime alimentaire étant connu pour impacter la composition du microbiote, nous utiliserons un modèle de régime alimentaire altéré (ex : riche en graisse ou en sucre). L'essentiel des prélèvements (sang, tissus, contenus intestinaux) sera fait post mortem à l'exception des fèces.

Afin d'appliquer au mieux la règle des 3R, nous avons prévu dans nos projets scientifiques d'utiliser des expérimentations in vitro sur des lignées cellulaires ou des cellules primaires préalablement à l'utilisation d'animaux, ce qui permet d'en réduire le nombre. Nos groupes de souris seront réduits à 10 animaux. Ce nombre d'animaux est calculé au plus juste en fonction de notre expérience antérieure pour garantir la qualité statistique des données. L'étude de ces écosystèmes impose le modèle animal pour valider les hypothèses soulevées grâce aux résultats des expérimentations in vitro. Il n'existe pas aujourd'hui de modèle in vitro récapitulant tous les paramètres du tube digestif. Les animaux sont hébergés dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (litière changée régulièrement, eau et nourriture à volonté, température et hygrométrie régulées,...). Nous avons veillé à enrichir le milieu de vie par l'ajout de feuille de cellulose dans les cages et d'un abri prévu à cet effet. Le suivi attentif et régulier des animaux sera réalisé afin de minimiser autant que possible la souffrance éventuelle des animaux.

4374. Contexte :

Le projet consiste à produire du sérum polyclonal en tant que réactif de laboratoire utilisé pour la réalisation de tests analytiques. Il s'agit d'administrer un produit immunogène au lapin afin qu'il produise des anticorps dirigés contre le produit injecté.

Objectifs :

La production de sérum polyclonal chez le lapin permet la production ou le renouvellement de réactifs de laboratoire. Ceux-ci sont nécessaires pour la réalisation d'analyses dans le cadre d'études réglementaires. A l'heure actuelle il est impossible de les produire in vitro. Or ces réactifs sont indispensables pour développer des techniques analytiques fiables permettant de remplacer des tests in vivo.

Avantages et dommages :

Seuls du stress et de l'inconfort liés à l'administration de l'antigène, aux prélèvements, et aux légères manifestations cliniques de courte durée peuvent apparaître.

Pour limiter les contraintes engendrées par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés.

Ces études permettent in fine d'obtenir des tests de laboratoires fiables.

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur les demandes des laboratoires internes, l'historique des recherches et les projets de Recherche et Développement, un maximum de 20 lapins sera utilisé sur 5 ans.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : Un recueil d'information, lorsqu'il est disponible, est apporté par la bibliographie pour rechercher des alternatives à l'utilisation animale. Néanmoins, le recours à l'animal est à l'heure actuelle indispensable pour la production de certains réactifs. De plus, certains tests analytiques à partir des réactifs produits sur lapins permettent de ne pas avoir recours à des tests in vivo.

Réduction : Les effectifs sont évalués au plus juste (anticipation des projets de Recherche et Développement et définition des besoins de laboratoires) de façon à limiter le nombre d'études.

Raffinement : Dans ce projet, aucune douleur ou souffrance n'est attendue. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort. Une anesthésie et analgésie de l'animal peuvent être envisagées lors de certains actes (administration de l'antigène, prélèvements).

Une attention particulière est apportée au choix de l'adjuvant. Ce choix est basé sur une revue bibliographique et/ou les informations fournies par le fabricant afin de sélectionner un produit ne générant pas de réaction inflammatoire disproportionnée chez le lapin.

Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être.

Tous les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements adaptés au milieu sont mis en place. La Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie des animaux.

4375. Le projet a pour but de d'évaluer l'efficacité, chez des espèces alternatives, d'un produit destiné aux chiens ou chevaux.

Pour qu'un médicament soit commercialisé, il faut démontrer que celui-ci apporte un effet bénéfique sur l'animal pour une ou plusieurs pathologies. Les études sur espèce cible sont exigées par la réglementation (Pharmacopée européenne et réglementation des pays destinataires). Néanmoins lors des phases en amont, le recours à des modèles alternatifs permet de limiter l'utilisation de l'espèce cible (chiens ou chevaux).

Pour démontrer l'efficacité d'un produit contre un agent pathogène, la mise au point d'un modèle d'épreuve est indispensable. L'épreuve correspond à l'administration de l'agent pathogène pour reproduire, de manière expérimentale, la pathologie la plus fidèlement possible à la réalité.

Une étape intermédiaire dans les études d'efficacité est de développer des tests analytiques ainsi que de produire et caractériser l'agent pathogène. Pour certains pathogènes il est nécessaire d'utiliser un système in vivo. L'objectif final d'une étude est de déterminer le ou les effet(s) bénéfique(s) du produit lors de l'épreuve.

Avantages et dommages :

Le développement de la maladie chez l'animal peut donner lieu à des signes cliniques provoquant une gêne ou une douleur. L'administration du pathogène et les prélèvements peuvent également générer du stress et une gêne. Pour limiter les contraintes induites par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés. De plus, des points limites spécifiques à chaque pathologie sont appliqués.

La finalité de ces études est de permettre le développement de produits efficaces contre des maladies données et de réduire l'impact des maladies infectieuses.

Informations sur les espèces utilisées :

Pour répondre aux objectifs du projet, un maximum de 100 porcs, 2200 hamsters et 1700 souris pourront être utilisés sur 5 ans.

Ces études sont des modèles alternatifs pour les études sur chien et cheval. Le choix des espèces est basé sur la connaissance de la pathologie concernée (études antérieures et bibliographie) et les référentiels réglementaires applicables.

Mise en œuvre des 3Rs : **Remplacement :** Lorsque cela est possible, une première étape dans le projet de développement d'un produit consiste à tester in vitro différents candidats. Ceci permet une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés. Un recueil d'informations est aussi apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

Réduction : Le nombre minimum d'animaux à inclure est très souvent une exigence réglementaire. En amont, lors des phases recherche, les effectifs sont évalués au plus juste (analyse statistique, historique, définition des objectifs...) de façon à minimiser le nombre d'animaux utilisés en limitant le risque d'études non conclusives.

De plus, dans certaines études d'efficacité, plusieurs produits sont testés en parallèle de manière à mutualiser le groupe témoin ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement :

Des points limites spécifiques à chaque pathologie ont été définis afin de limiter le plus précocement possible la douleur des animaux. Ces critères sont en constante évolution de manière à ce qu'ils reflètent au mieux l'expérience du terrain et l'état actuel

des connaissances vétérinaires. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort. Une anesthésie et une analgésie peuvent être réalisées lors de certains actes si nécessaire. Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être.

Tous les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements adaptés au milieu sont mis en place. La Structure du Bien Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie des animaux.

4376. Le projet consiste à immuniser des rongeurs (espèces modèles) avec un produit vétérinaire dans le but de :

- Evaluer l'efficacité d'un produit par suivi de la réponse immune chez l'animal.
- Produire, chez la souris, des anticorps monoclonaux ou du sérum polyclonal en tant que réactifs de laboratoire dans le cadre d'études réglementaires

Les études destinées à évaluer la réponse immune suite à l'administration d'un produit sont exigées par la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays destinataires. De plus, certains réactifs de laboratoire ne peuvent être produits que sur animaux. Ils sont nécessaires pour la réalisation d'analyses dans le cadre d'études réglementaires.

Avantages et dommages :

Les dommages engendrés par les procédures peuvent être le stress et la gêne liés aux administrations de produits et à la réalisation de prélèvements.

Pour limiter la douleur potentielle ou stress engendrés par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés.

La finalité de ce projet est de mettre sur le marché des médicaments vétérinaires présentant un risque minimal et de permettre aux propriétaires de disposer des meilleurs traitements pour leurs animaux tout en réduisant l'impact des maladies infectieuses sur les populations.

Informations sur les espèces utilisées :

Pour répondre aux objectifs du projet, un maximum de 50 hamsters, 150 cobayes et 500 souris pourront être utilisés sur 5 ans.

Les études sur rongeurs sont des modèles alternatifs pour les produits destinés aux chiens, chats et chevaux. Les chiffres sont donc basés sur l'expérience (études antérieures et bibliographie) et les référentiels du modèle canin, félin et équin.

