



**MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE,  
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE**

**Secrétariat d'Etat  
à l'enseignement supérieur et à la recherche**

Résumés non techniques des projets autorisés (12)

1201. Le projet consiste en l'apprentissage des bases de la chirurgie coelioscopique. Il ne s'adresse qu'à des chirurgiens en formation soit des chirurgiens déjà installés mais ne pratiquant pas encore cette technique soit des internes en formation ayant déjà une solide expérience de la chirurgie ouverte. Seront organisés deux stages annuels de 1 jour ½ encadrés par 2 à 3 chirurgiens experts du Centre Hospitalier Universitaire. La première demi-journée consiste à apprendre les bases techniques et à réaliser les gestes de la chirurgie coelioscopique sur des coeliotrainers (boîte fermée percée de trous dans lesquels sont introduits l'optique et les différents outils chirurgicaux que sont les pinces, ciseaux etc). Le deuxième jour consiste à appliquer ces gestes sur modèle porcin au décours de néphrectomie (retrait d'un rein) et de suture digestive ou urinaires. Le rationnel de cette formation repose sur la nécessité d'apprendre et de pratiquer les gestes de base de la chirurgie coelioscopique. Celle-ci consiste à opérer à l'aide d'une caméra et d'instruments chirurgicaux introduits au travers de petites portes cutanées appelés trocarts après avoir gonflé la cavité abdominale à l'aide de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Cette technique est extrêmement répandue en chirurgie humaine mais reste notoirement difficile à acquérir. Si les gestes techniques de base peuvent être enseignés et appris sur des coeliotrainers, la mise en condition réelle sur modèle animal reste essentielle pour l'apprentissage de la mise en place et la gestion per opératoire du matériel, la dissection des tissus et la gestion intra corporelle des mouvements. La mise en condition sur modèle animal est donc d'une aide fondamentale dans l'apprentissage des conditions réelles de chirurgie avant son application sur l'homme. Le modèle porcin, de par ses similarités anatomiques avec l'Homme, est le modèle animal le plus adapté pour cette formation. Pour réduire le nombre d'animaux, les stagiaires travaillent une demi-journée sur coeliotrainers puis une journée par groupe de deux ou trois sur un même animal. L'animal est endormi environ 8 heures : un côté est opéré le matin puis l'animal est retourné pour permettre une deuxième intervention sur l'autre côté. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux (même portée élevée ensemble), dans des cases chauffées et sur paille pour que les animaux puissent fouir et jouer (enrichissement du milieu). Le matin de l'intervention, les animaux sont anesthésiés, l'anesthésie générale étant maintenue toute la journée. Il n'y a pas de réveil des animaux, l'euthanasie par surdosage barbiturique se déroule sous anesthésie. Les animaux ne sont pas réveillés car les chirurgies réalisées entraînent des exérèses d'organes vitaux (reins par exemple). Chaque journée de travaux pratiques exige l'anesthésie de 8 porcs et il y a 2 sessions annuelles. 16 porcs sont donc utilisés par an et donc 80 porcs pour 5 années.

1202. Ce protocole est intégré dans un projet visant à explorer de nouvelles voies pour améliorer la qualité de la production des élevages de porcs. En partenariat avec les organismes de transfert, de développement et d'enseignement, ces connaissances permettront d'élaborer des outils et des pistes de réflexion pour répondre aux enjeux actuels et futurs. L'alimentation et la nutrition, sont des composantes clés de l'élevage et des filières porcines. Le coût alimentaire représente en moyenne 69% du coût de production. Les 264 animaux utilisés pour ce protocole proviennent de deux lignées de porcs (132 animaux de chaque lignée, nombre minimal requis pour établir un phénotype fiable sur chaque groupe), sélectionnées depuis 15 ans à l'INRA sur l'efficacité alimentaire. Celle-ci s'exprime en gain de poids de l'animal par kilo d'aliment ingéré. La première lignée est sélectionnée pour avoir une meilleure efficacité alimentaire (CMJR-) et la deuxième pour avoir une moins bonne efficacité alimentaire (CMJR+). Ces lignées ont permis de montrer dans des études antérieures qu'il est possible d'améliorer l'efficacité d'utilisation de l'aliment par les animaux sans modifier leur composition corporelle (teneur en gras de la carcasse) ou leur vitesse de croissance. Les animaux plus efficaces (CMJR-) ont une consommation d'aliments réduite par rapport aux moins efficaces (CMJR+), et leur métabolisme est modifié pour être plus performant, sans que cela impacte leur capacité à faire face à des événements stressants (inflammation, chaleur par exemple). La période autour du sevrage a été jusqu'à présent peu explorée dans ces études. La problématique du protocole sera d'étudier plus finement la phase de post sevrage entre les animaux des deux lignées et de soumettre les porcs à un aliment amélioré en post-sevrage pour étudier l'interaction possible entre le type génétique et la réponse à l'aliment. Toujours dans un esprit de transfert rapide et aisé des connaissances acquises à la profession porcine, il est indispensable d'utiliser des animaux de même espèce. Les animaux seront étudiés partir de l'âge de 21 jours (âge du sevrage) jusqu'à 170 jours (âge minimum de départ à l'abattoir). L'objectif de cette étude est de caractériser la physiologie des porcelets des deux lignées autour du sevrage. Des prises de sang seront

nécessaires afin de suivre des paramètres sanguins indicateurs de santé, celles-ci seront réalisées dans le respect du volume maximal prélevable sur les animaux ; une période de repos sera observée à la suite de ces prélèvements. Nous prélèverons seulement la moitié des effectifs soit 132 animaux.

Des prélèvements individuels de fèces seront réalisés pour évaluer les différences de flore intestinale entre lignées (qui joue un rôle majeur dans la santé et la réponse immunitaire des animaux).

Des pesées seront effectuées pour suivre finement le gain de poids et la consommation des animaux dans la phase qui suit immédiatement le sevrage.

La règle des 3 R a été prise en compte lors de la préparation de ce projet:

- Réduire : le nombre d'animaux dont on prélève du sang a été réduit au nombre minimal pour avoir des effectifs significatifs ( $264/2=132$  animaux prélevés). Les effectifs testés permettent de mettre en évidence avec une puissance de 0,8 des différences de l'ordre de 1 écart type des caractères entre groupes (lignée x aliment).

- Raffiner : La collecte de fèces permet d'éviter des prélèvements plus invasifs pour l'animal. Le maintien des groupes sociaux du post sevrage et pendant toute la durée de l'engraissement limite le stress chez les animaux.

-Remplacer: L'étude portant sur la santé digestive du porcelet, il n'y a pas d'autres alternatives concernant le choix de l'espèce utilisée.

1203. Les cyanoacrylates sont utilisés comme adhésifs cutanés depuis les années. Leur utilisation en radiologie et neuroradiologie interventionnelle a commencé dans les années 80, surtout dans les malformations complexes et la possibilité de développer les techniques endovasculaires afin d'étendre le spectre thérapeutique sur les maladies vasculaires cérébrales. Depuis 20 ans, plusieurs molécules ont été développées en pratique clinique (N-butyl-2-cyanoacrylate, 2-octyl-cyanoacrylate etc).

Nous voulons tester une nouvelle molécule, dispositif médical implantable de classe III, composé essentiellement de monomère de cyanoacrylate de n-hexyle, translucide et de faible viscosité. Ce dispositif est envisagé pour remplacer l'existant utilisé dans notre service mais un essai sur animal avant de l'utiliser chez les patients est indispensable : il faut contrôler et comparer le comportement de ce dispositif par rapport à ceux déjà utilisés afin d'évaluer son efficacité et être assuré qu'il comporte les mêmes ou moins de risques de complications. Plus précisément, des complications liées à la polymérisation des cyanoacrylates dans le corps humain sont variables en fonction de la nature des molécules en présence (stabilisateurs) comme l'adhésion au cathéter, la diffusion distale et autres.

L'objectif est de reproduire le modèle d'embolisation aigue avec cette nouvelle colle pour voir son comportement pendant l'injection in vivo avant de réaliser l'injection chez l'Homme.

Un seul porc sera anesthésié et l'euthanasie suivra, sans réveil de l'animal. Il sera opéré dans les conditions de bloc opératoire hospitalier (anesthésie générale, monitoring des fonctions vitales).

Il est impossible de comprendre le comportement de cette colle autrement que par une injection in vivo. Le porc, de par ses similarités anatomiques avec l'Homme, est le modèle le plus adéquat pour ce test. Les différentes étapes per opératoires seront suivies par artériographie (amplificateur de brillance).

L'animal sera hébergé sur paille dans le local de mise à jeun (mise à jeun limitée à 2 heures). L'induction se fera dans cette salle et dans le calme pour limiter le stress du déplacement.

1204. L'échographie est régulièrement utilisée à usage diagnostique pour mettre en évidence des lésions et ce, sans effets secondaires sur l'organisme. De plus en plus, elle prépare à des gestes chirurgicaux ou les complète. Elle peut par exemple servir à visualiser des trajets vasculaires ou nerveux préalablement à des cathétérismes de vaisseaux ou des injections péri nerveuses. L'injection d'anesthésique local au plus près des structures nerveuses permet d'optimiser l'anesthésie locale ou loco-régionale. Ces approches sont très régulièrement utilisées en milieu hospitalier et nous souhaitons qu'elles soient enseignées dans les centres d'expérimentation animale. Notre objectif est que les conditions d'exercice vétérinaires soient les plus proches possibles des conditions du milieu médical humain.

Ces formations seront à destination des expérimentateurs (concepteurs de projets, praticiens, vétérinaires) susceptibles soit de réaliser des protocoles invasifs nécessitant des anesthésies loco-régionales de qualité soit de cathétériser des vaisseaux de la façon la moins invasive possible.

Dans l'objectif de respecter le principe des 3R, nous envisagerons :

- Le Remplacement par utilisation de prélèvements d'abattoir (cuisse ou épaule par exemple) afin de minimiser le recours aux animaux vivants pour l'étape préliminaire d'apprentissage et de prise en main du matériel ;

La Réduction par l'optimisation du nombre d'animaux présents : les stagiaires seront par groupe de trois et deux groupes pourront travailler sur le même animal en même temps ;

- Le Raffinement par réalisation de tous nos travaux pratiques sous anesthésie générale dans une procédure sans réveil. Les animaux seront hébergés par 2 ou 3 porcelets (20 à 30 kgs) dans des cases propres, avec paille à disposition.

La formation se fera sur le modèle porcin car il est de plus en plus répandu dans les établissements d'expérimentation du fait de sa proximité avec l'Homme (anatomie, physiologie, métabolisme...) et de sa facilité de manipulation et d'élevage (facilité d'approvisionnement).

A chaque session de formation d'environ 15 stagiaires, nous utiliserons 3 porcelets et nous envisageons au plus 4 sessions annuelles (le nombre sera adapté aux demandes). Nous utiliserons donc un maximum de 60 animaux sur les 5 années du projet. Les deux premières formations seront filmées et photographiées pour proposer aux stagiaires des supports de formation adaptés et augmenter les capacités d'apprentissages "ex vivo".

1205. Notre projet a pour objectif de rechercher et analyser la production de cailles parthénotes dans un premier temps puis d'identifier des génotypes de cailles qui auraient la capacité à produire des animaux parthénotes. Nous souhaitons analyser le contenu des œufs non fécondés de chez la caille japonaise pendant 45 jours. Afin d'être sûr qu'aucune fécondation ait eu lieu, nous utiliserons des femelles vierges. Chez la caille japonaise le sexage par observation des organes sexuels externes est impossible avant leur maturation sexuelle. Dans l'objectif d'identifier le sexe des cailleteaux nous proposons d'identifier les chromosomes sexuels par PCR à partir du prélèvement d'une goutte de sang, à l'âge de 3 semaines. Grâce à cette méthode nous pourrions obtenir avec certitude des femelles vierges et des œufs non fécondés. Nous utiliserons des animaux de 16 lignées de caille (Beige, Yellow, Œuf blanc, Noir, Lavande, DI, Frisées, Cinamon, H Silver, R126, Œufs Vert, DD, E+,ET, E-, S+,ST, S-). Au total 3808 animaux seront utilisés : 25 couples de chaque lignée seront à l'origine du projet. Ce nombre a été estimé à partir des données publiées chez la poule, la dinde et chez la caille. Chez la caille, le constat d'ébauches embryonnaires est entre 0 et 4%, selon la lignée. 25 femelles issues de chaque lignée seront sexées puis placées en cages individuelles pour le suivi de ponte et collecte d'œufs pendant 9 semaines. Le contenu des œufs non fécondés sera analysé. Dans le cas où une femelle produit des œufs non fécondés mais avec des ébauches embryonnaires, elle sera conservée pour la seconde partie du projet. Les pères des femelles seront également placés en cages individuelle pendant 27 semaines, en attendant la période d'accouplement avec la femelle (sa fille) qui a produit des œufs non fécondés et avec des ébauches embryonnaires. Les animaux seront en cage individuelle, mais non isolées; il s'agit d'un dispositif grillagé, les cages étant contiguës, qui permet aux animaux de se voir et se sentir, limitant ainsi l'isolement social. L'isolement des mâles est choisi afin d'éviter les problèmes d'agressivité constatés chez des mâles élevés en groupe. Les cages individuelles sont enrichies par des rondelles métalliques faisant office de jouets.

1206. Ce projet éducatif correspond à la partie pratique d'une formation réglementaire spécifique et obligatoire pour les espèces rongeurs. Elle consiste en la mise en place de travaux dirigés (TD) à destination des personnels concevant des procédures expérimentales et des projets utilisant des animaux à des fins scientifiques. Pour ces travaux dirigés, il s'agit de démonstrations, avec peu de manipulation directe des animaux par les étudiants. Cette disposition contribue de façon importante à la réduction du nombre d'animaux (un seul animal peut servir pour tout un groupe de TD de 10 personnes pour une démonstration). Ceci constitue aussi un facteur de raffinement puisque les animaux seront manipulés par des formateurs professionnels compétents et non par les étudiants eux-mêmes. D'autre part, les animaux utilisés seront choisis en priorité parmi des animaux issus d'élevages internes aux établissements, sans phénotype dommageable, mais ne présentant pas un génotype utilisable par les chercheurs. Si toutefois les élevages internes ne permettaient pas un approvisionnement de ce type, le nombre minimal d'animaux requis serait obtenu auprès d'un établissement agréé. Les TD seront mis en place pour des acquisitions de compétences dans les domaines suivants: démonstration de l'anesthésie gazeuse chez les rongeurs (pratique), et procédures faiblement invasives chez les rongeurs: i) imagerie du petit animal par échographie, bioluminescence et fluorescence; ii) bases sur la manipulation et la contention, administration de médicaments (intra-péritonéale, intra-veineuse et sous-cutanée), xénogreffes. Pour former 20 étudiants par session, en deux groupes de TD de 10 personnes, il a été déterminé qu'il serait nécessaire d'utiliser 1060 souris pour la totalité du projet (10 sessions de formation).

1207. Dans l'espèce caprine, les femelles sont pubères autour de l'âge de 6-7 mois. Néanmoins il a été montré que chez de nombreuses espèces de mammifères, les signaux socio-sexuels échangés au cours des interactions entre les sexes jouent un rôle important dans la régulation de la physiologie et des comportements reproducteurs. Ainsi, des travaux effectués au sein de l'équipe de recherche sur une espèce modèle qu'est la souris ont montré que l'exposition de femelles péri-pubères au mâle permettait d'induire une apparition précoce de la puberté chez ces animaux mais aussi une préférence précoce pour l'odeur du mâle. La puberté avait été évaluée par des marqueurs périphériques (ouverture vaginale, poids du vagin) et centraux (expression hypothalamique du kisspeptine). Nous voudrions maintenant tester si de tels effets de l'exposition au mâle sur l'apparition de la puberté chez les femelles existent chez une espèce d'intérêt agronomique telle que la chèvre. En effet cela permettrait à terme d'en tirer des applications pratiques dans le champ des productions animales (raccourcissement de la période dite « improductive » avant la première reproduction, amélioration du comportement sexuel, réponse à l'« effet mâle » lors de la période d'anoestrus) sans utilisation de traitements hormonaux.

Pour cela nous utiliserons 36 chèvres et 12 boucs. Les chèvres seront mises en présence des mâles après leur sevrage, de l'âge de 3 mois à 7 mois (juin à novembre 2015). Afin d'exposer les femelles à des mâles ayant des niveaux d'activité sexuelle différents, une partie des mâles seront castrés. Pour évaluer l'impact de l'exposition péri-pubertaire au mâle, les femelles après le sevrage seront divisées en 3 groupes, un groupe contrôle non exposé aux mâles, un groupe exposé aux mâles entiers et un groupe exposé aux mâles castrés. Leur comportement sexuel sera évalué en saison de reproduction (octobre/novembre) ainsi que durant la période de repos sexuel suivante (mars/avril) par la réalisation d'un effet mâle. Pour la réalisation de l'effet mâle, nous aurons besoin de mâles sexuellement actifs en contresaison (mars-avril), les mâles seront donc soumis à un traitement lumineux. En effet chez les caprins la reproduction est sous contrôle photopériodique (durée du jour), les animaux sont sexuellement actifs en jours courts (hiver: généralement plus de 14-16h de nuit pour 10-8h de jour). Le traitement photopériodique de jours longs à compter du 1er novembre permet de mimer la saison d'inactivité sexuelle, qui a normalement lieu en printemps-début d'été, en hiver. Le passage en jours normaux en janvier correspond à une transition jours longs-jours courts permettant ainsi d'activer l'axe reproducteur mâle. Cet effet n'est pas immédiat, mais nécessite plusieurs semaines avant de se manifester (en général 6 semaines), ce qui nous permet d'obtenir des animaux actifs sexuellement en mars, au moment de l'expérience. La plupart des procédures utilisées dans ce protocole sont soit des

procédures d'élevage soit des procédures peu invasives et tous les animaux pourront réintégrer le troupeau à la fin de l'expérience.

1208. L'apprentissage de la chirurgie pour les futurs médecins se fait d'abord sur pièces anatomiques puis par parrainage progressif au bloc. Cependant, ce parrainage a ses limites notamment pour l'enseignement à de nouvelles pratiques ou à la manipulation de nouveaux matériels. La coeliochirurgie ou chirurgie par endoscopie est une technique en constante évolution et elle demande un training conséquent avant de maîtriser correctement l'abord et la gestuelle. Une partie de cet apprentissage se fait ex vivo dans des boîtes appelées « coelio trainer » notamment pour la manipulation des outils (pinces, ciseaux, coagulateurs etc...) et leur contrôle sur écran.

Les cours théoriques puis l'entraînement sur l'animal sont destinés à diminuer la courbe d'apprentissage nécessaire à chaque intervention de coeliochirurgie. Les indications reconnues pour les différentes disciplines sont exposées. De même l'introduction des trocars, la création du pneumopéritoine (insufflation de dioxyde de carbone dans la cavité abdominale pour mieux visualiser les organes et les isoler de la paroi), l'exposition c'est-à-dire la manipulation correcte des organes, la qualité de l'image, la gestuelle sont détaillés pour éviter les accidents dus au non respect des principes de base. La pratique chirurgicale correcte (respect des tissus, contrôle de l'hémostase, techniques de suture etc) nécessite absolument un entraînement in vivo : les pièces anatomiques ne suffisent pas à enseigner la tension des tissus et organes, la fragilité vasculaire ou des parois. Le passage sur organisme vivant est indispensable et il est souhaitable que cet entraînement soit effectif avant la présence en bloc hospitalier, ce qui justifie cette phase préliminaire sur animal.