Mise en œuvre des 3Rs : Remplacement : Lorsque cela est possible, une première étape dans le projet de développement d'un produit consiste à tester in vitro différents candidats. Ceci permet une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés. Une série de tests analytiques permet de garantir un certain niveau de sécurité pour les animaux recevant le produit. Un recueil d'informations est aussi apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

Réduction : Le nombre minimum d'animaux à inclure est très souvent une exigence réglementaire. En amont, lors des phases recherche, les effectifs sont évalués au plus juste (analyse statistique, historique, définition des objectifs...) de façon à minimiser le nombre d'animaux utilisés en limitant le risque d'études non conclusives.

Raffinement : Dans ce projet, aucune douleur ou souffrance n'est attendue. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort. Une anesthésie de l'animal est réalisée lors de certains prélèvements.

Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être.

Tous les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements adaptés au milieu sont mis en place. La Structure du Bien Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie des animaux.

4377. Le projet a pour but d'évaluer l'innocuité d'un produit vétérinaire sur des espèces alternatives (cobayes, souris et oiseaux) ainsi que sur son environnement (animaux en contact, environnement).

Ces études d'innocuité sont exigées par la Pharmacopée Européenne, les réglementations des pays destinataires et la Directive Européenne dans le cadre des 3Rs (Remplacer, Réduire, Raffiner) vis-à-vis de l'utilisation de modèles animaux. En effet, l'utilisation de modèles alternatifs permet d'éviter le recours aux espèces cibles (chien, chat, cheval) afin de garantir une commercialisation de vaccins sûrs pour l'animal et son environnement.

Avantages et dommages :

Les dommages engendrés par les procédures peuvent être le stress et la gêne liés aux administrations de produits.

Pour limiter les contraintes engendrées par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés.

Ces études permettent le soin des animaux avec des produits présentant un risque minimal. Elles permettent aussi aux propriétaires de disposer des meilleurs traitements pour leurs animaux tout en réduisant l'impact des maladies infectieuses sur les populations.

Informations sur les espèces utilisées :

Pour répondre aux objectifs du projet, un maximum de 500 cobayes, 375 souris et 120 oiseaux pourront être utilisés sur 5 ans.

Les études sur rongeurs sont des modèles alternatifs pour les produits destinés aux chiens, chats et chevaux. Les chiffres sont donc basés sur l'expérience (études antérieures et bibliographie) et les référentiels du modèle canin, félin et équin.

L'utilisation d'oiseaux dans certaines études d'innocuité est une exigence réglementaire (espèce sensible au produit investigué).

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : Lorsque cela est possible, une première étape dans le projet de développement d'un produit consiste à tester in vitro différents candidats. Ceci permet une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés. Une série de tests analytiques permet de garantir un certain niveau de sécurité pour les animaux recevant le produit. Un recueil d'informations est aussi apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

Réduction : Le nombre minimum d'animaux à inclure est très souvent une exigence réglementaire. En amont, lors des phases recherche, les effectifs sont évalués au plus juste (analyse statistique, historique, définition des objectifs...) de façon à minimiser le nombre d'animaux utilisés en limitant le risque d'études non conclusives.

Raffinement : Dans ce projet, aucune douleur ou souffrance n'est attendue. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort.

Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être.

Tous les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements adaptés au milieu sont mis en place. La Structure du Bien Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie des animaux.

4378. Le projet a pour but d'évaluer l'innocuité d'un produit sur le chat ainsi que sur son environnement (animaux en contact, environnement, humains).

Pour qu'un produit soit commercialisé, il faut démontrer que celui-ci ne présente aucun risque pour l'animal, ni pour son environnement. Les études sont réalisées sur l'espèce cible du produit développé (le chat) ce qui permet de s'approcher au maximum des conditions réelles d'utilisation.

Ces différentes études sont exigées par la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays destinataires. Celles-ci consistent à vérifier si des réactions générales ou locales au point d'injection se déclarent après l'administration du produit chez le chat ainsi qu'à vérifier l'impact environnemental du produit.

Avantages et dommages :

Les dommages induits par les procédures peuvent être le stress et la gêne liés aux administrations de produits et aux prélèvements répétés ainsi que, dans de très rares cas, l'hébergement individuel. Pour limiter les contraintes engendrées par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés.

La finalité de ces études est de permettre le soin des animaux avec des produits présentant un risque minimal et de disposer des meilleurs traitements pour leurs animaux.

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur l'historique des produits testés, sur les exigences réglementaires et les projets de Recherche et Développement à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé, au plus, à 300 chats.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : Lorsque cela est possible, une première étape dans le projet de développement d'un produit thérapeutique consiste à tester in vitro différents candidats. Ceci permet une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés. Une série de tests analytiques permet de garantir un certain niveau de sécurité pour les animaux recevant le produit. Un recueil d'informations est aussi apporté par la bibliographie lorsque cela est possible

Réduction : Le nombre minimum d'animaux à inclure est très souvent une exigence réglementaire. En amont, lors des phases recherche, les effectifs sont évalués au plus juste (analyse statistique, historique, définition des objectifs...) de façon à limiter les études non conclusives.

Raffinement : Dans ce projet, aucune douleur ou souffrance n'est attendue. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort. Une anesthésie de l'animal peut être envisagée lors de certains actes, ainsi qu'une alternance des zones ou site de prélèvements lorsque cela est possible.

Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être. Dans la majorité des cas, les animaux sont hébergés en groupe. Des enrichissements adaptés au milieu sont mis en place.

La Structure du Bien Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

4379. Le processus inflammatoire qui accompagne tout acte chirurgical est à l'origine de la douleur post-opératoire. Cette douleur est la conséquence des stimulations produites au niveau du site chirurgical. Elle s'accompagne parfois d'une sensibilité accrue appelée hyperalgésie. L'hyperalgésie peut être primaire ou secondaire. L'hyperalgésie primaire, qui résulte des phénomènes de sensibilisation périphérique, siège au niveau du foyer inflammatoire alors que l'hyperalgésie secondaire, qui reflète une hyperexcitabilité centrale, s'exerce en dehors de cette zone.

Pour évaluer les propriétés analgésiques de candidats médicaments, il est nécessaire de disposer de modèles expérimentaux spécifiques et prédictifs. Pour cela, le rat, sur lequel on réalise une intervention chirurgicale sous anesthésie constitue un excellent modèle d'étude. Notre projet consiste à évaluer l'activité pharmacologique analgésique de candidats médicaments administrés avant, pendant ou après une intervention chirurgicale sous anesthésie générale chez le rat, visant à induire une lésion cutanéomusculaire et/ou ostéo-articulaire au niveau de la patte. La mesure d'un score de douleur lorsque l'animal est réveillé et la nécessité ou non d'administrer un traitement complémentaire anti-douleur (ex : morphiniques) sont des critères d'évaluation de l'activité analgésique recherchée.

Il n'existe pas de méthode alternative permettant d'évaluer cette activité et susceptible de remplacer ces modèles expérimentaux in vivo. Dans le but de réduire le nombre d'animaux nécessaires dans ce projet, les candidats médicaments testés sur ces modèles devront avoir déjà montré une activité semblable dans des modèles de douleur n'induisant pas d'hypersensibilité à la douleur. De plus, l'effectif par groupe peut être réduit par :

- une sélection préalable des animaux dans le but de constituer des groupes plus homogènes,
- une évaluation quantitative de la douleur permettant de réduire la variabilité des mesures.

L'anesthésie générale mise en œuvre lors de l'intervention chirurgicale, l'administration d'un analgésique supplémentaire au delà d'un seuil de douleur prédéfini et une durée d'observation post-opératoire réduite n'excédant pas 48 heures sont autant d'éléments permettant de raffiner ces modèles. Le raffinement des modèles s'effectue également au travers des conditions d'hébergement qui sont améliorées par des dispositifs d'enrichissement (tunnel par exemple).

La démonstration d'une activité analgésique dans l'un de ces modèles conduirait à poursuivre le développement clinique du candidat médicament testé avec pour bénéfice une réduction des traitements complémentaires anti-douleur (ex : opiacés, anti-inflammatoires, ...) classiquement administrés en milieu chirurgical.

Le nombre d'animaux nécessaire pour ce projet est calculé en fonction de la variabilité observée de chaque mesure et de l'effet pharmacologique minimum attendu des produits testés. Un effectif maximum de 2880 rats sur 5 ans (soit en moyenne 576 rats par an) est nécessaire pour la conduite de ce programme.

4380. Le rôle central des plaquettes sanguines est d'arrêter les saignements suite à une lésion vasculaire, un processus physiologique que l'on appelle l'hémostase primaire. Un processus similaire peut survenir dans un vaisseau malade et entraîner la formation d'un thrombus qui peut être responsable de maladies ischémiques graves comme l'accident vasculaire cérébral ou l'infarctus du myocarde, qui représentent la première cause de mortalité dans le monde. Suite à une lésion vasculaire, les plaquettes adhèrent, s'activent et agrègent pour former un clou plaquettaire ou thrombus. Un certain nombre de plaquettes deviennent « pro-coagulantes », c'est-à-dire qu'elles exposent des phospholipides chargées négativement qui permettent notamment le recrutement de facteurs permettant de stimuler la coagulation. Ceci favorise la génération de thrombine et la formation d'un réseau de fibrine qui stabilise l'agrégat formé.

Afin de reproduire la formation d'un thrombus dans un vaisseau malade, différents modèles de thrombose seront utilisés chez la souris. Ces modèles sont caractérisés depuis de nombreuses années au sein du laboratoire. Il est particulièrement important d'utiliser différents modèles afin de reproduire les conditions retrouvées dans différents lits vasculaires (composition du sous-endothélium, écoulement du sang) qui peuvent grandement influencer les processus hémostatiques et thrombotiques. Le rôle des plaquettes procoagulantes sera également étudié en utilisant un modèle de thrombose *in vitro*. Ce système permettra d'évaluer l'importance des plaquettes procoagulantes lors la formation du thrombus et réciproquement l'influence du thrombus et de sa contraction sur l'apparition des plaquettes procoagulantes. L'influence de la contraction du thrombus sur les plaquettes procoagulantes sera mise en évidence en comparant des plaquettes de souris contrôles avec des plaquettes de souris présentant un défaut de contraction du cytosquelette (MYH9).

A ce jour, le rôle des plaquettes pro-coagulantes et la cinétique d'apparition de ces plaquettes restent mal compris. Le but central de ce projet est d'évaluer et de caractériser *in vitro* et *in vivo* la fonction des plaquettes pro-coagulantes. Réduction

Le modèle de thrombose *in vitro* utilise un système de perfusion consistant à perfuser du sang dans des chambres microfluidiques de très petite taille. Cette procédure expérimentale a été préalablement mise au point et de premiers résultats ont été générés en utilisant du sang humain issu d'un don de sang. L'application de ces conditions expérimentales ne nécessitera pas de mise au point supplémentaire lors des expériences nécessitant du sang de souris génétiquement modifiées, permettant de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires. Raffinement

Les études *in vivo* de ce projet de recherche utilisent des techniques déjà mises au point et maîtrisées au sein de notre laboratoire, afin d'améliorer au maximum le bien-être des animaux.

Remplacement

Les expériences *ex vivo* en perfusion seront réalisées en utilisant du sang humain issu de donateurs volontaires. Des expériences complémentaires nécessitant du sang murin seront nécessaires pour compléter les résultats obtenus. Un total de 320 souris non modifié génétiquement sera nécessaire pour mener à bien ce projet. Afin de comprendre l'importance de la contraction du thrombus sur les plaquettes pro-coagulantes, nous utiliserons 32 souris déficientes pour le gène du MYH9.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 352 souris.

4381. Le projet a pour but d'évaluer l'efficacité d'un produit destiné au chat par le suivi de la réponse immune.

Les études d'efficacité par suivi de la réponse immune sont exigées par la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays destinataires

Aux exigences réglementaires s'ajoute un objectif scientifique qui permet une meilleure compréhension du système immunitaire de l'espèce cible.

Avantages et dommages :

Les dommages induits par les procédures peuvent être le stress et la gêne liés aux administrations de produits et aux prélèvements répétés. Pour limiter la douleur potentielle ou le stress engendrés par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés.

La finalité de ces études est de permettre le développement de produits efficaces pour réduire l'impact des maladies infectieuses sur les populations.

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur l'historique du produit testé, les exigences réglementaires et des projets de Recherche et Développement à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé au plus à 100 chats.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : Lorsque cela est possible une première étape dans le projet de développement d'un produit thérapeutique consiste à tester *in vitro* différents candidats. Ceci permet une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre de candidats à

tester in vivo donc le nombre d'animaux utilisés. Un recueil d'informations est aussi apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

Réduction : Pour les études réglementaires, le nombre d'animaux est fixé par les textes. En amont, lors des phases recherche, les effectifs sont évalués au plus juste (analyse statistique, historique, définition des objectifs...) de façon à minimiser le nombre de chats utilisés en limitant le risque d'études non conclusives.

Raffinement : Dans ce projet, aucune douleur ou souffrance n'est attendue. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort. Une anesthésie de l'animal peut être réalisée lors de certains actes.

Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être. Tous les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements adaptés au milieu sont mis en place.

La Structure du Bien Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

4382. Notre groupe travaille sur la mise au point d'approches de thérapies cellulaires pour réparer ou régénérer le cartilage détruit suite à des pathologies ostéo-articulaires ou des accidents. La régénération du cartilage consiste à injecter de manière locale ou systémique des cellules « médicaments » qui vont libérer des facteurs trophiques capables de stimuler les cellules endogènes du cartilage à proliférer et synthétiser la matrice cartilagineuse.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer les capacités thérapeutiques de cellules souches mésenchymateuses (ou de molécules thérapeutiques identifiées à partir de ces cellules) pour diminuer les signes d'arthrose. Deux modèles sont utilisés : un modèle d'arthrose inflammatoire et un modèle d'arthrose post-traumatique. Un troisième modèle d'ingénierie tissulaire applicable à l'arthrose repose sur l'injection de cellules souches mésenchymateuses associées à un biomatériau et une molécule chondroinductrice pour évaluer leur capacité à former du cartilage in vivo. Le projet repose sur l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses d'origine humaine ou murine ; il est démontré que les cellules humaines ne sont pas rejetées instantanément et possèdent un effet thérapeutique chez la souris. La voie d'injection des cellules ou des molécules thérapeutiques est locale (intra-articulaire) ou systémique (intraveineuse) pour comparer l'efficacité du traitement en fonction de la voie d'injection.

Un des contrôles de développement de l'arthrose sera le suivi des animaux en cours d'expérimentation (1 fois par semaine après J26) et après euthanasie (J42) par μ CT (microtomographe)

Nous avons déterminé un programme de travail sur les 5 ans à venir qui tient compte des avancées attendues de notre projet de recherche. Cependant, le nombre d'animaux concerné par chaque procédure est certainement maximal (maximum envisagé : 3700) et sera revu à la baisse si besoin pour tenir compte de la règle des 3R.

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

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

- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement. Les protocoles utilisés étant de degré de sévérité légère au maximum, les animaux ne présentent pas de signes de souffrance habituellement. Cependant, dans le cas où certains signes seraient observés, un traitement oral avec du paracétamol serait mis en place

- Remplacement : Afin de proposer une thérapie cellulaire chez l'homme, il est important de démontrer l'efficacité thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses humaines et murines dans un modèle pré-clinique pertinent chez l'animal. Des modèles in vitro ne suffisent pas seuls à évaluer l'efficacité de ces cellules. Plusieurs sous-types d'arthrose existent chez l'homme, il est donc nécessaire de mettre en place des modèles in vivo reproduisant le plus fidèlement possible les atteintes humaines.

4383. Projet : (suite projet #4625 validé par le CEEACD le 27/04/2016 et autorisé par le MENESR le 23/05/2016)

Les glucocorticoïdes (GC) et leurs analogues synthétiques font partie des médicaments les plus prescrits de par leurs propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives. Cependant leurs effets secondaires métaboliques demeurent l'un des éléments limitant de leur utilisation à long terme, puisqu'ils peuvent entraîner le développement d'un diabète cortico-induit ainsi qu'une prise de poids associé à une lipodystrophie (caractérisée par une expansion du tissu adipeux viscérale (TAV) au détriment du tissu adipeux sous-cutané. Dans ce contexte, nous avons récemment montré que les GC provoquent l'émergence sélective dans le TAV de macrophages entraînant des perturbations métaboliques telles que l'insulino-résistance induite par les GC.

Cependant, d'autres cellules immunitaires, les polynucléaires neutrophiles (PNN), pourraient constituer des marqueurs clés et des acteurs très précoces de l'insulino-résistance au cours de l'obésité. En effet il a été montré que l'infiltration du tissu adipeux par les PNN précède le recrutement de macrophages ou de lymphocytes dans le TAV lors d'un régime hyperlipidique. Ils sont capables d'induire la polarisation des macrophages vers un profil pro-inflammatoire. Enfin, les GC sont bien connus pour moduler les fonctions des PNN, en augmentant notamment leur survie, ce qui pourrait contribuer à leur persistance inappropriée au niveau du tissu adipeux.