Des échanges sur les différentes pratiques en fonction des centres sont privilégiés pour valider ces propositions variées.

Pour réduire le nombre d'animaux, les stagiaires travaillent par groupe de deux ou trois pour un même animal. L'espèce choisie est le porc de par ses similarités anatomiques et physiologiques avec l'Homme. L'animal est endormi environ 8 heures: un côté est opéré le matin puis l'animal est retourné pour permettre une deuxième intervention sur l'autre côté. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux (même portée élevée ensemble), dans des cases chauffées et sur paille pour que les animaux puissent fouir et jouer (enrichissement du milieu). Le matin de l'intervention, les animaux sont anesthésiés, l'anesthésie générale étant maintenue toute la journée. Il n'y a pas de réveil des animaux, l'euthanasie par surdosage barbiturique se déroule sous anesthésie. Les animaux ne sont pas réveillés car les chirurgies réalisées en entraînement impliquent des exérèses d'organes vitaux (reins par exemple).

Le nombre total d'animaux par an est de 72 porcs (18 porcs par semaine, sur deux journées pratiques réparties sur 4 semaines) soit 360 porcs sur 5 ans.

1209. Afin de développer des systèmes de production durables, il est nécessaire d'aboutir à des systèmes d'alimentation des animaux monogastriques qui permettent une utilisation plus efficace des ressources par l'animal. Plus particulièrement, une meilleure utilisation des ressources minérales, et notamment du phosphore, est impérative pour réduire à la fois les quantités apportées dans l'aliment et les rejets dans l'environnement tout en maintenant un bon niveau de minéralisation du squelette ainsi qu'une croissance correcte de l'animal.

Cependant, dans le contexte actuel de diversification des formules alimentaires (tourteau de colza, drêches de blé et maïs), on peut s'interroger sur les répercussions de l'utilisation de tels coproduits sur la disponibilité des minéraux. En effet, ces coproduits sont majoritairement riches en fibres alimentaires, plus riches que les matières premières conventionnelles comme le tourteau de soja, le maïs ou le blé. Il a déjà été montré que les fibres alimentaires avaient un impact non négligeable sur la digestibilité des autres nutriments de la matrice, mais également sur le temps de transit, sur la morphologie digestive, ou encore sur la sensation de satiété. Ces modifications peuvent entraîner à leur tour des variations de performances de croissance. En revanche, aucune étude n'a permis jusqu'à présent de quantifier spécifiquement l'effet de fibres natives issues du tourteau de colza sur la digestibilité de phosphore et de calcium chez le poulet.

L'objectif de ce projet est donc d'asseoir nos connaissances sur l'impact de telles matières premières et des procédés technologiques employés sur les flux digestifs et métaboliques du phosphore, du calcium et de la phytase microbienne.

Huit régimes incluant différents niveaux de tourteau de colza, de composition variable en fibres et de phosphore total seront testés, supplémentés ou non en phytase microbienne.

Afin d'être au plus proche de la réponse individuelle de l'animal, et d'éviter l'utilisation d'un grand nombre d'animaux, deux expérimentations seront faites en cages individuelles, pour un total de 288 poulets:

1. Pour la première expérimentation, 144 poulets seront utilisés, à partir de 1 jour d'âge jusqu'à 21 jours d'âge. Chaque animal se verra attribué l'un des huit régimes expérimentaux, à raison de 18 animaux par traitement.

Les conditions d'hébergement et de soins ont été adaptées pour réduire au maximum l'angoisse et la souffrance des animaux (logement en groupe des oiseaux en début d'expérimentation) : ils seront logés à 2 animaux par cage de J1 à J10, puis seront logés en cage individuelle à partir de J10 jusqu'à l'abattage. Une surveillance régulière permettra d'identifier les animaux en souffrance qui seront immédiatement retirés de l'expérimentation et remis en élevage. Cette période permettra aux animaux de s'habituer à la cage, avant de démarrer la phase expérimentale avec les régimes spécifiques à partir de J10 jusqu'à J21. Les fientes pourront alors être collectées pendant quatre jours sur la période expérimentale.

2. En parallèle, pour la deuxième expérimentation, 144 autres animaux seront élevés, avec une période de J0 à J17 au sol, selon les procédures d'élevage classiques, puis de J17 à J31 où les animaux seront en cage individuelle, après une pesée individuelle et une répartition sur la base du poids vif. De J17 à J21, les animaux pourront s'habituer à la cage, puis ils recevront de J21 à J31 un des huit régimes expérimentaux, à raison de 18 animaux par régime.

Dans ces deux expérimentations, le nombre d'animaux a été réduit à son minimum, avec une puissance de 90% qui a été choisie du fait qu'il y a 8 régimes et qu'il est important de faire ressortir une différence entre ces régimes même faible, car celle-ci peut être intéressante. L'objectif est de pouvoir diminuer le taux d'incorporation du tourteau de soja (20 à 35 % dans l'aliment volaille) qui est importé et très cher. Pouvoir le baisser de quelques pourcents a un intérêt agronomique et économique pour la filière. Les cages sont contiguës et grillagées, les animaux peuvent se voir. La cage individuelle avec un système d'abreuvement et d'alimentation adapté permet au poulet d'exprimer totalement son potentiel d'ingestion et donc de croissance. Dans les deux expérimentations, plusieurs pesées auront lieu ainsi qu'une prise de sang au moment de l'abattage. L'ensemble des animaux sera euthanasié à la fin de la période expérimentale, par injection létale de pentobarbital. Le tibia droit de chacun des animaux sera prélevé pour déterminer la qualité du squelette. Le tractus digestif sera également prélevé pour évaluer la disponibilité digestive des minéraux et quantifier l'impact des traitements sur la physiologie et la morphologie digestive.

1210. La technologie des ultrasons focalisés, connue par l'acronyme HIFU permet d'effectuer l'ablation de tissus pathologiques d'une manière totalement non invasive. Une sonde émet des ultrasons qui traversent la peau et se concentrent sur le tissu à traiter, provoquant sa coagulation puis sa nécrose. La sonde comporte aussi une barrette d'échographie qui permet de guider en permanence le geste. Les HIFU sont déjà utilisés en routine pour traiter notamment les cancers de la prostate et les fibromes utérins. De nombreuses autres applications cliniques sont en développement. Nous développons un appareillage permettant de traiter les adénofibromes du sein et les nodules thyroïdiens.

Cette technologie permet de remplacer certaines chirurgies par un geste totalement non invasif. Les avantages comparatifs du dispositif concernent aussi bien le patient, les praticiens et les centres de traitement que la collectivité.

Pour le patient, les avantages se traduisent par des durées d'intervention chirurgicale et d'hospitalisation réduites, par l'amélioration de la qualité de vie post opératoire (absence de cicatrice, durée d'hospitalisation faible, douleurs moindres...). Pour les praticiens et les centres de traitement, les avantages du dispositif se caractérisent par l'augmentation du nombre de patients traités, la possibilité d'adresser différentes pathologies via un dispositif unique et la sécurité, l'efficacité et la facilité d'utilisation. Pour la collectivité, les avantages comparatifs sont d'ordre économique et se traduisent notamment par la réduction des coûts induits par les traitements médicamenteux longs ou les actes chirurgicaux (la durée d'hospitalisation, notamment).

Objectif général. L'équipe de recherche souhaite améliorer la technologie HIFU, notamment en réduisant le temps d'ablation et en augmentant la couverture spatiale de la zone traitée. La réduction du temps de traitement rendra la technologie plus compétitive face à la chirurgie traditionnelle. L'augmentation de la couverture spatiale rendra possible l'ablation complète des cibles cliniques.

Modèle animal. Les essais ex-vivo ont déjà été effectués sur foie excisé. Toutefois, ce modèle est limité par l'absence de vascularisation, l'absence de mouvements et l'absence de la paroi cutanée. Le foie de lapin, traité par HIFU en voie externe, en application sous-costale, est un modèle animal connu des expérimentateurs. Dans toute l'expérience clinique avec la technologie HIFU aucune douleur post traitement n'a été observée chez les patients (prostate, thyroïde, vessie). De plus aucune infection n'est à craindre compte tenu du caractère extracorporel du traitement. Les lapins seront anesthésiés et on appliquera l'énergie HIFU sur le foie par voie externe, sous costale. L'absence de vascularisation du tissu traité par HIFU sera constatée par imagerie doppler. L'euthanasie des animaux interviendra dans l'heure suivant les lésions induites. Ils seront maintenus sous anesthésie entre le traitement et l'euthanasie. La portion de foie traité sera prélevée pour analyse macroscopique. Quatre-vingt-dix lapins seront nécessaires à la réalisation de l'étude.

Méthode. De nouveaux modes d'application de l'énergie ultrasonore seront évalués grâce à une analyse macroscopique des lésions tissulaires qu'ils engendrent. D'une part, on évaluera le gain de temps de traitement. D'autre part, on étudiera la morphologie et les dimensions des tissus coagulés par HIFU, pour évaluer la couverture spatiale, la précision du traitement et la reproductibilité des lésions tissulaires.

1211. La transplantation d'îlots pancréatiques est une alternative thérapeutique à l'insulinothérapie dans le traitement du diabète de type 1 (DT1). Cette approche a montré sa faisabilité et son efficacité avec l'obtention de près de 100% d'insulino-indépendance immédiatement après greffe. Néanmoins, une perte importante des cellules greffées est à l'origine de la nécessité de greffer plusieurs fois le même patient avec des cellules provenant de différents donneurs, ce qui dans un contexte de pénurie d'organe, rend difficile la généralisation de cette thérapie. De plus l'implantation a lieu dans les veines du foie ce qui génère une réaction inflammatoire intense qui va détruire jusqu'à 40% de la greffe. Ainsi dans le but de diminuer la perte du greffon et de maintenir sa fonction à plus long terme, notre étude a pour but de tester un nouveau mode de transplantation qui permettra de tester des sites alternatifs à la transplantation dans le foie.

Pour se faire, les îlots seront cultivés sur différents types de support qui seront co-transplantées.

Une étude préalable de biocompatibilité des supports va donc être nécessaire afin de déterminer le choix d'une matrice de choix. Cette étude de biocompatibilité des supports matriciels sera réalisée au niveau des différents sites receveurs (muscle, peau, omentum, péritoine). Cette étude a pour but de déterminer le site receveur le plus à ce type d'implantation et le moins sensible aux éventuelles réactions inflammatoires provoquées par le biomatériau.

La règle des 3R, soit réduire, raffiner, remplacer est respecté. Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaires pour obtenir des résultats statistiques et ne pas avoir à recommencer l'étude. Les animaux seront hébergés à 5 par cage avec eau et nourriture ad libitum. Pour réduire le stress, les cages seront enrichies à l'aide de cylindres rouges en PVC. Les rats seront placés en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie réglementaire. Afin de prévenir toute

douleur et souffrance qui pourraient survenir les jours suivants la chirurgie, des injections d'antibiotiques, d'anti-inflammatoire et d'anti-douleur sont réitérées jusqu'à cicatrisation de l'animal. De plus, même après cicatrisation et durant toute la durée de l'étude, les rats seront examinés quotidiennement afin de détecter d'éventuels symptômes de douleur. Le remplacement n'est pas possible dans cette étude, elle nécessite l'emploi des animaux pour réaliser un test de biocompatibilité. Un nombre de 594 rats sera nécessaire pour l'ensemble de l'étude.

1212. Les infections pulmonaires sont la principale cause d'infection nosocomiale survenant en réanimation chez les patients intubés sous assistance respiratoire (13% des patients intubés pour l'année 2012 en France). Le principal traitement de ces infections est l'administration d'antibiotiques par voie intra-veineuse. Ces infections sont difficiles à traiter car la diffusion des antibiotiques dans le tissu pulmonaire est limitée pour la plupart des antibiotiques. Ceci nécessite d'augmenter les doses et les durées d'administration des antibiotiques. Ainsi, on augmente le risque de survenue d'effets indésirables délétères qui dépendent souvent des doses administrées. C'est le cas, par exemple, des antibiotiques de la famille des aminosides.

La délivrance des antibiotiques dans le tissu pulmonaire infecté pourrait être améliorée, après administration intraveineuse, par l'utilisation d'ultrasons associés à l'injection de microbulles de contraste (les microbulles de contraste sont couramment utilisées lors d'échographies afin d'améliorer la qualité des images obtenues). En effet, cette technique augmente la pénétration de médicaments anticancéreux (la doxorubicine) dans les cellules sans en affecter la viabilité. Ces résultats ont été constatés d'abord in vitro puis in vivo sur un modèle animal. Cependant, il n'existe pas, à notre connaissance, de travaux sur l'animal ayant étudié l'effet de l'association d'ultrasons et de microbulles de contraste sur la diffusion des antibiotiques dans les tissus vivants.

L'objectif de notre travail est d'évaluer sur l'animal l'effet de l'association d'ultrasons et de microbulles de contraste sur la diffusion dans les tissus de trois antibiotiques (amikacine, colimycine, vancomycine) administrés par voie intra-veineuse. Nous étudierons cette diffusion d'antibiotiques dans deux types de tissus : le tissu musculaire (« proof concept ») et le tissu pulmonaire (plus intéressant cliniquement, mais plus délicat à réaliser expérimentalement). Pour cela nous emploierons un modèle de lapin (race New Zealand) ventilé mécaniquement sous anesthésie générale avec un poumon condensé non infecté. A la fin de la procédure, les animaux anesthésiés seront sacrifiés par exsanguination. Le sacrifice est justifié par la nécessité de prélever et d'analyser les poumons et des lapins soumis à l'expérimentation. La technique d'exsanguination est justifiée par la nécessité d'un poumon exsangue pour les analyses de l'expérimentation. Quarante sept lapins seront nécessaires. Le calcul a été effectué en limitant au maximum l'effectif de chaque groupe d'expérimentation. L'expérimentation sur modèle animal de ce protocole est nécessaire afin de valider notre hypothèse avant d'envisager une application à l'humain. Le modèle de lapin a été choisi pour sa taille mieux adaptée que celle du rat à l'expérimentation (le rat est trop petit pour administrer correctement les ultrasons de manière ciblée sur le poumon).

Afin de respecter le principe des 3 R nous avons réduit le nombre d'animaux en calculant le plus petit nombre d'animaux nécessaires dans chaque groupe expérimental. Dans ce même objectif, l'étude de la pharmacocinétique se fera sur les mêmes lapins pour les 2 antibiotiques étudiés. Il n'est pas possible, dans notre étude, de remplacer le modèle animal vivant par un modèle mathématique, cellulaire ou tissulaire in vitro. En effet, nous étudions la diffusion d'un antibiotique au sein du tissu pulmonaire condensé en conditions de vie réelle, ce qui implique de nombreuses interactions entre le tissu pulmonaire et les tissus et les systèmes adjacents, principalement le système circulatoire. Afin de répondre aux critères de raffinement, les cages des lapins seront enrichies de tubes en carton, le temps d'acclimatation après le transport sera au minimum de 5 jours avant le début des expérimentations et chaque animal sera anesthésié avant le début de l'expérimentation et toutes les procédures se dérouleront sous anesthésie générale profonde de sorte que l'animal ne soit jamais exposé à la douleur physique ou au stress.

1213. Ce projet a pour but de comprendre la transmission de signaux auditifs vers le noyau subthalamique (NST).

Un grand nombre de maladies neurologiques telles que la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la schizophrénie (...) sont dues à un mauvais fonctionnement d'un groupe de structures du cerveau appelé les ganglions de la base, et particulièrement du NST, dont nous savons que son hyperactivité serait la cause des symptômes moteurs de la maladie de Parkinson. Comprendre le lien neuro-anatomique et fonctionnel précise de ce système avec d'autres structures dans le cerveau est important pour la compréhension de la fonction des ganglions de la base, toujours débattue à l'heure actuelle. L'éclaircissement du rôle des ganglions de la base permettrait de mieux comprendre ce qui ne marche plus dans ces différentes conditions neurologiques et contribuerait à un meilleur développement de stratégies thérapeutiques.

Dans ce contexte, nous avons récemment mis en évidence de nouvelles voies de projection connectant des structures cérébrales sensori-motrice visuelles et nociceptives et le NST. Nous avons également montré que des informations visuelles et nociceptives étaient transmises vers le NST or ceci n'avait jamais été décrit dans la littérature scientifique auparavant. De ce fait, la découverte d'entrées sensorielles vers le NST ouvre de nouvelles perspectives quant au rôle de cette structure au sein des ganglions de la base. Nous cherchons donc actuellement si d'autres stimuli sensoriels peuvent activer le NST tels que de signaux auditifs.

Cette expérience est composée de 4 procédures expérimentales et nécessitera l'utilisation de 95 rats maximum. Ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

L'ensemble des procédures proposées étant effectué sur des animaux anesthésiés sera de classe légère. Cependant, l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Ce projet a pour but de comprendre la transmission de signaux auditifs naturels de l'oreille au NST ce qui n'a jamais été effectué précédemment. De ce fait, il est impossible de remplacer notre préparation *in vivo* par un modèle cellulaire ou une simulation computationnelle.

1214. La trichomonose féline est une pathologie parasitaire responsable de diarrhées chroniques ou récidivantes du gros intestin, notamment chez les jeunes individus vivant en collectivité. *Tritrichomonas foetus*, le parasite responsable, réside principalement dans l'iléon distal et le côlon. Le Ronidazole (RDZ) est actuellement la seule molécule ayant démontré son efficacité pour le traitement de l'infection intestinale à *Tritrichomonas foetus* chez les chats. Cette molécule est complètement absorbée au niveau de l'intestin grêle supérieur et l'administration de formulations à libération immédiate provoque la libération rapide du principe actif, avec l'apparition précoce d'un pic plasmatique. Il semble que ce passage dans la circulation systémique du ronidazole soit à l'origine d'effets neurotoxiques chez le chat.

Pour améliorer le traitement de la trichomonose féline, nous avons mis au point une nouvelle formulation à libération retardée avec laquelle aucun effet indésirable n'a été reporté. Nous supposons que l'innocuité de cette formulation est liée à un relargage du ronidazole au niveau colique ce qui limite le passage systémique du ronidazole et par conséquent réduit les effets indésirables.

L'objectif de notre étude est de déterminer, pour notre formulation, le lieu de libération du ronidazole et d'évaluer son passage dans la circulation générale. Pour ce faire nous allons dans un premier temps évaluer *in vitro* la libération du ronidazole au niveau colique à partir de la forme galénique en réalisant un essai de désagrégation selon les normes de la pharmacopée européenne. Puis, dans un second temps, nous allons évaluer le passage systémique du ronidazole après administration unique à cinq chats sains. Le nombre de cinq chats a été retenu car c'est celui habituellement retrouvé dans la littérature et représente le nombre minimal requis pour obtenir des données fiables. Après l'expérimentation, les animaux seront remis dans la colonie du site. Les expérimentations conduites seront faites dans le respect de la règle des «3R» (ensemble de recommandations concernant les moyens à mettre en oeuvre pour limiter l'utilisation des animaux : Remplacer, Réduire et Raffiner), en particulier, le nombre d'animaux utilisés sera le plus faible possible tout en permettant l'obtention de résultats interprétables. Le modèle chat est, en tant qu'espèce cible, le plus indiqué pour étudier la pharmacocinétique du ronidazole. La connaissance de la pharmacocinétique de notre formulation de ronidazole, permettra de mieux comprendre son mécanisme d'action et de mieux adapter les posologies.

1215. La dépendance aux drogues est une pathologie complexe induisant une plasticité à long-terme du cerveau en réponse à l'usage répété de drogues. C'est une maladie multi-factorielle dont les conséquences humaines, sociétales et économiques sont particulièrement lourdes. Parmi les mécanismes neurobiologiques impliqués dans les comportements addictifs, nous étudions les processus épigénétiques. Le cannabis est la substance illicite la plus populaire en Europe.

Cette drogue active un système endogène dans le cerveau, qui comporte deux récepteurs. Le récepteur CB1 dont le rôle dans l'effet des drogues a largement été décrit et le récepteur CB2 dont les fonctions dans le cerveau restent très largement inexplorées.

Les mécanismes impliqués dans le fait que le cannabis conduise à l'usage d'autres drogues ne sont toujours pas clairement établis. Des études sur les rongeurs suggèrent que l'exposition régulière au cannabis facilite l'appréciation d'autres drogues, et notamment celle des opioïdes. Notre projet a pour but d'explorer le rôle du récepteur cannabinoïde CB2 dans la dépendance aux opiacés. Nous étudierons l'impact de son activation (unique ou répétée) sur le système opioïde dans des conditions basales ou dans un contexte de dépendance à la morphine. Nous évaluerons les régulations de l'expression des gènes et des protéines de ce système, notamment le récepteur opioïde mu. Nous examinerons également si des mécanismes épigénétiques sont impliqués dans ces neuroadaptations. Une étude équivalente contrôle sera menée avec un agoniste du récepteur CB1.

Nous utiliserons comme modèles des souris sauvages ainsi que des souris génétiquement modifiées exprimant les récepteurs opioïdes mu fonctionnels, en fusion avec une protéine fluorescente rouge, qui nous permettront de visualiser les récepteurs mu directement dans le système nerveux.

Remplacement : Dans la mesure où nos travaux portent sur l'effet de drogues sur le cerveau, de leur dynamique neurobiologique et leurs substrats épigénétiques, il n'est pas possible de recourir à un autre type de modèle d'étude qu'à celui de l'animal entier.

Raffinement : Nous avons optimisé le type de traitement chronique afin de limiter au maximum le nombre total d'injections reçues par les animaux et nous suivons tout particulièrement le site d'injection pour l'apparition de rougeur.

Réduction : nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux pour permettre notamment des analyses statistiques et adapté ce nombre selon le type d'expérience (12souris/groupe pour les analyses de biologie moléculaire et biochimique et 6 souris/groupe pour l'immunohistochimie). Les groupes expérimentaux sont notamment constitués de mâles et femelles.

Dans ce contexte de la règle des 3R, nous anticipons que ce projet nécessitera au total 1536 souris sauvages et 276 souris génétiquement modifiées. Ce projet comporte 3 procédures expérimentales.

1216. La dépendance aux drogues est une pathologie complexe induisant une plasticité à long-terme du cerveau en réponse à l'usage répété de drogues. C'est une maladie multi-factorielle dont les conséquences humaines, sociétales et économiques sont particulièrement lourdes. Un défi majeur en neurosciences est d'en comprendre les bases moléculaires. Parmi les

mécanismes neurobiologiques impliqués dans les comportements addictifs, nous étudions les processus épigénétiques incluant la méthylation de l'ADN, l'acétylation des histones et les micro-ARN. Il a été montré que la cocaïne induit des processus épigénétiques qui participent à la régulation de gènes et donc aux adaptations à long terme du cerveau. Par ailleurs, le cannabis, drogue illégale la plus consommée en France, interagit avec le système cannabinoïde endogène qui joue un rôle dans un grand nombre de fonctions, et notamment dans l'addiction.

Dans ce système les récepteurs cannabinoïdes sont impliqués dans la dépendance au cannabis et jouerait également un rôle dans les effets d'autres drogues. Dans ce contexte, nous nous intéressons aux rôles potentiels du système endocannabinoïde dans la mise en place des adaptations épigénétiques liées à la cocaïne. Notre objectif global est donc de comprendre ces mécanismes d'adaptation au niveau de structures du cerveau impliquées dans le circuit de la récompense dans le contexte de la dépendance à la cocaïne et d'étudier les interactions potentielles avec le système endocannabinoïde. Remplacement : Dans la mesure où nos travaux portent sur l'effet de drogues sur le cerveau, de leur dynamique neurobiologique et leurs substrats épigénétiques, il n'est pas possible de recourir à un autre type de modèle d'étude qu'à celui de l'animal entier. Raffinement : Nous avons optimisé le type de traitement chronique afin de limiter au maximum le nombre total d'injections reçues par les animaux et nous suivons tout particulièrement le site d'injection pour l'apparition de rougeur. Dans le cas de chirurgie, un suivi particulier des rats est réalisé au quotidien avec surveillance de paramètres physiologiques et comportementaux pouvant suggérer un mal-être de l'animal.

Réduction : nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux pour permettre notamment des analyses statistiques et avons adapté ce nombre selon le type d'expérience (10 rat/groupe pour les analyses de biologie moléculaire et biochimique et 12 rats/groupe pour le comportement de la prise volontaire de drogue). Dans ce contexte de la règle des 3R, nous anticipons que ce projet nécessitera au total 408 rats. Ce projet comporte 2 procédures expérimentales.

1217. Au cours des deux dernières décennies, les progrès en génétique ont permis de développer de nouvelles stratégies pour l'élaboration de candidats vaccins dirigés contre des maladies parasitaires, virales ou bactériennes. Parmi ces stratégies, la délétion de gènes de virulence d'agents pathogènes est fréquemment utilisée.

Nous disposons de souches vaccinales atténuées et nous souhaitons les utiliser comme vecteur d'expression d'antigènes pertinents afin de générer une réponse immunitaire efficace contre cet antigène.

L'objectif du programme de recherche, objet de la présente demande, est d'évaluer le potentiel de nos souches vaccinales parasitaires en tant que vecteur et notamment :

- de démontrer l'habilité de nos vecteurs à induire chez la souris une réponse immunitaire pertinente et adaptée,
- d'optimiser la réponse immunitaire générée chez la souris, notamment, par l'ajout d'un adjuvant peptidique fusionné à l'antigène hétérologue exprimé ou par l'expression simultanée de plusieurs antigènes.

Pour atteindre ces objectifs majeurs et en l'absence de méthodes de substitution réellement pertinentes, six expérimentations impliquant des modèles animaux ont été définis. Les protocoles expérimentaux et notamment le nombre de souris inclus dans les expérimentations ont été analysés avec soin pour permettre 1. d'obtenir des résultats significatifs et 2. de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisé. Un suivi régulier sera réalisé tout au long des expérimentations afin de garantir le bien être des animaux et de réduire au maximum la souffrance qui pourrait être induite. Au final, 710 souris seront utilisées dans ces différents protocoles pendant les 5 ans du projet

1218. L'objectif du programme IPEV "Oiseaux Plongeurs" est d'étudier les stratégies énergétiques d'oiseaux marins s'alimentant par plongée (manchots, cormorans, pétrels), ces espèces jouant un rôle majeur dans les chaînes alimentaires de l'océan Austral. Une approche pluridisciplinaire est menée pour répondre à des problématiques de recherches fondamentales et appliquées en écologie, physiologie et en éthologie (comportement de déplacement, de plongée et de prédation). Les deux questionnements principaux sont les suivants : 1/ Comment ces animaux à respiration aérienne et à sang chaud (endothermes), épargnent leur énergie pendant leurs longs voyages alimentaires en mer (eau à moins de 10°C) et au cours de leur plongées alimentaires (plusieurs minutes à plusieurs centaines de mètres de profondeur) ? 2/ Comment ces animaux vont s'adapter aux perturbations de la chaîne alimentaire de l'océan Indien, en conséquence des modifications climatiques très rapides des régions polaires ? Dans les deux cas, les réponses sont physiologiques et comportementales. Pour les étudier, il est nécessaire d'équiper quelques individus de ces espèces de microsystèmes d'acquisition de données embarqués (« les loggers »), cette approche moderne étant la seule adaptée au suivi de la faune sauvage libre de ses mouvements (appelée le « Bio-logging »). Ces loggers sont placés de façon externe (fixés aux plumes du dos ou à un harnais) quand il s'agit de mesurer leurs activités de plongée ou les paramètres physiques de leur milieu (luminosité, salinité, température de l'air ou de l'eau). Les données sont accumulées dans les mémoires du logger et récupérées au retour à terre de l'animal. Une alternative, par exemple pour la localisation des animaux en mer, est l'utilisation de balises Argos et de GPS, l'information arrivant directement au laboratoire via les satellites. Afin d'évaluer leur dépense énergétique et de comprendre leurs adaptations physiologiques à la plongée en apnée, où pour mesurer leur prise alimentaire, les individus sont équipés sous anesthésie générale (gazeuse) de loggers mesurant la fréquence cardiaque et la température interne. Les opérations se font selon des protocoles rigoureux, mis à jour régulièrement avec nos collègues vétérinaires, dans le plus grand souci de l'intégrité physique et physiologique de l'animal. Les animaux sont capturés, manipulés et équipés dans le plus grand respect de leur bien-être, pour des raisons éthiques évidentes mais aussi pour ne pas modifier leur comportement en mer, ni leur succès reproducteur. Par ailleurs, le nombre d'individus choisi est toujours restreint au strict minimum, permettant une approche statistique solide : 10 au maximum par groupe expérimental pour des questions de physiologie, jusqu'à 30 pour des questions d'écologie où l'on rencontre une plus grande variabilité interindividuelle. Ces exigences éthique et scientifique sont rendue possible par la



grande expérience de notre équipe, impliquée depuis maintenant 30 ans dans le domaine du bio-logging sur les oiseaux marins.

Quarante manchots royaux seront utilisés, dans 3 protocoles différents, afin d'étudier les thématiques suivantes :

1/ Comprendre les variations de températures chez le manchot royal adulte en mer (Manip Piscine)

2/ Réaliser le suivi de une à trois années de manchots royaux grâce à l'utilisation d'enregistreurs miniatures

3/ Tester la mise en place d'un dispositif de marquage permanent « piercing » sur des individus adultes.

Comme pour les années précédentes (programme IPEV 394), les arguments qui permettent de justifier l'utilisation de ces animaux selon les 3 protocoles proposés sont les suivants : Dans nos protocoles nous intégrons et respectons la règle des 3 R. En termes de Raffinement de nos études nous tenons compte des caractéristiques de la biologie de ces oiseaux. Toutes les précautions sont prises pour perturber à minima les animaux et limiter le stress : intervention de courte durée, équipe qualifiée et expérimentée, bagage temporaire, anesthésie gazeuse générale ou locale et tranquillisation systématique, surveillance attentive et critères spécifiques, suivi des risques liés à la fixation externe. Toutes les précautions sont prises aussi lors des procédures de captivité temporaire ou lors des chirurgies (asepsie et analgésie adaptées). Enfin, si dans ce type d'étude il n'est pas possible de Remplacer littéralement les modèles animaux nous avons pris soin de choisir pour répondre à notre problématique une espèce animale en effectifs importants et présente dans de nombreux sites au travers de l'Océan Austral ; de plus nous ne travaillons que dans une seule des nombreuses colonies de l'archipel Crozet. Il n'est pas possible de répondre à ces problématiques d'adaptations écophysiologiques de l'animal à son milieu sur des modèles animaux de laboratoire ; enfin, si dans ce type d'étude il n'est pas possible de Remplacer littéralement les modèles animaux nous avons pris soin de choisir pour répondre à notre problématique une espèce animale en effectifs importants et présente dans de nombreux sites au travers de l'Océan Austral ; de plus nous ne travaillons que dans une seule des nombreuses colonies de l'archipel Crozet avec un effectif réduit à son maximum.

1219. La clozapine est un antipsychotique de deuxième classe très largement utilisé pour le traitement des schizophrénies réfractaires et des troubles bipolaires. Bien que l'efficacité thérapeutique de la clozapine soit largement reconnue, ce traitement entraîne cependant des effets indésirables importants dont une déplétion des cellules granulaires sanguines (neutrophiles, éosinophiles, basophiles). Ce traitement nécessite donc une surveillance rapprochée par l'analyse du sang puisqu'il peut entraîner la mort des patients. L'objectif final de notre étude est de développer un/des nouvel (aux) analogue(s) de la clozapine aussi efficace que la clozapine mais qui n'induirait pas d'effets secondaires fatals. Afin d'y parvenir, nous souhaitons : - Développer un modèle murin : il s'agit de d'identifier une souche de souris et une méthode (basée sur l'évaluation motrice) suffisamment sensible pour mettre en évidence les effets de la clozapine au niveau extrapyramidale. En effet, l'utilisation d'antipsychotiques conduit à effets dits « extrapyramidaux » qui sont caractérisés par altérations motrices proches de celles observés dans la maladie de Parkinson (tremblements, rigidité musculaires...)- Déterminer les paramètres expérimentaux qui démontrent l'efficacité pharmacologique de la clozapine. - Comparer l'efficacité pharmacologique de nouveaux analogues de la clozapine. Il est important de noter que la caractérisation de l'effet de la clozapine sur les granulocytes ne peut se faire que sur sang humain puisque aucune étude sur la souris n'a pu montrer une toxicité de la clozapine sur les cellules granulaires murines. En revanche, l'observation et la caractérisation des effets centraux, c'est-à-dire l'efficacité de l'antipsychotique, ne peut se faire qu'au niveau de l'animal tout entier. En effet, pour prédire l'efficacité d'antipsychotiques, une étude est réalisée sur le comportement de l'animal par l'intermédiaire de tests comportementaux. Il n'existe aucune méthode de substitution pour la caractérisation de molécules antipsychotiques. Afin de caractériser les effets de la clozapine, nous allons principalement étudier l'activité motrice des souris après l'injection de la clozapine. Chez les patients, ces effets sont caractérisés par des perturbations des mouvements et des tremblements qui apparaissent à long terme (effets extrapyramidaux). Chez la souris, ce sont ces perturbations dans les mouvements (qui apparaissent dès l'administration des molécules) qui permettent de juger de l'efficacité des antipsychotiques. L'avantage de ces tests sur l'évaluation motrice des animaux, contrairement aux tests habituellement réalisés pour les antipsychotiques, ne présentent pas de caractère traumatisant comme les tests basés sur l'emploi de chocs électriques. L'objectif de notre projet est de développer un modèle d'étude qui permettrait de comparer l'efficacité de la clozapine à celle de nouveaux analogues. Les tests utilisés sont : le test de Catalepsie, un test de marche, et de coordination motrice (agilité). Cette étude sera réalisée de manière échelonnée et ne sera poursuivie que si les tests élaborés sont suffisamment sensibles pour observer des effets de dose, et de reproductibilité des résultats. Les groupes seront constitués de 12 animaux pour pallier aux variations inter-individus et comportera 276 souris si nous utilisons comme modèle les souris MRL/lpr et MRL/mp. En revanche, si nous décidons d'utiliser un fond génétique différent, cette étude ne comportera que 168 animaux.

1220. Chez les poissons Cichlidae, le groupe des Tilapias comprend 3 genres distingués selon certains caractères comportementaux observés lors de la reproduction : 1) le genre *Sarotherodon* regroupe les espèces à incubation buccale paternelle ou biparentale; 2) le genre *Oreochromis* regroupe les espèces à incubation buccale strictement maternelle; et 3) le genre *Tilapia* regroupe les espèces qui pondent sur des substrats. En Côte d'Ivoire, *Sarotherodon melanotheron* se rencontre en eau saumâtre et en eau douce. *Oreochromis niloticus* se trouve uniquement en eau douce. L'aquaculture ivoirienne porte principalement sur les espèces *S. melanotheron*, *O. niloticus* et *O. aureus*. En milieu naturel, *S. melanotheron* montre une croissance lente comparée à *O. niloticus*. Par ailleurs *O. niloticus* montre un taux de survie faible quand il est produit en eau saumâtre. De récents travaux ont montré une possibilité d'hybridation entre ces 2 espèces en captivité. Les hybrides obtenus entre *S. melanotheron* et *O. niloticus* ont montré une bonne croissance en eau saumâtre, améliorant ainsi le potentiel aquacole des poissons. Aucun résultat n'a cependant été publié sur leur comportement de reproduction dans cette situation

d'hybridation. Par ailleurs, les transformations anthropiques de milieux aquatiques telles que la création de canaux et la construction de barrages amènent aujourd'hui ces deux espèces à vivre dans un même milieu. A ce jour, aucun hybride naturel n'a été observé dans les études sur la biodiversité ou capturé par les pêcheurs locaux. En revanche, des hybridations naturelles entre ces 2 genres ont été obtenues en captivité. De ces constats, se pose la question suivante : bien que différents, les comportements reproducteurs de *S. melanothron* et *O. niloticus* peuvent-ils, dans certaines situations, devenir compatibles pour aboutir à l'obtention naturelle d'hybrides viables, fertiles et interféconds? Si la réponse est positive, on peut y voir un potentiel intérêt agronomique pour l'aquaculture, ou un potentiel problème écologique. Pour répondre à ces interrogations, il est impératif d'acquérir des connaissances scientifiques sur le comportement reproducteur de ces deux espèces et de leurs hybrides. Dans cette étude, nous chercherons à décrire le comportement de reproduction et d'interaction sociale des géniteurs *S. melanothron* et *O. niloticus* face à un partenaire de l'une ou l'autre espèce. Des analyses comportementales seront complétées par une étude bioacoustique en vue d'explorer pour la première fois les capacités de production de son chez ces espèces en situation d'appariement croisé. Un attendu supplémentaire sera la recherche d'un indicateur prévisionnel de l'activité reproductrice. Ce projet prendra en compte la règle des 3R de la façon suivante: S'agissant d'étude comportementale sur les poissons, les animaux ne peuvent pas être remplacés par un modèle *in vitro*. Le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum tout en permettant des analyses statistiques des résultats des expériences. Le nombre prévu est de 80 individus au total (20 par sexe et par espèce). Enfin, les conditions d'élevage des animaux utilisés (hébergement, soins, niveau de stress) ont été raffinées afin de garantir un état de stress le plus faible possible.