Ce projet vise à étudier, in vivo, le rôle des PNN dans les perturbations métaboliques induites par les stéroïdes. Grâce à des modèles murins, nous explorerons i) l'infiltration des tissus adipeux par les neutrophiles au cours de la lipodystrophie induite par les GC. ii) Nous analyserons l'implication des PNN et de la protéine élastase (sécrétée par les PNNs) dans la survenue des troubles métaboliques induits par les GC dans nos modèles murins. Cette étude des mécanismes à l'origine des désordres métaboliques sera également menée dans un contexte pathologique obésogène

L'étude de ces PNN mettra en évidence de nouvelles pistes physiopathologiques afin de pallier les effets secondaires chez les patients traités par des GC ou atteints de syndrome de Cushing (caractérisé par une élévation des GC endogènes).

Type d'animaux : Modèles murins d'invalidation du récepteur des GC spécifiquement dans le tissu adipeux de façon constitutive et inductible (souris transgéniques).

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 840 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : La pierre angulaire de ce projet est l'utilisation de souris invalidées pour le gène du récepteur des GC, il ne nous est pas possible de remplacer ces animaux. Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement du projet. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides.

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 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.

4384. Projet :(suite projets Ce5/2011/021 validé le 10/05/2011 et 02216.02 validé le 23/01/2015).

Chez l'homme, les retards de croissance, qu'ils apparaissent chez le fœtus ou juste après la naissance, sont associés avec une plus grande fréquence de maladies cardio-métaboliques. Notamment, des perturbations de la balance énergétique entraînant des variations de poids corporel à l'âge adulte, et une résistance à l'insuline sont fréquemment observées.

Nos données préalables chez la souris montrent que la sur- ou sous-nutrition en période postnatale précoce (durant la lactation) est suffisante pour programmer de manière permanente la sécrétion de l'hormone de croissance chez l'adulte, dont la dérégulation semble être un facteur aggravant dans l'émergence des pathologies citées ci-dessus. Nombre des organes impliqués se développent durant les périodes anté- et post-natales.

Le protocole soumis ici est conçu pour déterminer chez la souris i) l'impact sur la régulation de la prise alimentaire à l'âge adulte de cette sur-/ sous-nutrition en période postnatale précoce sur des souriceaux nés avec un retard de croissance intra-utérin ainsi que la contribution d'une éventuelle dérégulation de la prise alimentaire dans les variations de poids corporel induite par le RCIU suivi de différents régimes de lactation, ii) dans quelle mesure la nutrition périnatale affecte la maturation des axes endocriniens iii) quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets à long terme tels que la résistance à l'insuline. Etant donnée les mécanismes en jeu, impliquant une physiopathologie complexe, et les dérégulations sur le long terme, l'approche in vivo est obligatoire.

Type d'animaux : Etant donné le rôle du placenta dans les mécanismes physiopathologiques étudiés, nous avons choisi le modèle murin (mammifère placentaire), qui est petit et de bonne productivité, ce qui réduit le nombre de femelles génitrice nécessaire.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 836 souris pour une durée maximale de 5 ans répartis comme suit : 212 fondateurs et de 624 F1 (336 mâles et 288 femelles). Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Le nombre minimal de souris utilisées lors de ce protocole est calculé afin d'obtenir la puissance statistique nécessaire à la mise en évidence des mécanismes physiopathologiques recherchés. Le nombre de souris, ainsi que les timings de traitement et des mesures diverses ont pu être calculés grâce à la profonde connaissance de ce modèle murin qu'a le laboratoire, ainsi que des mécanismes en jeu. Ainsi, nous étudierons une dose unique de restriction protéique afin d'induire le RCIU et nous mesurons les effets à des âges clefs mis en évidence lors de nos précédentes études.

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, en limitant la douleur et le stress. 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.

4385. Projet : (suite projet Ce5-2012-006 validé le 22/03/2012)

Nos données préalables chez la souris montrent que la sur-/sous-nutrition durant la lactation est suffisante pour programmer la sécrétion de l'hormone de croissance (GH). Ceci programme la croissance postnatale de l'organisme mais influe également sur l'émergence des pathologies adultes. En effet, la dérégulation de la GH semble être un facteur aggravant dans l'émergence des pathologies cardio-métaboliques (résistance à l'insuline, obésité, hypertension artérielle). Nos données indiquent que cette programmation est réalisée par les hormones nutritionnelles (IGF-I, Leptine) qui stimulent le développement des neurones GHRH, principal stimulateur de la sécrétion de la GH. En outre, nous avons mis en évidence l'installation d'une résistance des neurones GHRH à la stimulation par les hormones nutritionnelles recueillie à partir de souriceaux restreints. Néanmoins, les neurones GHRH sont une population très hétérogène. De plus, nos données indiquent également que la sensibilité à la nutrition durant la lactation présente un fort caractère dimorphique. Le protocole soumis est conçu pour déterminer chez la souris i) Est-ce que les neurones GHRH issus de souriceaux mâles ou femelles présentent la même sensibilité à la stimulation de leur développement par les hormones nutritionnelles, ii) Est-ce que la restriction induit une résistance des neurones GHRH aux hormones nutritionnelles chez les mâles et les femelles de manière similaire, iii) Quelle est la sensibilité aux hormones nutritionnelles des divers sous-populations de neurones GHRH en développement.

Type d'animaux : souris *mus musculus*GHRH-GFP

Nombre d'animaux : ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 1572 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides.

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, en limitant la douleur et le stress. 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.

4386. Projet :

La maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique sont des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Leur incidence et prévalence sont fortes et en augmentation en Europe et aux Etats-Unis. IL n'existe actuellement aucun traitement curatif et les traitements disponibles sont inconstamment efficaces et suspensifs dans le meilleur des cas. D'autre part, nous ne disposons pas de biomarqueurs pronostic fiable pour prédire l'évolution de la maladie, ce qui serait pourtant extrêmement utile pour adapter les traitements de manière anticipé sans attendre la survenue des manifestations cliniques. En se basant sur nos découvertes récentes mettant en évidence le rôle d'une bactérie de la flore intestinale sur la stimulation de cellules immunitaires anti-inflammatoires, notre objectif est d'évaluer l'efficacité d'une approche thérapeutique nouvelle. A terme, ce projet devrait permettre de mieux comprendre la physiopathologie des MICI, d'identifier de nouveaux facteurs pronostic et de nouvelles pistes thérapeutiques.

Type d'animaux : Modèle murin transgénique NSG-Ab DR4. Cette lignée est déficiente pour l'expression des gènes *Prkdc*, de *Il2rg* (lié à X), et du CMH de classe II et exprime le gène DR4 de l'antigène leucocytaire humain.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 1560 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides.

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, en limitant la douleur et le stress. 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.

4387. Projet : (suite projet #5297 validé le 12/06/2016)

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

Au laboratoire, nous avons choisi un modèle cellulaire de cancers colorectaux provenant de patients atteints de cancer et nous avons développé à partir de cette lignée dite parentale, un modèle de cellules devenues résistantes à 5-fluorouracile mimant ainsi la résistance observée chez les patients en clinique.

Ces différents modèles cellulaires (sensibles ou résistants au 5-FU) seront injectés à des souris ayant perdu leur système immunitaire. Ces cellules ainsi greffées, vont développer une tumeur à l'emplacement de l'injection.

Nous avons choisi le modèle des souris nude car c'est le modèle le plus adapté pour ce genre d'étude, ces souris étant immuno-déficiente, elles ne rejettent pas les cellules humaines qui leur seront injectées. Dans ce cas la réaction du « non-soi » ne peut avoir lieu. Ces souris recevront quelques jours après l'injection des cellules tumorales, des traitements de médicament (Aflibercept, Bevacizumab ou 5-FU) et nous suivrons l'inhibition de la pousse tumorale au cours du temps et ainsi évaluer l'efficacité de ce médicament.

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

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

Au total, ce protocole nécessitera un effectif de 170 souris.

Grâce à ce projet, nous allons obtenir des informations importantes à propos de la sensibilité des tumeurs selon différents niveaux d'invasion. Nous espérons mettre en évidence que le traitement par l'Aflibercept permettra une diminution de la croissance tumorale plus importante que le traitement par le Bevacizumab dans les 2 modèles étudiés (petites et grosses tumeurs).