1221. L'étude de la distribution d'une molécule active au niveau des différents organes et fluides de l'organisme est indispensable. Alors qu'administrée localement, cette molécule peut être retrouvée à distance de son site d'injection. Ainsi, les éventuels effets indésirables de la molécule peuvent être mieux anticipés. Dans cette étude, pour être dosée la molécule est radiomarquée à l'iode-125 (émetteur gamma de faible énergie, 29 keV, présentant une demi-vie de 60 jours) puis administrée chez le rongeur. L'ensemble du personnel intervenant dans cette étude est habilitée à manipuler la radioactivité. Les doses injectées sont choisies par rapport à l'activité de la molécule qui a été caractérisée par un test fonctionnel indolore lors de précédentes études. La quantité de radioactivité administrée en Iode-125 sera inférieure à 0,5 microcurie (18.5 kBq) soit une dose ne présentant aucun effet nocif pour la santé de l'animal. L'activité de la molécule radiomarquée injectée est vérifiée par ce même test fonctionnel chez la souris. Une cinétique de distribution de la molécule est réalisée chez le rat. La bonne connaissance de la molécule étudiée permet de réduire le nombre d'animaux utilisés à 4 animaux pour une dose de composé et par temps de cinétique afin de prendre en compte la variabilité interindividuelle et pouvoir interpréter les résultats. Le nombre total d'animaux nécessaires pour l'évaluation de 4 composés est de 72 souris et 208 rats. En fin protocole, les animaux euthanasiés sont stockés dans un congélateur jusqu'à décroissance totale de la radioactivité puis ils sont traités en tant que déchets biologiques.

Les procédures utilisées ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacés par des méthodes alternatives n'impliquant pas d'animaux vivants. De plus les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées visent à réduire le plus possible toute forme de douleur, souffrance ou stress de l'animal avec un souci de prise en charge du bien-être de l'animal.

Ainsi, l'injection des composés est faite sous anesthésie générale gazeuse et les milieux d'hébergement sont enrichis avec du papier accordéon pour faciliter la nidation (souris) ou des bâtonnets de bois (rats).

1222. La neuroinflammation est une composante majeure des atteintes cérébrales et plus particulièrement des maladies neurodégénératives. L'étude de sa régulation s'est considérablement accentuée ces dernières années. Au niveau cérébral, il a été montré que l'activation des récepteurs nicotiques alpha-7 améliorerait les fonctions cognitives dans plusieurs modèles animaux mimant la maladie d'Alzheimer. Ce projet a pour objectif d'étudier les effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires potentiels d'agonistes des récepteurs alpha-7 dans un modèle expérimental de neuroinflammation et plus particulièrement, d'élucider le mécanisme d'action de ces agonistes ainsi que leurs effets thérapeutiques.

Néanmoins nous avons pris en considération la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) pour minimiser le nombre d'animaux utilisés.

Le modèle de neuroinflammation utilisé sera celui de la lésion excitotoxique intra striatale induite par l'acide quinolinique chez le rat Wistar mâle adulte. Ce type d'étude nécessite l'utilisation du rat qui est l'espèce la plus adaptée en raison du modèle de lésion à l'acide quinolinique bien décrit pour cette espèce ainsi que de son gabarit et de sa robustesse. Seuls les rats mâles seront utilisés dans cette étude afin de s'affranchir des variabilités intersexes dû en partie aux effets hormonaux présents chez les femelles. (Remplacement)

Cette étude comportera des groupes d'animaux lésés et recevant ou non des agonistes alpha7 nicotiques à différentes doses. Différents paramètres seront évalués dans ces groupes -Imagerie de la neuroinflammation-Immunohistochimie *in vitro*. Un total de 48 rats Wistar mâle est nécessaire à la totalité de l'étude pour une durée de 2 ans. Ils seront hébergés en présence d'un enrichissement comprenant un tunnel en plastique, de l'eau et de la nourriture à volonté, la douleur sera évaluée chaque jour en prenant en compte les critères suivants: apparition d'une agressivité, automutilation, et perte de poids (Raffinement). Les rats seront traités pendant 5 jours (J0 à J4) avec deux injections par jour soit de l'agoniste (deux agonistes différents seront étudiés, soit du véhicule. L'étude des effets de ces agonistes sera réalisée par imagerie et immunohistochimie. L'utilisation de l'imagerie permet de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce protocole : les cerveaux des rats utilisés pour l'imagerie seront ensuite utilisés pour l'analyse par immunohistochimie. Par ailleurs, l'effectif de 48 rats correspond à

l'effectif minimum pour pouvoir constituer ensuite 3 lots (agoniste 1, agoniste 2, témoins) qui seront comparés entre eux par des tests statistiques. (Réduction).

1223. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, elles sont à l'origine de 30% de la mortalité mondiale totale. Il est possible de prévenir ces pathologies (principalement cardiopathie coronarienne et accident vasculaire cérébral) en intervenant sur les facteurs de risques (hypertension artérielle, diabète, obésité, dyslipidémie, tabagisme...). Ces maladies cardiovasculaires et ces facteurs de risque associés peuvent être étudiés au laboratoire grâce aux modèles précliniques chez l'animal et ainsi permettre la découverte de nouvelles thérapies. Dans le cadre de nos recherches dans le domaine cardiovasculaire, il est nécessaire de mesurer les paramètres physiologiques, tels que la pression artérielle, la fréquence cardiaque et les altérations de l'électrocardiogramme, mesures réalisables uniquement chez l'animal vivant. Ce projet nous permet d'évaluer les effets hémodynamiques de produits pharmacologiques en phase aiguë et/ou chronique et ainsi obtenir des informations sur la tolérance et sur la cinétique des effets hémodynamiques. Il s'inscrit dans le cadre du screening secondaire, à savoir que seuls les produits ayant une activité pharmacologique intéressante observée sur des tests in vitro et/ou ex vivo seront étudiés afin d'évaluer leur efficacité in vivo. L'évaluation de ses paramètres hémodynamiques est indispensable à la sélection d'un nouveau candidat médicament, à la fois pour documenter son efficacité thérapeutique mais également son innocuité. Pour ce faire, trois méthodes existent. La première, la télémétrie, est une méthode de référence permettant la mesure des paramètres hémodynamiques à distance, en temps réel, sur une période pouvant aller jusqu'à 6 mois au sein de l'animalerie, sans contrainte pour l'animal et dans son environnement habituel. Cette technique nécessite la mise en place de l'implant sous anesthésie générale pendant toute la durée de l'acte chirurgical avec réveil. Les contraintes techniques de ces implants obligent un hébergement individuel. Les données obtenues par cette technique sont fiables et reproductibles. Les animaux sont utilisés à plusieurs reprises intercalées de périodes de récupération « wash-out » permettant ainsi de réduire le nombre utilisé. La seconde technique consiste en l'implantation de cathéters en voie artérielle et veineuse afin de mesurer les paramètres hémodynamiques chez l'animal vigile dans son environnement habituel. La mise en place des cathéters est réalisée sous anesthésie générale pendant toute la durée de l'acte chirurgical. Pour une bonne récupération post opératoire, les animaux sont placés en hébergement individuel. Les animaux peuvent être réutilisés une fois, en respectant une période de récupération entre chaque administration, et ainsi travailler avec des animaux appariés où chaque animal peut être son propre contrôle, permettant à une utilisation réduite de l'animal. La troisième technique consiste en la mesure des paramètres hémodynamiques sur animal anesthésié et sans réveil. L'anesthésie permet de travailler dans un environnement contrôlé qui réduit la variabilité des mesures. Cette procédure peut être réalisée à la suite de la technique de télémétrie, réduisant ainsi le nombre d'animaux. Un enrichissement du milieu est apporté à tous les animaux en hébergement, quelle que soit la technique dans laquelle ils sont ou doivent être inclus, sous la forme de bâtonnets de bois à ronger. Cet apport permet en particulier de limiter les contraintes liées aux hébergements individuels imposés par certaines de ces techniques. La répétabilité des études sur un même animal grâce à la technique de télémétrie, l'utilisation d'animaux appariés pour la mesure hémodynamique chez le rat vigile, les mesures anesthésiées reproductibles et le couplage de ces différentes procédures sur un même animal permettent de réduire le nombre d'animaux nécessaire à la démonstration de l'efficacité d'un candidat médicament. Ces techniques ainsi que l'enrichissement du milieu contribuent donc au raffinement et à la réduction, composantes de la règle des 3R.

Les rats spécifiquement étudiés dans ce projet présentent une hypertension naturelle issue d'une mutation génétique spontanée, qui va mimer le développement de la pathologie humaine et l'apparition des signes cliniques qui sont associés tout au long de leur vieillissement sur plusieurs stades de développement. Ce modèle est particulièrement pertinent dans le but d'étudier la rigidité artérielle, ainsi que des atteintes cardiaques et rénales. De plus ce modèle représente un intérêt particulier pour l'exploration des mécanismes physiopathologiques à l'origine d'un défaut de relaxation cardiaque ; pathologie méconnue qui représente près de la moitié des insuffisances cardiaques. Pour toutes ces raisons ce modèle est d'un intérêt majeur dans l'évaluation des effets sur le système cardiovasculaire de nos candidats médicaments.

Nous travaillons avec des animaux au développement mature car l'objet du projet est de travailler avec des rats adultes jeunes (à partir de 10 semaines) et des rats adultes vieux (à partir de 50 semaines) pour étudier l'effet de l'âge sur le système cardiovasculaire. Un âge de maintien maximum de 65 semaines a été déterminé afin de limiter le risque d'accidents vasculaires cérébraux et la survenue de signes de détérioration de l'état général. Une observation visuelle, comportementale quotidienne, ainsi qu'un suivi hebdomadaire de prise alimentaire et hydrique sont assurés par les expérimentateurs. En cas de constatation d'un signe de souffrance, les points limites seront appliqués.

Les données de la littérature chez les rongeurs indiquent une utilisation de 8-10 animaux par groupe : 'contrôle', 'traité candidat médicament', 'traité médicament de référence' pour étudier les effets hémodynamiques d'un composé. D'après nos estimations, nous prévoyons l'utilisation de 150 rats par an à savoir 750 animaux sur 5 ans. Cette estimation comprend des rats hypertendus à différents stades de vieillissement et leur contrôle normotendu.

1224. Cette formation organisée par la Plateforme Scientifique et Technique Animalerie de l'Université de Tours a pour objectif de former les internes en chirurgie à la microchirurgie, en réalisant sur le petit animal des procédures impliquant des vaisseaux sanguins, des tendons, des nerfs... Ces procédures sont nécessaires à la réalisation de pratiquement tous types de macro- ou de microchirurgie humaine. La formation prévoit d'avoir recours à des rats avec lesquels seront mis en œuvre des dissections et des anastomoses de vaisseaux sanguins. Le DU se déroule sur une année universitaire à raison de 20 séances obligatoires par étudiant; 200 rats sont prévus par an en se basant sur un maximum de 10 étudiants inscrits pour l'année. Les 200 rats se déclinent donc ainsi: 1 rat / séance / étudiant X 10 étudiants X 20 séances = 200 rats. Il faut rajouter 30 rats pour

l'examen final qui nécessite 3 rats par étudiant. Pour 5 ans, il faut donc compter un maximum de  $200 \times 5 + 30 \times 5 = 1150$  rats. Cependant, une partie des animaux sont 'réutilisés', ils proviennent de formations réglementaires à l'expérimentation animale réalisées sur le site tous les ans (procédures légères). Les procédures mises en œuvre sont toutes réalisées sous anesthésie et encadrées par des personnes compétentes (chirurgien, personnels habilités de la plateforme pratiquant en routine des procédures chirurgicales avec les rats). Les animaux sont élevés en groupes sociaux et leur environnement est 'enrichi' (Papier, tubes plastiques).

1225. Les troubles de la mémoire sont fréquents au cours du vieillissement normal puisqu'il touche jusqu'à 50% des sujets âgés de plus de 55 ans. Ils peuvent également être liés à des pathologies comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington ou même être associés aux troubles psychiques comme l'anxiété ou la schizophrénie. A l'heure actuelle, seuls quatre médicaments (donepezil, rivastigmine, galantamine et memantine) sont utilisés pour le traitement de ces troubles. Les effets de ces molécules restent modestes et ne sont pas dénués d'effets secondaires dont les plus courants sont des troubles gastro-intestinaux. Ainsi, la recherche vise à trouver un médicament plus efficace sans effets secondaires majeurs et à disséquer les mécanismes conduisant aux troubles cognitifs. A l'heure actuelle, le criblage des molécules aux effets sur la mémoire se fait sur des modèles animaux. La capacité d'apprentissage et de mémoire chez les rongeurs non transgéniques ayant un dysfonctionnement mnésique naturel lié au vieillissement ou induit artificiellement est évalué en présence et en absence des molécules étudiées. Dans notre projet nous mettons en œuvre différents protocoles d'évaluation de la mémoire chez le rat et nous testons l'effet de traitement sur les performances cognitives des animaux. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 20 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soin aux animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle afin de ne pas multiplier les groupes témoins. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 8000 rats est envisagée.

1226. Dans le cadre du diabète de type 2, le pancréas sécrète de l'insuline, mais celle-ci ne peut jouer efficacement son rôle. Différents traitements sont à l'heure actuelle utilisés afin d'améliorer cette efficacité. Concernant le diabète de type 1, le pancréas ne sécrète plus d'insuline. Le principal traitement est alors l'apport exogène d'insuline. Cependant, ce traitement à long terme, le manque en insuline par moments et l'hyperglycémie chronique peuvent également conduire à une diminution de l'efficacité de l'insuline (résistance à l'insuline). Ce manque d'efficacité conduit alors à un échec du traitement. Cette diminution d'efficacité de l'insuline a été étudiée dans le cadre du diabète de type 2 mais pas dans celui du diabète de type 1. Dans ce contexte, la molécule dénommée LNP599 a démontré un effet significatif sur l'efficacité de l'insuline. Cette étude a été menée dans un modèle de rat ayant une intolérance au glucose et une résistance au effet de l'insuline, signes cliniques d'un début de diabète de type 2. Au vu de ce résultat obtenu dans un modèle de diabète de type 2, nous souhaitons démontrer l'effet bénéfique de la LNP599 sur des rats diabétiques de type 1. L'étude va se réaliser en deux temps. Le premier consistera en la validation de l'amélioration de l'efficacité de l'insuline à l'aide de la LNP599 sur le modèle de rats Wistar mâles diabétique de type 1 obtenu après injection d'une substance toxique pour les cellules du pancréas sécrétant l'insuline. Dans un second temps, si cet effet est démontré sur notre modèle, alors une étude sur la résistance à l'insuline sera réalisée sur le modèle de rats Wistar rendu diabétique. Le projet nécessitera 90 rats Wistar (60 pour la première phase et 30 pour la deuxième). Le rat est le modèle d'étude standard. Le modèle d'induction du diabète est maîtrisé au laboratoire. La règle des 3R, soit réduire, raffiner, remplacer est respecté. Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaires pour obtenir des résultats statistiques et ne pas avoir à recommencer l'étude. Les animaux seront hébergés à 5 par cage avec eau et nourriture ad libitum. Pour réduire le stress, les cages seront enrichies à l'aide de cylindres rouges en PVC. Les rats seront placés en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie réglementaire. Durant toute la durée de l'étude, les rats seront examinés quotidiennement afin de détecter d'éventuels symptômes de douleur. Si des signes de douleur sont observés, des injections d'anti-biotiques, d'anti-inflammatoires et d'anti-douleurs seront réalisées. Si les points limites sont atteints, les rats seront immédiatement euthanasiés. Par ailleurs, les litères seront changées très fréquemment et deux biberons par cage seront mis en place afin de faciliter l'accès à l'eau aux rats diabétiques.

1227. La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après l'étude multicentrique STAR\*D, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement. En outre, les patients rétablis à la suite d'un premier épisode dépressif présentent un risque de récurrence dans les 6 mois évalué à 50% en cas d'arrêt du traitement et il a été montré qu'en l'absence de traitement 15% des patients succombent à la suite d'un suicide et qu'entre 60% et 80% des suicides (entre 10000 et 15000 par an en France) sont le fait d'individus fortement dépressifs. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements et la compréhension des mécanismes physiopathologiques et étiopathologiques sous-jacents. Certains de ces mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant l'utilisation de techniques d'immunohistochimie par exemple. Une restriction pour les recherches précliniques qui veulent étudier le mécanisme d'action des antidépresseurs (ADs) chez l'animal est qu'elles sont surtout réalisées chez des animaux

normaux, qui ne sont pas dans un état « dépressif-like » (similaire à un état dépressif). Or les traitements aux antidépresseurs induisent très peu d'effets chez l'homme sain. Ces études ont été une première étape pour définir le spectre des actions possibles des ADs mais demeurent limitées pour déterminer les effets qui sont réellement nécessaires à l'action thérapeutique. C'est la raison pour laquelle nos travaux se basent sur l'utilisation du modèle du stress chronique léger imprédictible (SCI). Ce modèle de stress chronique imprédictible a été validé pharmacologiquement, et semble le mieux adapté et le plus pertinent pour étudier la pathophysiologie de la dépression et le mécanisme d'action des ADs. P. Le but de cette expérience est d'évaluer les effets d'un stress chronique sur l'expression des microRNAs dans une partie du cerveau : le cortex cingulaire. En effet, ces RNAs sont parfois associées aux états dépressifs et le cortex cingulaire antérieur est l'une des régions cérébrales les plus fortement associées aux états dépressifs. Nous envisageons donc d'exposer des souris à un stress chronique, de prélever le cortex cingulaire antérieur pour effectuer ensuite des analyses génomique. D'autres zones du cerveau seront aussi prélevées dans un but comparatif. Il s'agit en particulier de l'hippocampe, de l'amygdale et de la région de l'habenula, car ces trois zones sont impliquées dans les états dépressifs. En outre, étant donné qu'il existe une grande variabilité de la réponse au stress, nous envisageons, au sein du lot stressé, de comparer les l'expression des mRNA et microRNAs des souris les plus vulnérables à celui des souris les moins sensibles au stress.

Pour cette expérience, 36 souris sont requises. En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude:

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

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

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=12 sujets par groupe pour les aspects comportementaux et n=6 pour l'expression des mRNAs). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

1228. La sélection génétique classique a permis d'améliorer les performances de croissance et d'efficacité alimentaire des poulets de façon spectaculaire. Cependant, cette évolution de performances semble s'accompagner d'une plus grande fragilité des animaux face aux agressions environnementales, notamment pathogènes. Cela pourrait être dû à une utilisation massive des ressources alimentaires ingérées par l'animal pour sa croissance, laissant ainsi une part des ressources plus faible pour les autres fonctions, telles que la fonction immunitaire. Ce phénomène est appelé « trade-off ». L'objectif de notre projet est de vérifier comment se réalise l'équilibre entre performances de croissance et d'efficacité alimentaire et immunité. Pour ce faire, nous disposons de deux lignées de poulets sélectionnées pour leur faible ou forte efficacité digestive (et donc alimentaire), dont nous souhaitons comparer les systèmes immunitaires, au travers de différents paramètres tels que la formule sanguine, la réponse aux procédures vaccinales utilisées en élevage et l'expression de gènes clefs du système immunitaire. Ces travaux seront réalisés sur un total de 55 animaux.

Respect de la règle des 3R:

- Remplacer : Pour évaluer le lien entre immunité et digestion, il faut disposer des mesures sur les animaux et le modèle le plus adapté pour l'évaluer sur le poulet est le poulet lui-même

- Réduire: des calculs statistiques ont été effectués pour estimer le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de cette expérience

- Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions comparables à celles des poulets d'élevage et les prises de sang limitées au strict minimum (2 fois) pour limiter leur stress

1229. Cette formation organisée par la Plateforme Scientifique et Technique Animalerie de l'Université de Tours a pour objectif de permettre aux personnes concevant et réalisant des procédures expérimentales, d'obtenir auprès du ministère de l'agriculture l'autorisation de pratiquer des actes chirurgicaux sur les animaux (rongeurs et lapins). Pour participer à cette formation, les candidats doivent être titulaires d'une formation initiale qui les autorise à pratiquer l'expérimentation animale. Sont concernés les techniciens, chercheurs, enseignants/chercheurs (Scientifiques, Médecins hors chirurgiens, Pharmaciens) pratiquant ou désirant pratiquer la chirurgie expérimentale sur animaux vivants dans le cadre de leurs projets de recherche. La formation prévoit d'avoir recours à des rats et à des lapins dans un des modules spécifiques proposés : le module intitulé: 'Initiation à la chirurgie expérimentale' et qui comporte plusieurs ateliers mis en œuvre pour les stagiaires lors de deux journées : 1. Chirurgie stéréotaxie chez le rat ; 2. Pose de cathéters (artère / veines), sutures et réveil chez le rat ; 3. Microchirurgie aortique chez le rat ; 4. Dissection du rein et des ovaires puis ligatures des vaisseaux sanguins, ovariectomie ou néphrectomie chez le lapin. Six lapins et 18 rats sont prévus pour un maximum de 12 étudiants par session. Une session annuelle est réalisée. Ce qui correspond au maximum à 30 lapins et à 90 rats pour une durée de 5 ans. « Reduce » : Les animaux sont tous 'réutilisés', ils proviennent de formations réglementaires habilitant les stagiaires à la pratique de l'expérimentation animale, qui sont réalisées sur le site tous les ans (procédures légères). « Replace » : Certains aspects techniques (anatomie, sutures...) seront appréhendés avec des animaux morts conservés à partir de protocoles mis en œuvre dans la structure, et/ou de pièces anatomiques achetées. D'autres aspects seront abordés à partir de vidéos. « Refine » : Les procédures mises en œuvre sont toutes réalisées sous anesthésie et encadrées par des personnes compétentes (vétérinaire,

chirurgien, personnels habilités de la plateforme et techniciens pratiquant en routine des procédures expérimentales incluant la chirurgie). Les rats sont élevés en groupes sociaux et leur environnement est 'enrichi' (Papier, tubes plastiques). Les lapins sont maintenus isolément, leur environnement est 'enrichi' (Tubes cartonnés).

1230. Les maladies auto-immunes sont dues à un dysfonctionnement du système immunitaire qui s'attaque aux constituants normaux de l'organisme. Dans les pays développés, les maladies auto-immunes touchent environ 8% de la population avec une forte prévalence pour les femmes (78%). Ces maladies évoluent de façon chronique tout au long de la vie, avec des phases de crises et de rémissions. A ce jour, plus de 80 maladies auto-immunes ont été décrites. Parmi les plus fréquentes, on peut citer la sclérose en plaque et la polyarthrite rhumatoïde. Les principaux traitements sont basés sur les médicaments appelés immunosuppresseurs. Malheureusement, ces traitements entravent également les réponses immunitaires physiologiques destinées à lutter contre les infections et ont d'autres effets secondaires potentiellement sérieux. Le but de la recherche médicale est de mettre au point des traitements efficaces avec moins d'effets secondaires. La recherche est actuellement concentrée sur le développement de thérapeutiques dites « ciblées » c'est à dire qui vont interférer avec des fonctions précises de la réponse immunitaire, fonctions qui sont impliquées dans le développement de la maladie. Différents modèles animaux existent et sont validés par la communauté scientifique. Ces modèles ont permis d'étudier les mécanismes physiopathologiques des maladies auto-immunes et permettent ainsi de développer de nouveaux traitements. Ils sont en général basés sur la stimulation d'une réponse immunitaire connue de la maladie. Par exemple, une stimulation des anticorps dirigés contre la gaine de myéline dans le cas de la sclérose en plaque.

Nous proposons d'utiliser ce type de modèle pour tester l'effet de molécule de la classe des œstrogènes. Chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 15 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soin au animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 300 rats est envisagée.

1231. Les processus de mémoires font appel à plusieurs phénomènes complexes et interdépendants. L'étude de ces mécanismes à un intérêt dans le développement des médicaments traitant les pathologies impliquant des pertes des mémoires comme la maladie d'Alzheimer.

Ces dernières années, il a été montré que les récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR2 et mGluR3 peuvent être impliqués dans les processus de mémoires et les émotions. Afin d'étudier le rôle particulier du récepteur mGluR2, des souris dont le gène de ce récepteur a été inactivé, ont été générées. Les données de la littérature sur ces animaux montrent qu'ils ne présentent pas de phénotype dommageable; cependant des modifications subtiles de leur comportement peuvent être mises en évidence par des tests spécifiques.

Notre projet poursuit 2 objectifs. D'une part, il s'agit de compléter la caractérisation de ce modèle animal par d'autres études comportementales dans un environnement non contraint. D'autre part nous souhaitons tester le potentiel de substances pharmacologiques à influencer les performances mnésiques de ces souris.

Dans ces buts nous observons le comportement des animaux transgéniques par rapport au non-transgénique dans des tests de comportement puis l'effet de nouvelles molécules sur ces souris. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant.

Dans la cadre du respect de la règle des 3R, nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soin au animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. Nous favorisons une durée d'expérience la plus courte possible afin de ne pas maintenir des animaux plus longtemps que nécessaire. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle afin de ne pas multiplier les groupes.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 1000 souris est envisagée.

1232. Les processus de mémoires font appel à plusieurs phénomènes complexes et interdépendants. L'étude de ces mécanismes à un intérêt dans le développement des médicaments traitant les pathologies impliquant des pertes des mémoires comme la maladie d'Alzheimer.

Une sous-unité particulière de récepteur de la nicotine a été décrite comme étant impliqué dans les processus de mémoires. Afin d'étudier le rôle de ce récepteur de façon plus précise, des souris dont le gène de ce récepteur a été inactivé, ont été générées. Les données de la littérature sur ces animaux montrent qu'ils ne présentent pas de phénotype dommageable : les animaux sont viables, fertiles et ne montrent pas de signes particuliers de douleur. Cependant la mise en œuvre de procédure d'expérimentation met en évidence l'absence de la sous-unité du récepteur de la nicotine qui a été supprimé et des altérations de leur mémoire spatiale.

Notre projet poursuit 2 objectifs. D'une part, il s'agit de compléter la caractérisation de ce modèle animal par d'autres études comportementales dans un environnement non contraint. D'autre part nous souhaitons tester le potentiel de substances pharmacologiques à influencer les performances mnésiques de ces souris.

Dans ces buts nous observons le comportement des animaux transgéniques par rapport au non-transgénique dans des tests de comportement puis l'effet de nouvelles molécules sur ces souris. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant.

Dans la carte du respect de la règle des 3R, nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soin aux animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. Nous favorisons une durée d'expérience la plus courte possible afin de ne pas maintenir des animaux plus longtemps que nécessaire. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisé. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle afin de ne pas multiplier les groupes.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 1000 souris est envisagée.

1233. Chez les rongeurs saisonniers, comme le hamster, la reproduction est fonction des saisons. Par ailleurs, certaines molécules du cerveau, (les neuropeptides : kisspeptine, RFRP3 et 26RFa) contrôlent l'activité de reproduction. Notre équipe a récemment démontré que ces neuropeptides sont impliqués dans la régulation de la reproduction chez le hamster mâle en fonction des saisons.

Chez la femelle les phénomènes sont plus complexes et plus rarement étudiés. Des études préliminaires de notre équipe indiquent que l'effet des neuropeptides présentent des différences selon le sexe des hamsters. Les études approfondies des mécanismes impliqués sont difficiles à réaliser sur de tels animaux saisonniers car il n'existe pas de hamsters mutants sur lesquels on aurait modifié des gènes.

C'est pourquoi le but de ce projet est d'analyser les effets de 3 neuropeptides (kisspeptine, RFRP-3, 26RFa) sur la fonction de reproduction (activité des neurones spécifiques, sécrétions hormonales, cycle oestrien, développement des gonades) sur un modèle de souris femelle sauvage ou mutante dont les gènes concernant les neuropeptides ont été modifiés.

Les peptides sont administrés directement dans le cerveau car ils agissent dans le système nerveux central. Les injections sont réalisées chez des souris femelles sauvages ou mutantes, à différents moments du cycle oestrien ou chez des animaux castrés car les hormones sexuelles peuvent agir rétroactivement sur le cerveau dans le système étudié.

Nous porterons une attention particulière aux aspects éthiques de la recherche sur animal. En terme de remplacement, nous ne pouvons pas travailler sur des cellules isolées car l'axe reproducteur comprend différents étages interactifs (hypothalamus, hypophyse, gonades). En terme de réduction, nous avons établi un nombre d'animaux à 8 par groupe expérimental. Pour obtenir des résultats statistiquement valides et nous aurons 180 groupes sur 5 ans. En terme de raffinement, les animaux seront placés à 5 par cage pour favoriser leur interaction sociale et le milieu sera enrichi avec un nid et un barreau à ronger. Bien que ce projet nécessite une approche invasive (castration, injection dans le cerveau et prélèvements sanguins), le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux tout au long de l'expérience (habituation à l'expérimentateur, anesthésique, analgésie, suivi du score de douleur).

1234. Au cours des cinq dernières décennies, la sélection intensive a permis d'améliorer de façon spectaculaire les performances de production (croissance, ponte) et d'efficacité alimentaire des poulets commerciaux. Cependant, cette évolution de performances semble s'accompagner d'une plus grande fragilité des animaux face aux agressions environnementales, notamment pathogènes. Cela pourrait être dû à une utilisation massive des ressources alimentaires ingérées par l'animal pour sa production, laissant ainsi une part plus faible des ressources pour les autres fonctions, telles que la fonction immunitaire. Ce phénomène est appelé « trade-off ».

Le projet ChickTradeOff aborde les relations détaillées entre les caractères de production et les paramètres immunitaires, par l'étude des lignées de poulet expérimentales ayant des efficacités contrastées pour la production. Le projet ChickTradeOff vise à déterminer si la sélection sur l'efficacité digestive/alimentaire peut avoir un impact sur la sensibilité des poulets aux infections avec des virus influenza aviaries. Pour ce faire, nous allons infecter les animaux des quatre lignées de poulet divergentes pour l'efficacité digestive/alimentaire avec un virus influenza aviaire faiblement pathogène du sous-type H7N1.

Remplacement : Seule une étude in vivo (poulets infectés) permettra de répondre aux questions de recherche. Réduction : Afin de réduire au minimum le nombre d'animaux expérimentaux, une première série d'expérimentations "pilotes" sur de faibles effectifs permettra de choisir la dose de virus à inoculer: pour chacune des quatre lignées, cinq animaux recevront une dose "faible" et cinq animaux recevront une dose "élevée", ils seront comparés à 3 animaux non-inoculés servant de contrôles. Une seconde série d'expérimentations comparera 10 animaux inoculés (à la dose préalablement définie) à 5 animaux contrôles. L'ensemble de ce projet utilisera 112 poulets (28 pour chacune des quatre lignées étudiées). Raffinement : Au cours de l'infection expérimentale les animaux seront observés au moins 3 fois par jour. Tous les animaux seront gardés dans des isolateurs climatisés et des jouets suspendus seront fournis pour l'enrichissement comportemental. Les résultats de la seconde série seront combinés à ceux des expérimentations pilotes afin d'optimiser l'exploitation des résultats.

Les paramètres étudiés chez les poulets seront la quantité de virus dans les voies aériennes (écouvillons trachéaux et poumons), les courbes de survie le cas échéant, les lésions histologiques dans le poumon et la réponse immunitaire dans le poumon (quantification des ARN messagers de cytokines).

1235. La rentabilité économique et la survie des élevages de petits ruminants dépendent en partie du contrôle des infections parasitaires au pâturage. Ce contrôle ne peut plus faire appel exclusivement à la chimiothérapie compte tenu du développement de la résistance aux vermifuges chez les parasites et de la présence de résidus dans les produits d'origine animale et l'environnement.

Notre projet consiste à définir des marqueurs d'infestation non invasifs permettant de ne traiter que les animaux les plus infestés.

Suite à une précédente étude d'association génétique, des marqueurs génétiques liés au statut de résistance à l'infestation par le nématode parasite *H. contortus* ont été identifiés. Ces marqueurs représentent un outil de sélection pour la filière ovine pouvant déboucher sur une amélioration du potentiel de résistance des races et une réduction de l'utilisation des vermifuges chimiques. Grâce aux marqueurs identifiés, deux lignées divergentes résistant (R) et sensible (S) ont été créées sur la base de leurs génotypes aux marqueurs génétiques identifiés. Ces animaux vont permettre de valider l'effet des marqueurs génétiques avant de pouvoir proposer leur utilisation en sélection dans les élevages.

Le stress chronique induit des modifications physiologiques qui affectent le système immunitaire. Ainsi, des variations dans le niveau de stress induit par l'environnement des animaux pourrait interférer avec le niveau de résistance intrinsèque des animaux sélectionnés. Notre étude s'attache donc à placer des animaux R et S dans des conditions de stress ou d'enrichissement afin d'évaluer les conséquences sur leur niveau de résistance au parasite d'intérêt.

Une autre étape de la validation des marqueurs génétiques sera d'évaluer la capacité du nématode parasite à contourner le niveau de résistance de ses hôtes. Pour cela il est nécessaire de collecter des vers adultes sur des animaux de chaque génotype afin d'identifier des facteurs de virulence parasitaire conférant une adaptation aux moutons résistants.

En résumé, le projet vise à valider un jeu de marqueurs génétiques afin de proposer un outil de sélection robuste aux éleveurs en :

- évaluant le niveau de résistance des moutons R et S dans des environnements d'élevage contrastés par le niveau de stress,
- évaluant l'adaptation potentielle des vers parasites à des moutons hôtes devenus résistants.

Au total 80 moutons seront utilisés dans le cadre de ce projet expérimental. Suite au projet, ils feront l'objet d'une exploitation commerciale classique permettant la valorisation de leur viande.

Ainsi, cette infestation expérimentale bénéficie d'un ratio bénéfice/coûts très favorable puisqu'elle :

- correspond au niveau d'infestation rencontré par les ovins au pâturage en situation d'élevage,
- apporte les réponses aux questions posées en considérant un nombre suffisant d'animaux
- ne nuit pas à la valorisation des moutons dans un circuit classique d'élevage.

La conception de cette expérimentation s'inscrit dans le respect de la règle des 3R:

\* réduction: le nombre d'animaux a été optimisé pour permettre de répondre à la question biologique.

\* remplacement: à l'heure actuelle aucun modèle *in vitro* pertinent n'est valide; cependant les données générées dans le cadre de cette expérimentation alimenteront un modèle épidémiogénétique en cours d'élaboration qui débouchera dans l'avenir à des prédictions sans recours à l'expérimentation animale.

\* raffinement: les animaux sont maintenus dans les conditions permettant l'expression de leurs comportements naturels et seront manipulés par des animaliers formés, limitant ainsi le stress lors des prélèvements.

1236. La Dengue est une maladie virale causée par un arbovirus et transmise par l'intermédiaire d'un vecteur, le moustique *Aedes*. L'OMS considère qu'environ 40 millions de personnes sont potentiellement exposées à ce virus dans le monde. Dans 2,5% des cas, cette infection conduit à une forme hémorragique potentiellement mortelle chez l'Homme. Il n'existe à ce jour aucun traitement spécifique et aucun vaccin efficace contre cette maladie.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité d'un nouveau candidat vaccin qui pourrait avoir des applications cliniques chez l'Homme à moyen terme. Il s'agira notamment

- 1) d'apprécier la qualité de la réponse anticorps et de la réponse immune cellulaire, spécifiques du virus ;
- 2) de déterminer la durée de l'immunité protectrice induite par le vaccin ;
- 3) d'évaluer l'efficacité de l'immunité vaccinale vis-à-vis d'une infection d'épreuve par deux virus de sérotypes différents.

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

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 16 animaux nés et élevés dans des établissements agréés. Leur nombre dans chacun des groupes expérimentaux a été réduit au minimum nécessaire pour permettre l'interprétation des résultats par des tests statistiques non-paramétriques. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (prélèvements, administration des vaccins et épreuve expérimentale sous anesthésie). Les animaux seront hébergés par paires avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement. Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets non prévus le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie

1237. Cette étude d'immunité consiste à évaluer l'efficacité à long terme d'un produit immunologique destiné à protéger une espèce de carnivore domestique contre une maladie mortelle.

La réalisation de cette étude comprend une procédure expérimentale permettant d'évaluer l'efficacité à long terme de ce produit immunologique à l'aide d'une méthode préalablement validée.



La procédure expérimentale du projet est conçue sur la base des exigences des textes réglementaires en vigueur (Monographie de la Pharmacopée Européenne). Les exigences de remplacement, raffinement et réduction (3R) seront considérées à travers :

- l'observation quotidienne des animaux
- l'hébergement en groupe et l'enrichissement des box
- un nombre d'animaux strictement conforme aux recommandations des textes de référence
- La définition de points limites adaptés permettant la réduction de la douleur

1238. La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après l'étude multicentrique STAR\*D, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement. En outre, les patients rétablis à la suite d'un premier épisode dépressif présentent un risque de récurrence dans les 6 mois évalué à 50% en cas d'arrêt du traitement et il a été montré qu'en l'absence de traitement 15% des patients succombent à la suite d'un suicide et qu'entre 60% et 80% des suicides (entre 10000 et 15000 par an en France) sont le fait d'individus fortement dépressifs. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements et la compréhension des mécanismes sous-jacents. Certains de ces mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant l'utilisation de techniques d'immunohistochimie par exemple.

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

Le but de cette expérience est d'évaluer l'implication d'un récepteur : le récepteur P2X7 dans la vulnérabilité à un stress chronique. En effet, ce récepteur est associé aux états neuroinflammatoires eux-mêmes liés aux états dépressifs. Nous envisageons donc d'exposer des souris mutantes ou non pour P2X7 à un stress chronique. A la fin de l'expérience, les cerveaux sont prélevés après perfusion intracardiaque pour étudier le rôle de ce récepteur.

Pour cette expérience, 30 souris réparties en 2 lots sont requises.