Type d'animaux : souris NMRI-Nude Foxn1

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 170 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Les études in-vitro déjà menées ont permis de sélectionner/affiner au mieux les conditions expérimentales du projet afin de réduire au maximum le nombre d'animaux impliqués dans cette étude. En effet, cette étude ne peut être conduite qu'in vivo car celle-ci prend en considération la tumeur, son environnement ainsi que l'ensemble des interactions mise en jeu. Ainsi, il n'y a pas de modèles alternatifs au modèle animal permettant de recréer l'ensemble des acteurs impliqués dans le développement tumoral et l'action des traitements proposés.

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

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress. 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.

4388. Les infections par le parasite *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) sont responsables de diarrhées chez tous les mammifères dont l'importance dépend du statut immunitaire de l'hôte. Ainsi les animaux nouveau-nés et les enfants de moins de 5 ans sont très sensibles à ces infections mais parviennent à éliminer le parasite dès que leur système immunitaire devient plus robuste. En effet, la sensibilité des individus à l'infection par *C. parvum* pendant cette période peut s'expliquer par l'immaturation de l'intestin et du système immunitaire qui lui est associé. Des perturbations au cours de cette période, telles qu'un stress, sont capables d'induire des altérations à long terme de l'équilibre intestinal, associées à une susceptibilité à développer à l'âge adulte des pathologies intestinales. L'objectif de ce projet est de tester si une infection par *C. parvum* pendant cette période néonatale conduit chez des animaux plus âgés ayant récupéré de l'infection, à des modifications de l'équilibre intestinal. Pour tester cette hypothèse le modèle souris sera utilisé. En effet, les souriceaux développent l'infection et éliminent naturellement le parasite en 3 semaines comme le font les jeunes ruminants. Des souriceaux âgés de 3 jours sont infectés par voie orale avec le parasite, puis 50 jours après, alors que les souris auront déjà éliminé *C. parvum* depuis 30 jours environ, des analyses immunologiques et transcriptomiques seront réalisées. Par la suite, les animaux seront infectés par un autre pathogène : le parasite nématode, *Heligmosomoides polygyrus bakeri* ou la bactérie *Salmonella Enteritidis*.

Ce projet sera conduit sur 5 ans. Le nombre d'animaux est estimé pour les 5 ans à 500 souriceaux qui deviendront adultes et 100 mères souris adultes (femelles allaitantes) soit environ 600 animaux.

Les expérimentations seront menées à bien selon le principe des 3R.

Raffiner : Pour que les mères souris s'occupent bien de leurs petits en début d'expérimentation, du coton et une boîte à œuf sont introduits dans chaque cage, ainsi la mère fabrique un nid pour sa progéniture.

Réduire : Pour pallier la perte éventuelle de souriceaux due à l'état de stress qui caractérise les souris, plus d'animaux seront mis en reproduction. Les animaux surnuméraires sont toujours utilisés et peuvent être introduits dans un autre protocole. Par ailleurs, pour les deux modèles d'infection, le sexe de l'animal est compatible avec une « réduction » du nombre d'animaux puisque pour une meilleure installation du parasite *Heligmosomoides polygyrus bakeri* les mâles seront utilisés et pour *Salmonella Enteritidis*, les femelles sont plus adaptées.

Remplacer : De l'infectiologie ne peut être réalisée sans expérimentation animale. En effet, les études in vitro ne tiennent pas compte de la complexité des coopérations cellulaires et de l'environnement intestinal (flore bactérienne et antigènes alimentaires).

4389. Le syndrome aigu d'irradiation est défini comme un ensemble de symptômes cliniques complexes résultant d'une exposition externe de l'organisme à de fortes doses d'irradiation (accidents ou malveillance). Une telle irradiation s'accompagne d'une atteinte multi-organes. L'atteinte de la sphère digestive et notamment de l'intestin entraîne l'apparition rapide de nausées, de vomissements, de diarrhées/déshydratation et de douleurs abdominales, symptômes cliniques caractéristiques du développement d'un syndrome gastro-intestinal (SGI). Aucune mesure médicale ne permet de traiter efficacement les patients en souffrant et qui en meurent. Ainsi, la prise en charge médicale représente un réel challenge thérapeutique. Ce travail vise à développer des stratégies innovantes pour la prise en charge des dommages induits au niveau de l'intestin par des irradiations à de fortes doses. Nous souhaitons tester l'efficacité des exosomes issus de cellules stromales mésenchymateuses humaines (CSM). Les exosomes sont des vésicules extracellulaires (40-100nm), libérées par de multiples cellules, dont les CSM, qui permettent, de par leur contenu biologique, des communications cellulaires réciproques. Ce travail sera réalisé sur des souris immuno-déficientes permettant la greffe de cellules humaines sans rejet. Les souris seront irradiées sur tout le corps pour reproduire une atteinte multi-organes du syndrome aigu d'irradiation. Les exosomes seront injectés par voie sanguine comme cela est effectué en clinique. Ce travail, qui nécessitera l'utilisation de 1982 animaux, s'articulera en 4 parties : 1. Le développement du modèle de SGI (208 souris), 2. la caractérisation de la dose efficace d'exosomes (128 souris), 3. la démonstration d'une efficacité thérapeutique des exosomes (594 souris) et 4. la potentialisation de l'efficacité thérapeutique des CSM (1052 souris). Un suivi particulier des animaux sera assuré afin de limiter le plus possible la douleur et la souffrance des animaux. Dans le cadre d'un transfert clinique, l'avantage dans l'administration d'exosomes issus des CSM par rapport au CSM elles-mêmes serait multiple. Elle permettrait 1. de réduire les risques secondaires liés à l'implantation des CSM (réaction inflammatoire, cancer), 2. de potentialiser l'efficacité thérapeutique en modifiant le contenu des exosomes par conditionnement préalable des CSM, et 3. de créer des banques d'exosomes (production à grande échelle).

4390. Cette formation réglementaire est destinée former les chercheurs aux actes chirurgicaux afin de leur donner les connaissances nécessaires et les gestes techniques pour éviter la souffrance et le stress de l'animal à son réveil et de réduire le nombre d'animaux en évitant leur mort imprévue.

Cette formation explique et montre les différentes étapes d'une intervention chirurgicale chez le gros animal. Il s'agit de l'anesthésie en incluant la préparation de l'animal, de la maîtrise et du contrôle des paramètres opératoires et la conduite de l'analgésie en utilisant une surveillance systématique pendant et après l'intervention chirurgicale: savoir mener une intervention du début à la fin. Cette formation pratique sur le gros animal durera une journée et s'intègre dans la FORMATION PARTICULIERE à la CHIRURGIE EXPERIMENTALE comprenant des travaux pratiques par simulation et des sessions sur modèles animaux (gros animal et petit animal). Nous organiserons 1 à 3 sessions par an (en fonction des inscriptions). Ce travail pratique sera réalisé sur 1 seul porc (enseignement retransmis par vidéo) lors d'une procédure sans réveil. Soit un total de 3 porcs par an et donc de 15 porcs pour les 5 ans du projet.

Des documents types seront distribués aux étudiants afin de leur permettre d'établir pour chaque future procédure expérimentale le plan de procédure chirurgicale détaillée (matériel, traitements analgésiques et anesthésiques), les points limites per et post-opératoires (qui doivent conduire à l'arrêt de la procédure ou à la mise à mort de l'animal afin de minimiser sa souffrance) et monitoring postopératoire du bien-être de l'animal.

Le porc a été choisi comme modèle de la chirurgie du gros animal (module 2) car il est devenu l'animal de taille humaine de référence. En effet, il est très proche de l'homme d'un point de vue physiologique et anatomique (taille, structure et morphométrie des organes). De nombreuses constantes biologiques sont très similaires à l'humain. De plus la recherche appliquée sur les dispositifs médicaux peut être conduite avec les prototypes à taille humaine en utilisant les mêmes procédures et instruments que chez l'humain.

Les actes présentés sont les gestes de bases de la chirurgie, transposables à toutes les espèces. Il s'agit de l'intubation trachéale, laparotomie, du contrôle de l'hémostase (comment arrêter un saignement), du contrôle périculaire, de la dénudation veineuse et artérielle. Sont aussi enseignés les principes des sutures vasculaires parenchymateuses et digestives, puis de la fermeture des voies d'abord (dans les « règles de l'art ») afin de permettre une survie prolongée de l'animal dans des conditions de confort optimales.