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

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

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

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

1239. E. Coli est un pathogène majeur chez le poulet de chair, et touche 30 à 40% des lots, dont 10% de façon plus sévère, générant des saisies des carcasses à l'abattoir, d'importantes pertes économiques et de la souffrance animale. Les animaux sont contaminés par les voies aériennes, en inhalant des bactéries excrétées par le tractus digestif des animaux, où E. Coli est présente en abondance. Cette abondance est liée en partie aux conditions de vie dans le tractus digestif, qui sont elles-mêmes dépendantes de la façon dont l'animal digère son aliment. Or, à l'heure actuelle, on voit émerger de nouveaux régimes alimentaires en élevage avicole, contenant des proportions plus importantes de matières premières difficiles à digérer, ce qui risque de favoriser le développement des bactéries E. Coli. Ce risque est d'autant plus important chez les poulets de chair actuels très performants, mais peu adaptés à ces nouveaux régimes. Nous avons sélectionné des poulets qui sont à la fois performants et capables de digérer des régimes difficiles. L'objectif de cette étude est donc d'établir l'effet de la sélection de la capacité de l'animal à digérer son aliment sur sa capacité à résister à E. Coli, en lien avec son aliment, grâce à ces lignées de poulets. Pour ce faire, nous proposons de mesurer la capacité à digérer l'aliment ainsi que la résistance à E. Coli dans nos deux lignées de poulets sélectionnées pour une bonne ou mauvaise capacité à digérer l'aliment. Afin de distinguer quels sont les rôles respectifs de la génétique et de l'aliment dans cette résistance au pathogène, la moitié des animaux sera nourrie avec un régime facile à digérer, l'autre moitié avec un régime difficile à digérer. Nous utiliserons 20 animaux par lignée et par régime (80 animaux au total).

Respect de la règle des 3R :

- Remplacer : Pour évaluer le lien entre digestion et sensibilité à E. coli, il faut disposer des mesures sur les animaux et le modèle le plus adapté pour l'évaluer sur le poulet est le poulet lui-même
- Réduire: des calculs statistiques ont été effectués pour estimer le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de cette expérience
- Raffiner : les animaux sont élevés en cage individuelle, seul environnement dans lequel la mesure de l'efficacité digestive individuelle est possible. Les cages seront enrichies mécaniquement afin d'améliorer le bien-être des animaux.

1240. La synchronisation des contractions cardiaques entre oreillettes et ventricules est sous commande électrique. Le bloc auriculo-ventriculaire complet (BAV) correspond à l'interruption de la conduction électrique entre les oreillettes et les ventricules. Ceci entraîne une forte baisse de la fréquence cardiaque pouvant conduire à l'insuffisance cardiaque et au décès. Le BAV congénital est une pathologie cardiaque rare dont l'incidence est estimée à 1/15 000 naissances. Le seul traitement est l'implantation d'un pacemaker assurant une stimulation et une fréquence cardiaque compatible avec la vie normale. La stimulation ventriculaire entraîne une modification de l'activation électrique des ventricules.

De nombreux travaux ont démontré les effets délétères de la stimulation ventriculaire droite sur la mécanique cardiaque aiguë. Ce projet a pour but de caractériser les modifications de structure et de fonction des ventricules induites par la stimulation chronique ventriculaire droite sur un modèle porcin de BAV congénital en croissance.

Ce modèle présente l'avantage 1/d'éviter la mortalité induite par la destruction du nœud auriculo-ventriculaire, 2/d'éviter une mort prématurée en cas de dysfonction du pacemaker, 3/de pouvoir comparer au terme du suivi, la fonction cardiaque en rythme spontané. Le porc a été choisi en raison de la proximité de son anatomie avec l'homme et de sa croissance accélérée.

16 porcelets de 4 semaines seront appareillés d'un pacemaker par micro-chirurgie. Un groupe contrôle de 8 porcelets pacemaker sur off sera comparé au lot appareillé. Les résultats de cette étude seront d'une aide précieuse quant à la décision de poursuivre ou non la stimulation classique ventriculaire droite chez l'enfant.

Le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum tout en nous permettant de mettre en évidence des différences significatives (Réduction). Nous prendrons en charge les douleurs post-opératoires (Raffinement). A ce jour, aucune méthode évitant l'utilisation des animaux n'existe. Cependant nous espérons pouvoir à terme remplacer ce modèle animal par une simulation informatique grâce à nos résultats (Remplacement).

1241. Les maladies chroniques du foie d'origine non alcoolique (NAFLD) sont caractérisées par une stéatose hépatique, c'est-à-dire une accumulation de graisses dans le foie dans plus de 5% des cellules hépatiques. Elles sont dans la majorité des cas considérées comme une maladie du foie bénigne.

Cependant, certains patients (~20% des personnes atteintes de NAFLD) peuvent présenter une manifestation plus sévère de la stéatose : la stéato-hépatite d'origine non alcoolique (NASH) qui se caractérise alors par une accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes, un ballonnement hépatocytaire et une inflammation pouvant aboutir à une fibrose et dans les cas extrêmes à une cirrhose non alcoolique voire un hépato-carcinome. La mortalité chez ces patients atteints de NASH est d'environ 7% dans la population générale et peut atteindre 36% chez des personnes souffrant de maladies cardio-vasculaires. Actuellement, seules des modifications de comportement alimentaire et physique sont utilisées pour réduire l'impact des NAFLD/NASH, mais il n'existe aucun traitement thérapeutique.

Les objectifs de ce projet sont de 1) mettre en place un modèle animal (souris) de NASH et 2) caractériser des candidats médicaments pré-sélectionnés dans des tests vitro sur des critères d'efficacité sur les cibles d'intérêt. Ces études permettront de documenter le mécanisme d'action des composés et d'évaluer leur effet sur la stéatose en termes de réduction de la stéato-hépatite et/ou de ralentissement de l'évolution vers des maladies/complications plus sévères. L'évaluation sera faite sur des critères d'imagerie non invasive (échographie), sur des paramètres métaboliques ainsi que sur des critères d'histologie.

Il existe différents modèles animaux de NAFLD/NASH présentant certaines physiopathologies communes à la pathologie observée chez l'homme : 1) animaux présentant des mutations génétiques qui développent une stéatose hépatique n'évoluant pas ou peu en stéato-hépatite et 2) modèles induits par différents régimes nutritionnels hypercaloriques qui diffèrent les uns des autres dans leur composition (lipides, sucre, acide aminé) modulant ainsi l'intensité des troubles métaboliques et hépatiques générés. La mise en place du modèle de NASH consistera à caractériser ces différents modèles.

L'effet potentiel d'un composé sur la stéato-hépatite sera testé dans le modèle reproduisant au mieux la pathologie humaine. Il ne peut être évalué qu'après un traitement chronique chez l'animal car il résulte de l'intégration de toutes les interactions hormonales, inflammatoires et neuronales contrôlant l'ensemble des tissus impliqués dans la pathologie hépatique. Une telle intégration n'existe pas pour des cellules ou organes isolés. Il n'y a donc pas à ce jour de méthodes in vitro substitutives.

Les modèles de NASH sont très bien décrits chez la souris et le rat. La souris sera utilisée afin de réduire les quantités de produits nécessaires. Les souris sont utilisées à l'âge adulte. Elles sont hébergées en groupes sociaux dans des cages enrichies de bâtonnets de bois, de coton et de litière adaptée. Tous ces éléments leur permettent d'exprimer leurs comportements naturels tels que le fouissage, l'exploration ou encore la nidification. Elles font de plus l'objet d'une observation visuelle, comportementale quotidienne, ainsi qu'un suivi de prise alimentaire et hydrique.

Dans le cadre de notre approche de recherche de nouvelles molécules, nous utilisons un nombre minimum d'animaux. On estime à 50 animaux par étude et on pense réaliser 4 études par an, soit une prévision de 1000 souris pour toute la durée du projet. Afin de le réduire au maximum, le nombre d'animaux prévu par étude sera réajusté à l'issue de la phase pilote de mise en place du modèle par notre département Bio-Statistiques.

1242. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, elles sont à l'origine de 30% de la mortalité mondiale totale. La majorité des maladies cardiovasculaires est causée par des facteurs de risques tels que l'hypertension, l'hypercholestérolémie, l'obésité, l'âge ou encore le diabète. Ces facteurs de risques retrouvés chez le même individu ont un effet synergique, augmentent le risque cardiovasculaire et se définissent comme le syndrome métabolique. Aux États-Unis, 23% de la population générale présenterait un syndrome métabolique. Dans le cadre de nos recherches visant à améliorer le traitement des maladies cardiovasculaires tels que l'infarctus du myocarde ou encore l'insuffisance cardiaque, le recours aux études sur l'animal est indispensable. En effet, il est nécessaire d'évaluer l'activité pharmacologique d'un candidat médicament dans un organisme entier mettant en jeu les interactions entre les différents organes. D'autre part, l'efficacité doit être démontrée dans des modèles physiopathologiques reproduisant au plus juste la pathologie humaine et a fortiori cumulant plusieurs facteurs de risques ou comorbidités.

Un candidat est choisi à l'issue d'une série d'études *in vitro* démontrant sa puissance et sa sélectivité sur la cible sélectionnée. Les études *in vivo* réalisées ensuite permettent de déterminer, pour le produit testé, l'absorption intestinale, le métabolisme, la clairance et l'évolution des expositions plasmatiques ainsi que de confirmer l'activité du produit sur les manifestations cliniques. Ainsi, bien que l'efficacité d'un produit puisse être appréhendée au moyen de tests *in vitro*, il est nécessaire après cette première sélection d'avoir recours à l'animal pour discriminer et caractériser de façon certaine les produits candidats, futurs médicaments.

Dans ce projet de recherche, nous souhaitons développer sur l'espèce porc, qui est reconnue pour avoir une physiologie cardiovasculaire très proche de l'homme, un syndrome métabolique. Les animaux, seront alimentés avec un régime enrichi en graisse, sucre et sel. Les porcs feront l'objet d'un suivi et d'une surveillance particulière par les expérimentateurs et le personnel de zootechnie qui assure les soins aux animaux. Le poids ainsi que la circonférence abdominale seront mesurés chaque semaine. La mesure de la glycémie et du cholestérol ainsi que des mesures physiologiques telles que la pression artérielle et la fréquence cardiaque seront évaluées à intervalles réguliers et permettront de suivre l'installation du syndrome métabolique dans le respect du bien-être animal. La limitation du régime sur une période de 9 à 12 mois permettra de prévenir l'apparition de signes de souffrance importants liés au vieillissement et à l'avancement de la pathologie. Si malgré ces précautions les points limites prédéfinis devaient être atteints, les porcs seront systématiquement soustraits des études. Les animaux seront hébergés individuellement dans des boxes pourvus d'enrichissements du milieu tels que balles et chaînettes. Enfin, le suivi longitudinal permettra de suivre la progression de la maladie en limitant le nombre d'animaux utilisés.

Les données de la littérature indiquent une utilisation de 10 animaux maximum par groupe, 3 groupes : régime contrôle, régime enrichi, régime enrichi traité par un candidat médicament. Nous prévoyons d'utiliser ce protocole 1 fois par an, ce qui représente 30 porcs par an, soit 150 porcs maximum sur 5 ans.

1243. Les oxazaphosphorines, tels que l'Ifosfamide (IFO) ou le cyclophosphamide (CPM), sont des composés antitumoraux faisant partis de la classe des alkylants de l'ADN. Ces prodrogues nécessitent une activation enzymatique, qui a lieu principalement dans le foie. L'IFO étant transformé avec une faible hydroxylation, des « protocoles hautes doses » ont donc été développés et ont conduit à la mise en évidence de toxicités rénales et neurologiques.

Pour supprimer ces effets toxiques limitant l'utilisation clinique de l'IFO, l'oxydation des chaînes latérales en position 7 et 9 a été envisagée afin de ne plus libérer le composé chloroacétaldéhyde, responsable pour la neuro et néphrotoxicité. La synthèse de ce composé ainsi que son activité *in vitro* et sa cinétique alkylante ont montré des résultats convainquant.

Récemment, une étude d'efficacité *in vivo* a montré un gain d'efficacité de ce composé par comparaison avec l'IFO, à la dose de 300mg/kg, sur une lignée de Rhabdomyosarcome humaine xénotransgénée à la souris nude. Suite à ce résultat probant, nous aimerions mener de nouvelles études *in vivo* afin d'accroître les connaissances de ce nouvel analogue. Ainsi, dans un premier temps, une étude de toxicité préclinique de l'analogue en comparaison au composé de référence sera effectuée. Puis, dans un second temps l'étude de la pharmacocinétique et de la cinétique de libération des métabolites toxiques sera étudiée. Le but final de ce projet étant de nous informer sur les caractéristiques de toxicité de l'analogue en comparaison au composé de référence et ainsi mettre en évidence un bénéfice du composé est en cours de développement.

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

Le nombre de souris a été déterminé afin de réduire au maximum le nombre d'animaux au sein de chacun des protocoles et permettant l'obtention de résultats exploitables. Afin de minimiser au maximum la souffrance des animaux, l'injection s'effectuera après administration d'un antidouleur. De plus, lors de l'étude de toxicologie préclinique, une observation et des pesées quotidiennes des animaux seront menés afin de prévoir et de diagnostiquer au plus tôt les points limites et les critères d'interruptions. Ainsi le nombre total de souris utilisées dans ce projet a été évalué à 105 souris.

1244. La cécité est un problème de santé publique qui handicape gravement les personnes atteintes et qui concerne un français sur 1000. Il est donc nécessaire de développer des modèles animaux expérimentaux pertinents de dégénérescence rétinienne pour pouvoir ensuite tester l'efficacité de stratégies thérapeutiques applicables. Pour cela, il est possible d'avoir recours à l'administration exogène d'une protéine phototoxique inductible au sein de cellules cibles de la rétine. L'illumination à une certaine longueur d'onde spécifique de la protéine en question conduira à l'invalidation de ces cellules cibles dans lesquelles la protéine est exprimée. Cela permettra alors de mimer le dysfonctionnement de ces cellules dans la rétine de

souris initialement sauvages et donc d'étudier la dégénérescence provoquée par l'induction de la protéine phototoxique et les conséquences de cette dégénérescence sur son environnement au sein de la rétine.

Le développement de modèles animaux expérimentaux est indispensable pour l'étude de stratégies thérapeutiques dans un contexte in vivo. La souris constitue ainsi un modèle expérimental de choix puisque les propriétés de sa rétine sont similaires à celle de l'Homme. Notre stratégie de modélisation de ce modèle de dégénérescence rétinienne consiste en une unique injection intraoculaire d'un vecteur portant le gène d'intérêt. L'objectif est de caractériser la dégénérescence des bâtonnets induite par les illuminations. Pour cette étude, un total de 225 souris de souche c57bl6 (*mus musculus*) sera utilisé.

Nous avons pris en compte la règle des 3Rs pour la prévision du nombre d'animaux nécessaire à l'étude. Tout d'abord, le modèle expérimental in vivo est indispensable pour mener notre étude car aucun système in vitro ne peut mimer une dégénérescence rétinienne et nous informer sur un effet de population de neurones dans la rétine. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum pour pouvoir obtenir suffisamment de données statistiquement significatives et chaque animal est utilisé pour l'ensemble des étapes du projet, de l'injection intraoculaire au prélèvement des tissus d'intérêt pour l'analyse. Enfin, non seulement, les actes chirurgicaux réalisés entraînent une douleur modérée, mais si cela est jugé nécessaire, la douleur post-opératoire sera gérée par l'administration d'analgésiques opioïdes et une observation régulière des animaux sera faite pour détecter tout signe de détresse. Les animaux congénères seront hébergés en groupes dans des conditions enrichies (un nid végétal et une petite maison en carton seront rajoutés à toutes les cages).

1245. La technique microchirurgicale, pour être parfaitement maîtrisée, nécessite un entraînement long, régulier et progressif ; cet apprentissage ne peut se faire qu'en laboratoire.

La formation est obligatoire dans certaines disciplines chirurgicales, telle que la chirurgie de la main et la chirurgie plastique, mais elle est également très utile pour tous les internes en chirurgie, quel que soit leur future spécialité. C'est une technique rigoureuse qui n'accepte aucune approximation. Cette rigueur et cette précision permettent au chirurgien l'acquisition d'une grande technicité qui lui sera très utile pendant toute sa carrière.

La formation à la microchirurgie est également très utile dans le domaine de la recherche. La maîtrise des techniques de dissection et de sutures sous microscope a permis le développement de modèles de greffes chez le rongeur, utilisées dans de nombreuses études.

L'utilisation des rongeurs dans la formation est nécessaire car actuellement il n'y a aucun simulateur qui reproduit la complexité des structures des organismes vivants (organes in vivo, réseaux vasculaires complexes) ainsi que les facteurs thrombogènes du flux sanguin.

Le laboratoire est dédié à la formation : l'encadrement technique y est permanent et assuré par des formateurs spécialisés maîtrisant la gestuelle microchirurgicale et les techniques d'enseignement.

Les différentes techniques enseignées et standardisées sont présentées aux étudiants avant chaque séance de travaux pratiques sous la forme de films vidéo.

Nous proposons plusieurs modules de formation :

Une formation initiale : Elle permet de comprendre les principes, de découvrir la technique mais ne permet pas la maîtrise de la gestuelle.

Une formation plus orientée pour les besoins en laboratoire et qui s'adressera plus spécifiquement aux chercheurs et techniciens

Une formation longue diplômante : elle a pour objectif d'avoir à l'issue de la formation des apprenants qui maîtriseront parfaitement la technique et pourront l'appliquer chez le patient.

Nous prévoyons également un module de mise au point de techniques microchirurgicales.

Pour les 2 premiers modules la formation commence par une journée de travaux pratiques sur du tissu inerte (compresse, tube en silicone) avant l'utilisation des rongeurs.

L'apprenant ne peut s'inscrire à la formation longue diplômante que s'il a préalablement effectué une formation initiale.

La mise au point de techniques chez le rongeur ne peut être faite que par des personnes compétentes en microchirurgie sur l'animal ou ayant au minimum suivi la formation initiale et avec l'aide des formateurs.

Tous les animaux sont anesthésiés de façon adaptée et une prise en charge de la douleur est réalisée.

Le projet prévoit l'utilisation de :

1755 rats/an, soit au total: 8775 rats

120 souris/an, soit au total : 600 souris

1246. La prise en charge des douleurs des patients est une préoccupation récurrente des médecins. Bien que des médicaments antidouleurs existent leurs actions présentent des limites et certaines douleurs sont résistantes aux traitements actuellement disponibles. Les difficultés de prise en charge proviennent surtout du fait qu'il n'y a pas une douleur mais des douleurs dont les mécanismes sont différents. Les douleurs peuvent être divisées en 2 types : les douleurs nociceptives et les douleurs neuropathiques, bien que des formes mixtes sont également décrites.

Les douleurs nociceptives sont dues à une lésion d'une partie du corps sans atteinte des nerfs. Par contre les douleurs neuropathiques sont directement liées à l'atteinte des nerfs. Même si ces lésions nerveuses peuvent avoir des origines diverses, bien souvent, l'inflammation des tissus jouent un rôle important.

Dans ce projet, il est question de tester de nouvelles molécules antidouleurs pour traiter les douleurs neuropathiques très mal prise en charge par les médicaments actuellement sur le marché.

Dans ce but nous observons l'effet de nouvelles molécules sur des souris auxquelles une douleur de type neuropathique est induite pharmacologiquement. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant.

Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soin aux animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. Nous favorisons une durée d'expérience la plus courte possible afin de ne pas maintenir des animaux présentant une douleur plus longtemps que nécessaire. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle afin de ne pas multiplier les groupes.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 5000 souris est envisagée.

1247. De nombreuses maladies neurologiques ainsi que certains médicaments pris de façon chronique peuvent entraîner des troubles moteurs, tels que l'akinésie (mouvements ralentis) ou la dyskinésie (mouvements désordonnés).

L'akinésie peut être en rapport avec une affection neurologique (syndrome parkinsonien lié à une maladie de Parkinson, aux effets neurologiques des neuroleptiques, principalement) ou avec un trouble psychique (stupeur, état dépressif). Elle se manifeste au niveau de la face (aspect figé, hypomimie, clignement rare) et des membres (perte des automatismes moteurs, notamment du balancement associé des bras à la marche, disparition des mouvements spontanés, des gestes expressifs, mais aussi difficulté d'arrêt d'un mouvement en cours d'exécution).

Les dyskinésies sont surtout secondaires aux traitements chroniques par les neuroleptiques et au traitement anti parkinsonien à la L-Dopa. Elle se traduit par des accès hypertoniques souvent accompagnés d'hypersalivation et de troubles de la déglutition, de la dyskinésie buccofaciales.

Dans ce projet, il est question de tester de nouvelles molécules pour le traitement soit de l'akinésie soit des dyskinésies.

Dans ce but nous observons l'effet de nouvelles molécules sur des rongeurs auxquelles l'un des dysfonctionnements moteurs est induit pharmacologiquement. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 12 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant.

Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soin aux animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. Nous favorisons une durée d'expérience la plus courte possible afin de ne pas maintenir des animaux présentant une douleur plus longtemps que nécessaire. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle afin de ne pas multiplier les groupes.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 1000 souris et 1000 rats est envisagée.

1248. Chez le ruminant, l'ingestion de quantités importantes de glucides rapidement fermentescibles (GRF) pour répondre aux besoins de production, ainsi que l'utilisation accrue de céréales produites sur l'exploitation, la mécanisation et la simplification du rationnement, accroissent beaucoup les risques d'acidose latente (synonymes: SARA, acidose chronique ou subaigüe ou subclinique) dans les systèmes d'élevage intensif. Cet état beaucoup plus discret que l'acidose aigüe mais atteignant un plus grand nombre d'animaux, est responsable de coûts de traitement liés à des troubles de santé annexes et d'une diminution des performances.

En situation d'acidose latente, on observe autour d'un état d'équilibre, des oscillations dues à des décalages entre les facteurs de perturbation (aliments riches en GRF) et les facteurs de compensation (systèmes tampons, micro-organismes). Le pH du rumen est proche des limites physiologiques inférieures et subit des variations postprandiales de fortes amplitudes, tout particulièrement lorsque les animaux sont nourris en alimentation discontinue comme c'est le cas dans la pratique. Ainsi, parmi les conséquences d'un régime alimentaire riche en GRF on observe généralement des déviations fermentaires dans le rumen suite à une perturbation de l'écosystème microbien (composition, activité) et des modifications des conditions physico-chimiques.

Parallèlement à la baisse du pH ruminal, le comportement et le bien-être animal peuvent se trouver affectés par l'introduction dans la ration de GRF en quantité importante. Parmi les signes cliniques de l'acidose ruminale latente, bien que non spécifiques, on décrit généralement une ingestion alimentaire qui devient aléatoire, un comportement animal modifié avec une diminution de l'activité générale et de rumination associée à un état d'abattement et une augmentation de l'agressivité vis-à-vis des congénères.

Actuellement, les outils de monitoring de l'élevage deviennent de plus en plus nombreux et permettent un suivi du troupeau qui se veut précis et qui permet de faire gagner du temps et de l'argent aux éleveurs et d'améliorer le bien-être des animaux d'élevage. Parmi ces outils, les outils de suivi du comportement des animaux sont nombreux et leur applications diverses. L'outil GEA, CowView basé sur l'analyse de l'activité générale de l'animal, est destiné à détecter dans le troupeau, les animaux qui sont susceptibles de présenter une modification de leur comportement en lien avec une pathologie, une chaleur ou un vêlage.

L'objectif de la présente étude est d'évaluer dans quelle mesure l'outil CowView pourrait permettre de diagnostiquer les animaux présentant une acidose chronique en élevage :

- Evaluer la faisabilité de détecter l'acidose subclinique (ou subaigüe ou chronique ou SARA) à l'aide de l'outil de surveillance de l'activité animale CowView fourni par GEA.

1-l'outil CowView permet-il de détecter l'acidose dans l'état actuel de son développement ?

2-le système CowView nécessite-t-il un développement de plus pour détecter l'acidose ?

- Appréhender la réponse de l'animal lors d'un épisode d'acidose

1-caractériser la variabilité inter-animale du pH ruminal face à une ration acidogène.

2-évaluer la variabilité de la réponse physiologique de l'animal via les réponses comportementales.

Ce projet s'attache à respecter la règle des 3R :

- "Remplacement" : Malheureusement aucune méthode alternative ne permet de traiter ces questions.

- "Réduction" : 28 vaches Prim' Holstein en lactation seront utilisées dans ce projet. Ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour permettre l'obtention de résultats statistiquement fiables.

- "Raffinement" : L'utilisation de bolus électroniques permet de limiter le recours aux sondage gastro-oesophagiens et ainsi de raffiner la méthode de mesure du pH intra-ruminal.

1249. Les nanoparticules proposées dans le cadre de ce projet sont des nanoparticules inertes conçues pour absorber spécifiquement les rayons X utilisés en radiothérapie. Lors de leur exposition aux radiations ionisantes, elles s'activent et libèrent une quantité très importante d'énergie à l'intérieur des cellules tumorales, provoquant la formation de radicaux libres qui détruisent les cellules cancéreuses.

Le cancer du foie, dont l'incidence a particulièrement augmenté ces dernières années, entraîne une mortalité encore élevée. Les traitements existants étant parfois insuffisants, il est nécessaire de trouver d'autres méthodes thérapeutiques.

La radiothérapie n'est que peu utilisée pour le traitement du cancer du foie à l'heure actuelle et consiste en une radio-embolisation (destruction spécifique des vaisseaux alimentant la tumeur). Une utilisation des nanoparticules activées par la radiothérapie dans le cadre du cancer du foie, pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique.

L'administration des nanoparticules et leur activation par la radiothérapie est en cours d'essais cliniques sur d'autres types de cancers.

Le but de ce projet est d'évaluer :

- la faisabilité de l'irradiation par radiothérapie, du foie chez le rat souffrant de fibrose et insuffisance hépatique

- la biodistribution des nanoparticules chez des rats ayant une pathologie hépatique, comparée à celle observée chez les rats sains.

- de déterminer l'effet des nanoparticules activées par la radiothérapie, au niveau du foie pathologique.

Actuellement, en l'état de la recherche, il n'existe pas de modèle *in vitro* ou *in vivo* permettant de modéliser de manière fiable la biodistribution et la toxicité de ces nanoparticules activées par la radiothérapie. Une estimation préalable du nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables a été mise en place. L'expérimentation animale n'ayant pas pu être évitée, le modèle de pathologie hépatique a été choisi avec soin et une étude portant sur 52 rats sera donc effectuée afin de répondre aux objectifs cités précédemment.

Ces résultats permettront d'appréhender les effets des nanoparticules activées par la radiothérapie localisée sur la région hépatique chez l'animal, afin de pouvoir anticiper les effets chez l'homme lors de futurs essais cliniques.

1250. La NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) est la manifestation hépatique du syndrome métabolique. Avec l'augmentation de la prévalence de l'obésité, la NAFLD est devenue la cause la plus fréquente d'hépatopathie chronique dans les pays Occidentaux et est en voie de devenir l'indication la plus fréquente de transplantation hépatique aux États-Unis (Younossi 2011, Charlton 2011). Le microbiote intestinal abondant et diversifié est décrit comme une composante pouvant jouer un rôle important dans l'apparition des lésions hépatiques observées dans la Non alcoholic fatty liver deases (NAFLD), (Zhu 2012, Mouzaki 2013). Son implication dans la gravité de la maladie proviendrait d'une modification de sa composition et très probablement du catabolisme de la choline des apports nutritionnels par le microbiote. Cependant les différents acteurs et mécanismes ne sont pas clairement définis. Le Triméthylamine-N-oxyde (TMAO) qui est un métabolite dérivé de la dégradation de la choline par le microbiote intestinal (Wang 2011, Tang 2013) a récemment été impliqué dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Ainsi, l'augmentation des taux plasmatiques de TMAO ont été associés à un risque accru d'anomalie cardiovasculaire majeure. (Tang 2013). Devant une telle propriété et étant métabolisé au niveau du foie, le TMAO pourrait être un acteur important dans l'apparition des lésions hépatique au cours des Stéatohépatite non-alcoolique (NASH). Par ailleurs à la NASH est associé une hypercholestérolémie et les mécanismes sous-jacents de cette association restent encore mal définis. Une récente étude a montré que l'accumulation du cholestérol dans les cellules hépatiques stellaires, un acteur prépondérant à l'apparition des lésions de NASH, était un facteur aggravant de ces dernières. Le but de cette étude est donc d'évaluer le rôle et l'importance de ces composés dans la physiopathologie de la NASH, chez la souris. Afin de répondre à ces questions nous réaliserons une étude *In Vitro* sur des cellules primaires de trois types cellulaires principalement impliquées dans la physiopathologie de la NASH. Ces cellules seront extraites de foie frais issus de souris contrôle et mis en cultures afin d'y être soumis à l'exposition des TMAO et du cholestérol. L'expression de différents marqueurs sera ensuite mesurée en comparant les groupes sans et avec présence de TMAO ou de cholestérol. Associer à cette étude *In Vitro*, nous effectuerons une étude *In Vivo* à partir d'un modèle animal de NASH basé sur un régime alimentaire spécifique. Ce modèle présente l'avantage d'avoir une physiopathologie similaire à celle observée chez l'homme. Le diagnostic et l'évaluation des lésions hépatiques seront effectués par une analyse histologique des lames de foie après lecture par un anatomopathologiste. Cette analyse sera complétée par des mesures non invasives tels que les dosages de marqueurs sanguins «fibromètre» ou l'élastographie impulsionnelle ultrasonore). Par ailleurs, si le TMAO est impliqué dans les mécanismes d'apparition des lésions hépatiques de NASH, notamment celle de fibrose, en est il de même dans les mécanismes lésionnels hépatiques consécutifs à d'autres étiologies cad en dehors de toute composante métabolique. L'apparition de douleur ou d'atteinte de

l'intégrité physique de l'animal engendrera une prise en charge de la douleur, des soins ou une sortie de l'animal de l'expérimentation.

A noter que la modélisation induit une variabilité d'apparition des lésions de NAHS (environs 20%). Nous devons donc prévoir un nombre supplémentaire d'animaux en compensation des animaux sans lésions hépatiques. En fonction de cette contrainte et afin de répondre à l'utilisation d'une analyse multi variée des paramètres observés, nous avons établis à un nombre de 261 souris maximum nécessaires à cette étude.

Cette étude nous permettra d'augmenter les connaissances mécanistiques en vue d'améliorer la performance thérapeutique, chez l'humain.

1251. Nous avons montré, par de nombreuses expériences in vitro, qu'un composé de synthèse, le mannodendrimère Gc3Tri, est doué de propriétés anti-inflammatoires. Cet effet a été confirmé in vivo dans un modèle d'inflammation pulmonaire aigue (modèle LPS) chez la souris. Il se traduit par un moindre influx des neutrophiles dans les poumons des animaux.

Nous proposons de tester l'effet de ce mannodendrimère dans un contexte infectieux, et plus particulièrement dans le cas d'une infection à *Mycobacterium tuberculosis*. Cette bactérie est l'agent étiologique de la tuberculose responsable tous les ans de 1,5 millions de morts dans le monde. Lors d'une infection à *M. tuberculosis* on constate que l'accumulation de neutrophiles dans les tissus est un facteur aggravant de la maladie. Le but du protocole est donc d'évaluer l'impact de l'action anti-inflammatoire du Gc3Tri sur l'évolution de l'infection en association ou non avec une antibiothérapie. L'effet bénéfique supposé du mannodendrimère permettrait de diminuer la dose et/ou la durée du traitement des patients améliorant ainsi le pronostic d'évolution de la maladie et atténuerait les risques d'apparition de résistance aux antibiotiques des bactéries.

Il est nécessaire de tester l'effet du mannodendrimère dans un modèle animal cliniquement pertinent mimant les caractéristiques de la tuberculose humaine. Dans une étude précédente, nous avons utilisé une lignée de souris commercialement disponible, la lignée C3HeB/FeJ qui constitue un modèle de tuberculose humaine. L'administratin par gavage du GC3Tri aux souris pendant 4 ou 8 semaines réduit légèrement le nombre de bactéries dans les poumons par rapport aux souris non traitées, mais cette baisse est statistiquement non significative. Afin d'augmenter l'effet bénéfique du traitement par le GC3Tri, nous souhaitons l'administrer par voie intraveineuse aux souris. En effet il a été montré dans le modèle LPS que l'injection intraveineuse du GC3Tri se traduit par un effet anti-inflammatoire beaucoup plus prononcé que l'administration par gavage (données non publiées). Nous souhaitons donc modifier le protocole en substituant le gavage, par une injection intraveineuse, trois fois par semaine pendant 4 et 8 semaines.

L'étude est basée sur un nombre de 63 souris (9 groupes de 7 souris). Dans ce modèle expérimental comme dans la plupart des modèles d'investigation in vivo, la variabilité inter individuelle en réponse à un stimulus est importante et ne nous permet pas de diminuer le nombre d'animaux par groupe en dessous de 7, ceci afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante.

L'état général des animaux (poil hérissé, hypo- ou hyperactivité...), la physiologie (rythme respiratoire), le comportement alimentaire, ainsi que la prise de poids des animaux seront suivis quotidiennement. Ces différents critères permettront d'appréhender au mieux l'effet de l'infection et des produits testés et/ou la douleur qui pourrait engendrée. Tous signes et comportements anormaux et/ou perte de poids de plus de 20 % des animaux entraîneront l'exclusion de ces derniers qui seront ensuite euthanasiés si leur état est jugé irréversible.

L'utilisation d'antibiotique nous permettra de contrôler l'infection bactérienne et donc de réduire la douleur. Seuls trois lots de souris ne seront pas traités par les antibiotiques. Les animaux de ces lots seront euthanasiés dès qu'un point limite sera atteint et leurs organes seront prélevés et un dénombrement bactérien sera réalisé, ne remettant pas en cause l'expérience. Dans l'expérience évoquée plus haut, aucun animal, même ceux non traités par l'antibiotique, n'ont été euthanasiés et leur physiologie, notamment leur poids, est restée constante.

1252. Bien que l'utilisation de nouveaux agents thérapeutiques ait permis d'améliorer le traitement des patients atteints de cancer au cours des dernières années, l'efficacité des thérapies ciblées est limitée par le développement de résistances. Les thérapies ciblées utilisées en clinique pour le traitement de certains cancers sont efficaces dans certains groupes de patients. Cependant, la majorité des patients ne répondent pas au traitement et la plupart, sinon la totalité, des patients qui répondent initialement au traitement développent une résistance après quelques mois de traitement. L'identification d'approches alternatives qui perturbent la croissance des cellules tumorales est essentielle et pourrait avoir un impact clinique important. En particulier, des combinaisons d'agents ciblés pourraient être significativement plus efficaces que les agents thérapeutiques individuels. Notre objectif est d'évaluer l'intérêt pour le traitement des cancers de combiner des molécules thérapeutiques pour bloquer simultanément plusieurs voies de survie des cellules tumorales.

Nous avons démontré que des combinaisons de traitements contrecarrent la résistance aux thérapies ciblées dans les cellules de cancers humains (cancers du poumon et hépatocarcinomes). En particulier, nous avons montré l'intérêt de combiner le gefitinib (anti-EGFR utilisé en clinique pour le traitement des cancers du poumon) avec le vorinostat, un inhibiteur d'histone déacétylase utilisé en clinique pour le traitement des lymphomes, dans les cellules de cancers du poumon résistant au gefitinib et dans des cellules d'hépatocarcinomes résistant au sorafenib (anti-VEGFR/Raf/PDGFR utilisé en clinique pour le traitement des cancers du foie). Nous avons déjà testé et validé ces molécules dans plusieurs modèles cellulaires in vitro. Nous devons maintenant étudier l'efficacité thérapeutique de ces combinaisons in vivo dans des modèles de cancers du poumon et du foie, qui sont particulièrement résistants aux thérapies ciblées. Cette étude préclinique est nécessaire avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme.

Dans ce projet nous utiliserons 180 souris Nude :

Les souris Nude immunodéficientes représentent le modèle le plus proche de la physiopathologie humaine, permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les souris Nude seront hébergées par 5 dans des cages à 25°C et 30-50% d'hygrométrie, dans un environnement contrôlé dépourvu de pathogènes, avec une alternance jour/nuit de 12h. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Le change de la litière est réalisé 1 fois par semaine. 4 à 5 jours d'acclimatation sont laissés avant le début des expérimentations. Les souris sont observées quotidiennement et pesées 2 fois par semaine.

Des cellules tumorales pulmonaires humaines de poumon ou de foie seront implantées en sous-cutané chez les souris, sous anesthésie gazeuse. La croissance des tumeurs pulmonaires sera suivie en mesurant le volume tumoral au pied à coulisse. L'efficacité thérapeutique sur la régression des tumeurs des combinaisons de molécules thérapeutiques, par rapport aux traitements seuls et à un groupe contrôle, sera ensuite évaluée. 10 souris par condition sont nécessaires pour une analyse statistique fiable de l'effet anti-tumoral. Les traitements seront administrés par voie orale (gavage). Nous utiliserons des combinaisons d'agents anti-cancéreux gefitinib, sorafenib et vorinostat.

1253. Les traitements actuels utilisés en chimiothérapie font appel à des molécules qui, si elles restent dans la circulation sanguine et/ou se distribuent de façon générale avec une absence de spécificité d'organes ou tissus, peuvent générer une toxicité dite périphérique. Cette toxicité périphérique peut être à l'origine d'effets secondaires. L'objectif de ce projet est d'améliorer l'efficacité du traitement et de réduire la toxicité périphérique en modifiant la biodistribution de la molécule thérapeutique grâce à l'utilisation d'un nano-objet. Ceci permettra d'améliorer le ratio bénéfice-risque de traitements systémiques en oncologie.

Il s'agit donc de comparer la biodistribution ainsi que l'efficacité anti-tumorale de la composition thérapeutique (molécule thérapeutique + nano-objet) et de la molécule thérapeutique (traitement de référence utilisé chez les patients). Le nano-objet est une nanoparticule organique issue de la nanotechnologie. Il est synthétisé avec des matières premières approuvées par la FDA. La molécule thérapeutique utilisée pour ce projet est la Doxorubicine, issue de la famille des médicaments.