Des travaux pratiques sur tissu artificiel (plaque de silicone) et sur pieds de porc (alimentation grande distribution) seront réalisés avant les séances d'enseignement des procédures chirurgicales. Ainsi les étudiants pourront s'entraîner à acquérir les gestes

pratiques comme la réalisation d'un champ opératoire stérile, la manipulation des instruments en condition stérile, la suture cutanée et la suture profonde.

Toutefois l'apprentissage des procédures chirurgicales complexes, comme par exemple la résection partielle d'organe (hépatectomie partielle par exemple), ne peut être simulée de façon réaliste et didactique. Afin de minimiser le nombre d'animal nécessaire, nous avons développé dans cet enseignement des méthodes de vidéo-retransmission des gestes chirurgicaux. En effet, l'apprentissage des gestes chirurgicaux chez le gros animal sera effectué sur un seul animal pour les 10 étudiants. L'ensemble des procédures chirurgicales sera filmé et retransmis en direct sur grand écran dans la salle opératoire. Par groupe de 2, les étudiants effectueront deux procédures chirurgicales (un aide et un opérateur pour chaque procédure). Chaque stagiaire exécute, à tour de rôle et sous contrôle d'un chirurgien enseignant, le geste technique (en reprenant le principe « du compagnonnage » de l'enseignement de la chirurgie humaine).

Ainsi chaque étudiant pourra observer l'ensemble des procédures et être évalué sur sa pratique chirurgicale sans avoir besoin d'augmenter le nombre d'animaux.

Le choix des instruments est adapté aux techniques de chirurgie « classique », micro-invasive afin d'éviter les lésions et délabrements superflus des tissus, sources de douleurs. Cette démarche est calquée sur la chirurgie de l'homme par la rigueur des gestes et la mise en pratique des descriptions de l'anatomie chirurgicale afin d'obtenir des résultats scientifiques plus fiables et reproductibles.

La particularité de cet accompagnement est d'offrir tout le temps nécessaire au stagiaire pour parfaire ses connaissances de manière interactive sans les contraintes habituelles liées au respect et aux exigences des protocoles en matière de durée

En retour, les stagiaires que nous avons formés ont été très satisfaits de la formation reçue. Ils ont notamment déclaré avoir acquis plus d'expérience et plus de confiance pour mener à bien un nouveau protocole.

4391. Les salmonelles sont responsables, suivant leur hôte, de pathologies très différentes allant de la fièvre typhoïde à la gastroentérite en passant par le portage asymptomatique. La principale source de contamination humaine dans les pays industrialisés est les volailles contaminées. Chez les volailles, la majorité des sérotypes de salmonelles (Typhimurium et Enteritidis) induisent un portage asymptomatique qui correspond à une infection systémique transitoire et à une persistance de la bactérie dans les caeca accompagnée d'une forte excrétion fécale sans trouble pour l'animal.

Les mécanismes à l'origine de ce portage sont très mal connus. Ils font intervenir de nombreux facteurs : bactériens (facteurs de virulence), de l'hôte (facteurs immunitaires), de la flore intestinale et de l'environnement. L'existence de recontaminations entre animaux est connue et nous avons montré récemment qu'elles jouaient un rôle capital dans l'établissement du portage.

Pour démontrer cela nous avons développé deux modèles d'infection des poussins par Salmonella : un modèle en isolateur où les recontaminations entre animaux sont très faibles et un modèle plus conventionnel, en cage, où les recontaminations entre animaux sont fortes. Les premiers résultats suggèrent que le portage de Salmonella est lié à la présence d'animaux super-excréteurs qui recontaminent les autres animaux plus résistants à une première infection.

L'objectif de ce projet est d'identifier les facteurs bactériens, de l'hôte et de sa flore intestinale qui sont responsables de l'infection et du statut "super-excréteur" ou "résistant" des poussins suite à une première inoculation. Nous étudierons également le rôle de ces facteurs dans la transmission entre animaux. Le projet inclut des infections en isolateur et des infections en cage. Dans ces deux modèles, des animaux jeunes (entre 1 j et 7 jours) sont inoculés avec une suspension de salmonelles. La colonisation est contrôlée par des prélèvements réguliers et individuels de fientes. L'inoculation préalable de vaccins ou de drogues capables de moduler les facteurs de l'hôte ou le microbiote intestinal est prévue. En fin d'étude les animaux sont autopsiés et des dénombrements bactériens sont réalisés dans les organes cibles (rate, foie, caeca, intestin). Des prélèvements de sang sont possible dans certaines expériences. En fonction du modèle et du paramètre étudié, la durée d'expérimentation varie entre 3 et 35 jours post-inoculation. Quatre expériences par an sont planifiées afin de tester les différents paramètres qui pourraient être impliqués et les actions de contrôle. L'étude du portage asymptomatique de Salmonella chez les volailles n'induit pas de douleur chez l'animal supérieure à l'introduction d'une aiguille.

La règle des trois R est appliquée :

Remplacement : l'étude du portage bactérien ne peut se faire que par le biais d'étude in vivo sur animaux cible. Raffinement : en fonction des avancées techniques, il pourra être envisagé de suivre la colonisation des organes par les techniques d'imagerie in vivo.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé, et dans la mesure du possible, une caractérisation préalable des gènes bactériens et de la réponse de l'hôte est réalisée in vitro sur lignée cellulaire pour permettre la sélection des gènes les plus pertinents.

Le nombre de poussins à utiliser par expérimentation est fixé en fonction du test statistique. Dans les cinq années à venir, le projet utilisera environ 2280 poussins.

4392. Les vaccins, étant des produits biologiques, il est obligatoire de s'assurer de la qualité de chaque lot avant sa commercialisation ainsi que de sa stabilité dans le temps.

Pour des raisons réglementaires, certains contrôles de vaccins s'effectuent sur des modèles cellulaires simiens. L'utilisation de ces modèles est inscrite dans les dossiers d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) et fait partie intégrante des recommandations OMS et de la Pharmacopée européenne.

L'espèce de référence utilisée pour la production de cellules Vero primaires, indispensables pour le contrôle de lots de vaccins, est le primate non humain (PNH) Vervet (*Chlorocebus aethiops*). Les cellules Vero sont une lignée cellulaire isolée à partir de cellules épithéliales de rein de Vervet.

Ce projet a donc pour objectif de perfuser les deux reins d'un singe Vervet issu d'élevage agréé avec de la trypsine citratée puis de les prélever de manière aseptique.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacer

Ce projet permettra, à terme, de remplacer le modèle animal par un modèle in vitro, c'est-à-dire de ne plus utiliser de PNH pour les contrôles de vaccins.

Réduire

Le projet sur cinq ans prévoit au maximum 130 singes qui proviendront d'un élevage agréé. Dans un souci de réduction, le nombre d'animaux sera réduit au minimum nécessaire à l'obtention de la quantité de cellules Vero primaires demandée.

Raffiner

Les animaux sont hébergés pendant une durée de quelques heures, la plus courte possible, dans des cages contenant des dispositifs d'enrichissement dans des locaux appropriés, conformes aux standards réglementaires et ils sont suivis par un personnel spécifiquement formé.

La procédure chirurgicale a été raffinée pour éviter, de façon préventive, toute souffrance animale (anesthésie profonde, analgésie avec un puissant morphinique, absence de réveil).

4393. Le but de ce projet est d'entraîner une équipe de recherche à la manipulation du furet. En effet, une formation en vue d'apprendre la zootechnie de l'espèce permettra par la suite à l'équipe de mettre en place des protocoles expérimentaux de recherche sur cette espèce. Un groupe restreint de 4 personnes (2 chercheurs et 2 techniciens) suivront cette formation afin de limiter le stress des animaux.

Le personnel technique de l'animalerie participera également à la formation afin de se familiariser avec l'espèce et sa manipulation.

La formation sera dispensée par le vétérinaire référent avec l'aide d'un vétérinaire manipulant régulièrement les furets, familier avec les procédures à perfectionner et particulièrement les prélèvements sanguins.

Dans ce projet, différentes voies d'injection et prélèvements seront réalisés chez le furet. Les gestes techniques à acquérir sont :

- Les injections
- Le prélèvement sanguin
- Le lavage nasal
- Le prélèvement terminal de sang. Un prélèvement du sang total sera réalisé sous anesthésie avant la mise à mort des animaux, puis les organes seront collectés. En effet, le sang et les organes ainsi obtenus permettront de mettre au point les dosages qui seront réalisés dans les protocoles de recherche ultérieurs.

La formation aux injections et prélèvements durera une semaine puis les animaux seront conservés pour que l'équipe de recherche puisse s'exercer à la contention et préhension des animaux en autonomie et puisse de nouveau s'exercer aux injections et prélèvements. Deux semaines après la formation, une autre journée de formation avec le vétérinaire référent sera organisée pour la réalisation du prélèvement terminal de sang, la mise à mort des animaux et le prélèvement des organes.

Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : Ici, l'animal ne peut pas être remplacé car le but du projet est d'améliorer leur manipulation.

Raffinement : Lors de la réalisation des gestes techniques, les animaux seront anesthésiés afin de limiter la douleur et le stress au moment de l'expérimentation. Les animaux seront hébergés en groupe dans un environnement enrichi et seront observés 3 fois par jour par le personnel de l'animalerie.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour maîtriser les gestes techniques tout en étant efficace. Le projet comportera 5 furets qui serviront pour les procédures. Un animal sera utilisé pour la démonstration des gestes techniques par le vétérinaire formateur et un animal par personne à former seront utilisés. Un animal sur les 5 sera remplacé.

4394. Le cancer des Voies Aéro Digestives Supérieure (VADS) est le 4ème cancer chez l'homme en France et son taux de mortalité est le plus élevé en Europe. La France est le 3ème pays le plus touché dans le monde. Les localisations les plus fréquentes concernent la cavité orale dont l'incidence est une des plus élevée.

Ces cancers sont traités dans la grande majorité des cas par une association chirurgie et radiothérapie qui se traduit par des séquelles au niveau des dents, de la mâchoire et de la gencive. Les conséquences fonctionnelles (mastication, déglutition, alimentation, parole), esthétique, psychologique et sociale diminuent de manière significative la qualité de vie de ces patients.

Les deux tiers de ces tumeurs sont diagnostiquées à un stade avancé avec extension locale vers la mandibule nécessitant une exérèse chirurgicale pouvant être traumatique. La radiothérapie induit également des complications et des séquelles à la fois dentaires et osseuses. L'ostéoradionécrose (ORN) mandibulaire est la complication post-radique la plus grave d'entre elles car met en jeu le pronostic vital et il n'existe aucun traitement curatif. Les lésions induites par la chirurgie et la radiothérapie réduisent considérablement les chances de réhabilitation dentaire et osseuse et donc de traitement de l'ORN.

L'objectif de ce projet est de tester des procédures thérapeutiques utilisant des matériaux biocompatibles combinés avec des cellules souches/progénitrices afin de permettre la régénération osseuse. Des études précédentes ont permis de mettre au point un modèle d'ORN évolutif chez le rat Lewis. Les lésions induites au niveau osseux et muqueux sont similaires à celles qui sont décrites chez les patients. Ce modèle animal nous permettra de quantifier le bénéfice des thérapies testées au niveau osseux, inflammatoire et de la muqueuse buccale. Pour l'ensemble des tests nous utiliserons 576 animaux. Tout au long de la procédure expérimentale les animaux seront suivis par du personnel compétent. Toutes les manipulations seront effectuées sous anesthésie, et

des anti-douleurs seront administrées. De l'alimentation molle sera distribuée dès l'irradiation des animaux. La durée de l'expérimentation est optimisée, elle prend en compte le délai d'installation des symptômes de l'ORN et du temps de régénération du tissu osseux. Tout animal présentant des signes comportementaux anormaux sera euthanasié de façon anticipée.

4395. L'objet de protocole (étude multigénérationnelle) permettra de mieux comprendre les mécanismes biologiques mis en œuvre lors d'une contamination chronique à faible dose par un polluant environnemental sur la première génération d'animaux (rats) mâles et femelles exposés en condition post-natale pendant une durée de 9 mois.

En effet, pour approfondir les premiers résultats scientifiques obtenus lors d'une précédente étude sur cette même génération d'animaux exposés, la réalisation de nouvelles analyses biologiques qui mettent en œuvre des techniques analytiques complémentaires est nécessaire. Ce complément d'étude permettra à la fois, d'enrichir le jeu de données expérimentales précédemment obtenu mais aussi de valider et de mieux cerner les effets biologiques observés en réponse cette exposition chronique faible dose qui semblent être liés à une différence male/femelle des animaux au niveau physiologiques. Ce protocole utilise 84 rongeurs (rats), exposés au polluant et des rats non exposés, mâles et femelles.

Seul l'animal permet de réaliser ces études qui mettent en œuvre des effets subtils sur un système complexe et régulé. L'utilisation d'animaux est incontournable pour l'étude des effets sanitaires de polluants environnementaux.

Des collectes d'urine et des tests comportementaux seront réalisées périodiquement tout au long de ce protocole (le reste des prélèvements biologiques seront réalisés sous anesthésie terminale à la fin du protocole). Ce protocole n'engage aucune souffrance des animaux.

4396. Ce projet consiste à tester une nouvelle approche de contrôle du développement de tumeur chez la souris. Pour cela, 135 souris de la lignée CB57Bl/6 seront utilisées afin d'établir l'efficacité de l'utilisation d'un composé X sur le développement d'une tumeur.

Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de 135 souris dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Une approche *in vitro* a été développée en amont afin de valider notre hypothèse de travail et l'utilisation du composé X sur des cellules immunitaires impliquées dans le contrôle de la tumeur mais cela ne reproduit pas un modèle de régulation complexe permettant la validation de notre stratégie

- Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature et l'expérience des différents partenaires de ce projet.

- Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec les directives européennes et dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger).

4397. Notre groupe travaille sur la mise au point d'approches de thérapies cellulaires pour les maladies autoimmunes, notamment la sclérodémie systémique (SSc). Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) possèdent des propriétés anti-inflammatoires et anti-fibrotiques qui les rendent particulièrement intéressantes pour mettre en place une approche thérapeutique de la SSc. L'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'efficacité thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses (humaines ou murines, de moelle osseuse ou de tissu adipeux) ou des vésicules extracellulaires (exosomes ou microparticules) qu'elles secrètent sur les symptômes de la SSc. Nous utiliserons les CSM humaines ou murines ou leurs vésicules extracellulaires qui seront injectées en intraveineux chez des souris immunocompétentes.

Nous avons déterminé un programme de travail sur les 5 ans à venir qui tient compte des avancées attendues de notre projet de recherche. Cependant, le nombre d'animaux concerné par chaque procédure est certainement maximal (maximum envisagé : 700) et sera revu à la baisse si besoin pour tenir compte de la règle des 3R.

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

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

- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Dans le cas où certains signes seraient observés, un traitement oral avec du paracétamol serait mis en place. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement.

- Remplacement : Afin de proposer une thérapie cellulaire chez l'homme, il est important de démontrer l'efficacité thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses humaines et murines dans un modèle pré-clinique pertinent chez l'animal. Des modèles *in vitro* ne suffisent pas seuls à évaluer l'efficacité de ces cellules.

4398. Notre groupe travaille sur la mise au point de thérapies cellulaires pour inhiber l'inflammation associée à la polyarthrite rhumatoïde (PR). Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) possèdent des propriétés anti-inflammatoires qui les rendent particulièrement intéressantes pour inhiber l'inflammation. Ces CSM ont également la propriété de libérer des microvésicules qui contiennent des molécules anti-inflammatoires. Afin d'évaluer les capacités anti-inflammatoires des CSM ou des vésicules qu'elles produisent, nous utilisons un modèle de prise de greffe de cellules tumorales allogéniques qui sont normalement rejetées par les souris immunocompétentes. Il permet donc de tester l'intérêt des CSM à inhiber la réponse immunitaire.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer les capacités thérapeutiques de cellules souches mésenchymateuses (ou de microvésicules produites à partir de ces cellules) pour diminuer les signes inflammatoires.

Nous avons déterminé un programme de travail sur les 5 ans à venir qui tient compte des avancées attendues de notre projet de recherche. Cependant, le nombre d'animaux concerné par chaque procédure est certainement maximal (maximum envisagé : 500) et sera revu à la baisse si besoin pour tenir compte de la règle des 3R.

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

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

- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement. Les protocoles utilisés étant de degré de sévérité légère au maximum, les animaux ne présentent pas de signes de souffrance habituellement. Cependant, dans le cas où certains signes seraient observés, un traitement oral avec du paracétamol serait mis en place

- Remplacement : Afin de proposer une thérapie cellulaire chez l'homme, il est important de démontrer l'efficacité thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses humaines et murines dans un modèle pré-clinique pertinent chez l'animal. Des modèles *in vitro* ne suffisent pas seuls à évaluer l'efficacité de ces cellules.

4399. Les venins sont des mélanges complexes de protéines et de polypeptides doués de propriétés biologiques et pharmacologiques. Certaines protéines sont des enzymes spécifiques et puissantes, certaines sont des toxines responsables de l'action létale des venins alors que d'autres ne sont pas létales mais agissent sur des fonctions biologiques importantes telles que la coagulation, la régulation de la tension artérielle, la contraction musculaire ou encore le processus inflammatoire... Les venins, connus pour varier en fonction de la famille, de l'espèce et de l'âge, ont pour rôle principal soit l'auto-défense soit l'immobilisation et la digestion des proies. En effet, ils sont à l'origine de nombreuses envenimations pouvant entraîner des séquelles physiques et psychologiques, voire le décès de leurs victimes. Ils causent de nombreux accidents d'autant plus que dans les pays occidentaux comme la France, les serpents par exemple deviennent de plus en plus fréquemment des animaux de compagnie et sont ainsi potentiellement une source d'envenimation. Constituant une réelle urgence médicale, la prise en charge, symptomatologique et/ou spécifique est principalement basée sur la connaissance de la composition des venins ainsi que sur son mode d'action. Au-delà de l'action toxique, certaines protéines, caractérisées par une action particulière sur différentes fonctions biologiques essentielles, se sont révélées comme d'excellents outils pharmacologiques utilisés dans le développement de nouveaux médicaments.

Le but de notre travail est d'étudier les effets de plusieurs toxines issues de venins provenant de différentes espèces sur le système cardiovasculaire chez le rat. Cette étude vise à identifier de nouvelles toxines aux propriétés originales mais aussi à caractériser pharmacologiquement et structuralement leur interaction sur leurs cibles moléculaires et à exploiter ces ligands pour leurs potentialités thérapeutiques.

Résultats attendus: Une meilleure compréhension physiopathologique du rôle des toxines provenant de venins permettra potentiellement l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Réduire: Le nombre d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Le nombre d'animaux est fixé à 10 par condition. Le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal.

Raffiner: Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées:

- le maximum d'expériences sera réalisé sur des animaux anesthésiés;

- en fin d'expérience, le sang sera prélevé à l'artère fémorale des animaux anesthésiés, qui seront ensuite mis à mort en vue de prélever différents tissus.

Remplacer: Dans la mesure du possible, les expériences *in vivo* sur rats seront remplacées par des études *in vitro* sur cellules.

L'ensemble de ces expériences nécessitera 90 rats par toxine étudiée (soit un total de 360 rats).

4400. La parodontite est une pathologie inflammatoire chronique d'étiologie bactérienne. In fine, cette maladie conduit à la destruction de l'os alvéolaire, et à la perte de nombreuses dents. La parodontite chronique représente un véritable défi de santé publique car elle affecte une fraction très importante de la population adulte, 46% aux USA en 2012. De plus, elle est fréquemment associée à d'autres maladies systémiques partageant des similitudes immunopathogéniques (diabète, certaines maladies cardiovasculaires, polyarthrite rhumatoïde). Ainsi, il apparaît que le contrôle de la parodontite aurait des effets bénéfiques locaux mais aussi généraux et à distance.

La libération de cytokines pro-inflammatoires (dont l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF α) par les cellules de l'hôte est supposée être une étape essentielle dans la pathogenèse de la parodontite. Malheureusement, les anticorps dirigés contre ces 3 cytokines ont montré uniquement une efficacité partielle dans son traitement sur l'animal comme chez l'homme. De nouvelles cibles thérapeutiques restent à découvrir. Récemment, la famille de l'IL-1 s'est enrichi de nouveaux membres comme l'interleukine 33 (IL-33), l'interleukine 36 (IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36Ra (récepteur antagoniste)), ou l'interleukine 38 (IL-38) qui pourraient être impliquées dans la parodontite comme elles le sont dans d'autres pathologies inflammatoires chronique.

Les modèles animaux de parodontite, et en particulier ceux induits par l'apposition de ligatures péri-dentaires, ont permis d'étudier le rôle de certains facteurs inflammatoires dans la progression de la parodontite. Ces protocoles induisent une inflammation locale

et provoquent une perte osseuse alvéolaire qui reproduit la destruction osseuse alvéolaire enregistrée chez les patients atteints de parodontite.

Le but de notre étude est d'étudier l'intérêt de ces interleukines dans la parodontite. Ces cytokines sont des nouveaux membres de la famille de l'IL-1 qui ont montré une implication dans la réaction inflammatoire *in vitro* et *in vivo* et qui pourraient aussi agir dans l'inflammation parodontale. Cependant, leurs rôles exacts dans le processus inflammatoire est peu connu et doit être davantage exploré.

Résultats attendus : Nous émettons l'hypothèse que ces nouvelles interleukines pourraient agir comme des acteurs majeurs impliqués dans l'inflammation parodontale. Si cette hypothèse se confirme, nos résultats pourraient ouvrir de nouvelles possibilités thérapeutiques dans le traitement de la parodontite.

Méthodologie : La procédure expérimentale 1 (sans Virus Adéno-Associé (AAV)) consistera à déterminer la chronologie de l'inflammation dans le modèle de parodontite par ligatures périodentaires imprégnées de bactéries chez des souris C57BL6.

La procédure expérimentale 2 permettra d'étudier les effets des injections gingivales d'AAV surexprimant des nouveaux membres de la famille de l'IL-1 murins dans ce modèle de parodontite (expérience principale), après avoir vérifié la surexpression induite par ces AAV (expérience préliminaire). 6 AAV seront étudiés sur une période de 5 ans. Les animaux seront mis à mort à différents temps du protocole (début, pic et déclin de l'inflammation). La sévérité de la parodontite sera quantifiée en mesurant la perte d'os alvéolaire dans la zone d'intérêt par microscanner. L'expression des interleukines d'intérêt sera étudiée par diverses techniques de biologie moléculaire au niveau local (gencive) ou systémique (sérum). L'utilisation d'un modèle animal est indispensable au bon déroulement de ce projet, permettant de faire un lien entre les résultats obtenus *in vitro*, et une éventuelle application clinique. Elles sont incontournables avant une application clinique et ne peuvent être remplacées par des expérimentations *in vitro* (Remplacer).

Un suivi longitudinal de chaque animal n'est pas possible pour évaluer la chronologie de la parodontite (procédure intrabuccale) ce qui impose de sacrifier les animaux à différents temps du protocole. Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet sera réduit au maximum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative (Réduire).

La procédure expérimentale 1 consistera à déterminer la chronologie de l'inflammation dans le modèle murin de parodontite, 3 groupes (sham, ligatures seules, ligatures imprégnées de bactéries) de 3 animaux sont prévus pour chacun des 6 points de la chronologie (J1, J2, J4, J8, J14, J28) (54 animaux au total).

La procédure expérimentale 2 utilisera des AAV et sera constituée d'une phase préliminaire et d'une expérience principale. 6 AAV surexprimant un nouveau membre de la famille de l'IL-1 murin seront étudiés deux par deux sur une période totale de 5 ans. L'expérience préliminaire permettra de vérifier la surexpression induite par l'injection d'AAV. Pour l'étude de 2 AAV surexprimant un nouveau membre de la famille de l'IL-1 murin, elle nécessitera d'injecter chez des souris C57BL/6 du PBS (contrôle sans AAV ; n=3), de l'AAV GFP (n=3), 1er AAV étudié (n=3) 2ème AAV étudié (n=3) (12 animaux au total). Ensuite, pour l'expérimentation principale, la parodontite expérimentale sera induite dans 4 groupes (injection de PBS, AAV-GFP, 1er AAV étudié, 2ème AAV étudié) de 30 souris (120 animaux au total). 10 animaux de chaque groupe seront mis à mort à trois temps du protocole (début, pic et déclin de l'inflammation). La chronologie précise sera déterminée grâce à la procédure expérimentale 1. Le nombre total d'animaux prévu pour l'ensemble du projet sur 5 ans est de 450 souris (54 pour la procédure expérimentale 1, 396 animaux pour la procédure expérimentale 2 (132 animaux pour l'étude de 2 AAV, procédure répétée 3 fois pour étudier 6 AAV différents).

Le bien-être des animaux sera primordial durant les expérimentations, notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement (ajout de papier dans chaque cage pour leur permettre la conception d'un « nid »), une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis (Raffiner).