Le projet comporte une étude de biodistribution ainsi qu'une étude d'efficacité, toutes deux réalisées sur des souris porteuses de tumeur. L'étude de biodistribution permettra d'évaluer l'accumulation de la composition thérapeutique versus le traitement de référence dans la tumeur ainsi que dans les organes et tissus sains. L'étude d'efficacité déterminera quant à elle, le retard de croissance tumorale induit par la composition thérapeutique, toujours en comparaison avec le traitement de référence.

Chacune de ces deux études inclura 60 souris nudes NMRI soit 120 animaux requis en tout. La sélection de cette espèce de rongeur est basée sur le fait que le modèle de tumeur humaine xéno greffée chez la souris nude est le modèle de référence pour l'étude des traitements anti-cancéreux à travers toute la recherche en oncologie. Il a été choisi précédemment par la société pour l'évaluation préclinique de l'efficacité anti-tumorale de produits actuellement en essai clinique chez l'homme. Le nombre d'animaux requis a été défini en fonction du pourcentage de prise de greffe du modèle tumorale MDA-MB-231-luc-D3H2LN et la nécessité d'obtenir un nombre suffisant d'animaux présentant une bonne prise tumorale pour réaliser les tests statistiques sur les résultats obtenus pour chaque étude. Ceci permettra de ne pas compromettre l'objectif scientifique du projet en évitant notamment de devoir dupliquer les expériences si le pourcentage de prise de greffe devait être trop faible, ce qui nécessiterait alors plus d'animaux.

Les tests statistiques permettant d'analyser les données de l'étude ont été choisis de sorte qu'un nombre minimum d'animaux soit requis pour l'interprétation des résultats (5 animaux par groupe), par ailleurs, la détermination de points limites précis (volume tumoral < 1500 mm<sup>3</sup>, perte de poids < 20% ...) ainsi que des mesures permettant de soulager la douleur ou l'inconfort (analgésie, réchauffement...) ont été établis afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur et l'angoisse subie par les animaux au maximum. Cette procédure expérimentale permet d'évaluer les bénéfices d'une nouvelle composition thérapeutique en comparaison avec un traitement standard utilisé chez l'Homme, la complexité des mécanismes biologiques fait que le modèle animal choisi ne peut être remplacé par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants.

1254. Il n'existe pas pour le moment d'essai d'efficacité vaccinale des vaccins contre la maladie mortelle du chien visée par le présent projet par un test sérologique, aussi l'efficacité des préparations vaccinales est-elle évaluée par un essai avec épreuve virulente décrit par la monographie de la pharmacopée européenne chez le rongeur.

Deux procédures répétitives sont décrites dans le présent projet : essai d'activité sur une espèce de rongeur dans le cadre strict du contrôle qualité de chaque lot de fabrication du vaccin et de son suivi de stabilité, et essai d'activité sur une autre espèce de rongeur dans le cadre de Recherche et Développement de nouveaux vaccins contre cette même maladie. Une troisième procédure concerne la validation des souches d'épreuve utilisées dans les deux procédures précédentes.

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

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

Les trois procédures sont classées en gravité sévère.

Le nombre d'animaux utilisés dans l'ensemble du projet sera au maximum de 15 000 hamsters et 3000 gerbilles.



1255. La transplantation hépatique est aujourd'hui le traitement reconnu des maladies aiguës ou chroniques du foie menaçant le pronostic vital. Le recours à des greffons dits « marginaux » (donneurs âgés, foies stéatosiques, foies issus de donneurs à cœur arrêté, etc...) est de plus en plus fréquent afin de faire face à la pénurie d'organes et de diminuer le risque de décès des malades en liste d'attente. Cependant, l'utilisation de ces greffons « marginaux » s'accompagne d'un risque plus élevé de non-fonction primaire du greffon ou de dysfonctionnement précoce après la transplantation, pouvant conduire au décès du receveur.

Dans ce domaine, l'utilisation de machine de perfusion, encore à l'état expérimental en transplantation hépatique, pourrait être un moyen de prévenir la détérioration du greffon avant la greffe, en diminuant les lésions liées à l'ischémie reperfusion. Certaines équipes ont démontré le bénéfice de la machine, donc de façon expérimentale, le but sera de reproduire les mêmes conditions humaines chez le rat, avec la finalité de prélever le foie pendant l'anesthésie générale (il s'agit d'une anesthésie générale profonde et dont la profondeur est suivie en permanence) et après l'amener sur la machine qui est le seul moyen pour tester l'efficacité de celle-ci et pour vérifier si en ajoutant des médicaments si on peut améliorer la qualité de ces greffons. Ce projet vise à développer une nouvelle technique et en première instance nous chercherons à optimiser la restauration de la fonction hépatique de trois manières ; la première par l'ajout d'un transporteur d'oxygène extracellulaire (jamais testé dans la conservation des greffons hépatiques) pendant le « cold storage » en différents types de liquides de conservation ; la deuxième, par lipolyse (defatting) rapide des greffons stéatosiques (stéatose > 60%, avec le modèle de rat obèse Zucker) considérés comme impropres à la greffe pendant la perfusion avec la machine ; et finalement par l'identification des conditions de température optimale pendant la perfusion. La mise au point de cette technique nécessitera une expérimentation sur 12 groupes de 10 rats (soit 120 rats). L'évaluation de la lipolyse se fera chez le rat Zucker, nécessitera une expérimentation sur 4 groupes de 10 rats (soit 40 rats). Vingt rats supplémentaires seront nécessaires pour pallier à l'échec prévisible de certaines manipulations (échec de la conservation du greffon, problèmes techniques pendant la perfusion sur la machine...).

Au total 180 d'animaux seront utilisés. Ce nombre a été défini afin de répondre à la question scientifique posée et selon les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. L'anesthésie des rats sera réalisée par inhalation à l'aide d'un mélange isoflurane (3%) / air (3l/min).

Les animaux seront opérés dans une salle spécifique. Seuls les animaux directement anesthésiés puis opérés pourront être amenés dans cette salle afin de diminuer le niveau de stress des animaux. Une alimentation libre sera assurée avant l'opération. Compte tenu des petits nombres d'échantillons, nous utiliserons des tests non paramétriques.

Les perspectives seront de poser les bases d'une stratégie alternative efficace et transposable en clinique à la transplantation hépatique pour l'amélioration des greffons classés marginaux.

1256. Le projet correspond à l'ensemble des procédures techniques (administrations, prélèvements, chirurgies) pour lesquelles une formation est dispensée aux techniciens et parfois aux directeurs d'études, pour la bonne conduite des études.

Les techniques d'administration pour lesquelles une formation est requise afin de maîtriser l'acte technique correspondent aux principales techniques couramment utilisées en expérimentation animale, à savoir l'administration intrapéritonéale, per os, sous-cutanée, intraveineuse, intracérébroventriculaire, intramusculaire, intraduodénale, intraplantaire, intratrachéale, intrathécale, intracolonne, intradermique. La formation à la technique d'administration dans le genou, et celle dans la cheville, ainsi que l'administration après mise en place d'une pompe osmotique est également couverte dans ce projet. Le personnel est formé à ces techniques sur la plupart des espèces animales couramment utilisées en expérimentation animale, tels que les rats, souris, cobayes, gerbilles, hamsters, lapins, chiens, furets, porcs.

Les techniques de prélèvements pour lesquelles une formation est requise afin de maîtriser l'acte technique correspondent aux principales techniques couramment utilisées en expérimentation animale, à savoir les prélèvements de sang au sinus rétro-orbitaire (rat, souris, cobaye, gerbille), à la veine sublinguale (rat, souris), par ponction cardiaque (avec ou sans thoracotomie; souris, rat, cobaye, gerbille, furet), veine caudale (rat, souris), à la veine submandibulaire (souris), à l'aorte abdominale (rat, souris), à la veine saphène (cobaye), à la veine cave crâniale (furet, cochon), à la veine céphalique (furet, chien), à la veine jugulaire (cochon, chien), à la veine marginale de l'oreille (lapin), à l'artère centrale (lapin). Le personnel est également formé au prélèvement d'urine par mise en place d'une sonde vésicale (chien) ou par ponction de la vessie (rat, souris).

Les techniques de chirurgie pour lesquelles une formation est requise afin de maîtriser l'acte technique correspondent aux chirurgies de cathétérisme d'une veine, de mise en place d'implants de télémétrie, d'implantation cérébrale, d'ischémie focale transitoire cérébrale par occlusion de l'artère cérébrale moyenne, de lésion cérébrale uni ou bilatérale, de réalisation de modèles de douleur ou d'inflammation, d'exérèse (ablation d'un organe/tissus, ou d'une partie d'un organe). La formation à ces techniques est réalisée sur les espèces cibles tels que les rats, souris, cobayes, gerbilles, hamsters, lapins, chiens, furets, porcs.

La formation du personnel est indispensable pour maîtriser les actes techniques, éviter la souffrance animale, limiter le risque d'erreur dans les procédures et limiter l'utilisation du nombre d'animaux. Ainsi, une bonne maîtrise de l'acte permet le respect de la règle des 3R. Vingt rongeurs (rats, souris, hamsters, cobayes, gerbilles) ou 5 non rongeurs (furets, chiens, porcs, lapins) sont nécessaires pour chaque type de formation pour reproduire de façon fiable l'acte technique.

1257. L'objectif général de ce projet est d'étudier les mécanismes responsables du développement et du maintien des douleurs neuropathiques, afin de pouvoir identifier de nouvelles pistes thérapeutiques. Pour ce faire, nous nous intéressons à

la plasticité du réseau neuronal spinal, qui est connu pour jouer un rôle crucial dans la transmission et l'intégration des informations signalant la douleur.

La douleur est une sensation désagréable mais utile permettant de détecter et d'éviter les stimuli potentiellement nocifs pour notre organisme. Cependant dans certains cas pathologiques, tels qu'une lésion nerveuse, la douleur perd sa fonction protectrice et devient invalidante. Ces douleurs dites neuropathiques s'accompagnent d'états d'hyperalgésie (augmentation de l'efficacité d'un stimulus nociceptif) et d'allodynie (situation dans laquelle un stimulus non nociceptif devient douloureux). Chez l'homme, l'allodynie est une composante importante des douleurs chroniques (douleurs qui persistent dans le temps) qui sont malheureusement résistantes à la plupart des traitements utilisés en clinique.

La transmission synaptique inhibitrice spinale joue un rôle essentiel dans l'intégration et la modulation des informations nociceptives. Suite à une lésion nerveuse, des changements plastiques mènent entre autre à une diminution de l'inhibition synaptique spinale. Il s'agit là d'un des mécanismes supposés être à l'origine du développement et du maintien des douleurs neuropathiques. D'autre part, les récepteurs NMDA recrutés suite à une lésion nerveuse jouent un rôle important dans le développement des douleurs neuropathiques et ils sont connus pour être impliqués dans les phénomènes plastiques au sein du système nerveux (LTP, LTD, ...). En revanche, l'implication de ces récepteurs dans la plasticité de la transmission synaptique inhibitrice au sein du réseau nociceptif spinal n'est pas connue à ce jour.

L'objectif de notre projet est d'étudier l'implication du récepteur NMDA dans la plasticité de l'inhibition synaptique spinale. Cette étude sera réalisée principalement par une approche électrophysiologique *in vitro* (patch-clamp sur tranche de moelle épinière de souris), associée à des approches histologiques. Ces expériences seront réalisées sur souris contrôles et uniquement si nécessaire des souris génétiquement modifiées. Nous utiliserons un modèle de douleur neuropathique afin d'étudier la plasticité de l'inhibition synaptique dans cette condition.

L'ensemble des expériences utilisera 825 souris pour les 5 années du projet. L'ensemble de ce projet a été élaboré en prenant en considération les exigences éthiques de réduction, raffinement et remplacement des procédures sur l'animal. Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour réaliser les tests statistiques. Aussi, l'analyse des données sera menée au fur et à mesure des expériences et le nombre d'animaux ajusté en conséquence. Les animaux seront maintenus en cage collective avec environnement enrichi. L'ensemble des procédures invasives seront effectuées sous anesthésie générale et des contrôles quotidiens de l'état de santé et du comportement des animaux seront effectués dès lors que l'animal entre en expérimentation. Ce projet portant sur l'étude d'un système intégré et mature, il nous a été impossible de remplacer l'utilisation d'animaux par des tests *in-vitro*. Cependant, nous avons privilégié autant que possible les expériences *in vitro* ne nécessitant pas d'animaux supplémentaires. En effet, 200 animaux transgéniques prévus dans ce projet, ne seront que si les approches *in-vitro* prévues venaient à échouer.

1258. Le cancer de la prostate (PCa) est le problème majeur de santé pour les hommes et il est le deuxième cancer le plus mortel dans le monde. La radiothérapie fait partie du traitement de référence pour les tumeurs localisées à la prostate. Bien que la plupart des tumeurs répondent à la radiothérapie, certaines sont résistantes. De plus, la radiothérapie ne permet pas toujours d'éradiquer entièrement la tumeur. Par conséquent, il existe un risque de rechute accompagnée souvent de métastases. Il est donc important de sensibiliser les tumeurs à la radiothérapie.

Dans le cadre de ce projet, des nanoparticules, (c'est-à-dire des objets présentant un diamètre compris entre 1 et 100 nm) inertes, d'une taille de 50 nm, conçues pour absorber spécifiquement les rayons X utilisés en radiothérapie, sont testées. Lors de leur exposition aux rayonnements ionisants (c'est-à-dire des rayonnements électromagnétiques, comme les rayons X, capables d'émettre une quantité d'énergie suffisante pour enlever ou ajouter une charge à un atome qui n'est donc plus neutre électriquement et devient un ion), elles s'activent et déposent une quantité très importante d'énergie à l'intérieur des cellules tumorales, provoquant la formation de radicaux libres détruisant les cellules cancéreuses. Ces nanoparticules permettent donc d'amplifier la dose de rayonnements ionisants au sein même de la tumeur.

Ce projet a pour but de montrer que la réponse antitumorale des nanoparticules activées par la radiothérapie est supérieure à celle de la radiothérapie seule, en termes d'efficacité et/ou de survie, dans 2 modèles de tumeurs (un hormono-dépendant et un hormono-indépendant). Des fragments de tumeurs dérivées d'un patient seront greffés de façon sous-cutanée à des souris immunodéficientes. Environ 37 jours après la greffe, les tumeurs auront atteint un volume compris entre 60 et 200 mm<sup>3</sup>, les animaux seront alors randomisés en 8 groupes de 6 à 8 souris. Les nanoparticules (ou le véhicule, solution 5% glucose) seront injectées directement dans la tumeur. Le lendemain, les souris seront placées dans un système de contention avant d'être disposées sous un cache en cerrobend (pour protéger le reste du corps de l'animal) et les tumeurs seront localement irradiées (sauf pour les groupes contrôles). Une mesure de la croissance tumorale sera effectuée sur les animaux pendant au moins 3 mois.

Actuellement, en l'état de la recherche, il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant de déterminer de manière fiable la répartition des nanoparticules dans les différents organes (biodistribution) et la tolérance de ces nanoparticules activées par la radiothérapie. Une estimation préalable du nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables a été mise en place. L'expérimentation animale n'ayant pas pu être évitée, les modèles tumoraux ont été choisis avec soin et pour ce projet 276 souris seront nécessaires afin de répondre à l'objectif cité précédemment.

Les animaux seront sacrifiés dès qu'un signe de souffrance apparaîtra : perte de poids supérieur à 20% (corrigée du poids estimé de la tumeur et par rapport au poids initial) sans reprise, difficulté à se nourrir à se déplacer, prostration ... L'inconfort, la douleur ou l'anxiété subie par les animaux, seront pris en compte afin de les réduire ou de les supprimer par des anesthésiques et/ou analgésiques (buprénorphine en sous-cutanée à 0,1mg/kg toutes les 12 heures pendant 5 jours).

Ces résultats permettront d'appréhender les effets des nanoparticules activées par la radiothérapie dans des modèles de cancer de la prostate afin de préparer de futurs essais cliniques chez l'homme.

1259. L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe notamment des composés thérapeutiques dans le domaine de l'obésité. Le principal objectif de l'étude est d'évaluer les effets d'un traitement aigu par 20 composés (1 à 20) en développement (la dénomination des composés est sujette à confidentialité) sur le métabolisme énergétique chez la souris et de comparer ces effets à ceux d'un composé de référence. Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de détailler l'efficacité et les mécanismes d'action de leurs composés anti-obésité.

Le présent projet sera mené en 5 séries expérimentales successives, chaque série visant à tester simultanément 4 des composés du client.

Les animaux seront placés dans des cages intelligentes pour une période de 72h pendant laquelle les consommations alimentaire et hydrique, l'activité locomotrice et les échanges respiratoires seront mesurés à haute fréquence de manière continue et automatisée. La phase d'enregistrement de 72h se divisera en une première phase d'habituation de 24 heures, à l'issue de laquelle les animaux recevront un traitement aigu (composé, composé de référence ou véhicule) par voie intrapéritonéale ou par gavage oral, immédiatement suivi d'une nouvelle phase de 48h de mesure des paramètres cités ci-dessus (phase expérimentale proprement dite).

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

- Raffinement: les cages intelligentes utilisées réalisent des mesures de façon totalement automatisées et de façon non invasive, ce qui permet de limiter très fortement le niveau de souffrance et de stress qui peut résulter des procédures expérimentales. Néanmoins, ce dernier sera évalué quotidiennement pour chaque animal à l'aide d'une table de scores de souffrance bien éprouvée.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de résultats obtenus lors d'études antérieures menées dans le cadre d'étude antérieures. Le nombre de 8 animaux par groupe a été défini comme le nombre minimum d'animaux à utiliser pour pouvoir mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés. Un total de 240 souris C57Bl/6 sera utilisé, divisé en 30 groupes de 8 animaux : 5 séries expérimentales, chaque série utilisant 6 groupes de 8 animaux recevant l'un des 4 composés à tester (parmi les 20 composés du client), le composé de référence ou le véhicule.

- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de comportements tels que la consommation alimentaire, la prise hydrique, les dépenses énergétiques et l'activité locomotrice. Le modèle animal envisagé est un modèle de souris C57Bl/6 qui est particulièrement bien documenté dans la littérature dans l'étude du métabolisme énergétique et classiquement employé dans le cadre d'études précliniques menées sur des composés visant le traitement des troubles du métabolisme. Le choix du modèle souris a été validé avec le client.

1260. Les glioblastomes sont des tumeurs cérébrales de très mauvais pronostic, avec une survie médiane des patients à 15 mois après le diagnostic. La prise en charge de ces pathologies se fait de manière tardive car les symptômes se manifestent à des stades avancés du développement tumoral. Les traitements actuels consistent, lorsque c'est possible, en une exérèse chirurgicale suivie d'un traitement de chimio et/ou radiothérapie. D'une manière générale, cette prise en charge est palliative plus que curative et impose un constat d'échec pour ces thérapeutiques. Il est donc nécessaire de développer des stratégies thérapeutiques innovantes. Ces projets de recherche disposent d'un modèle de rats génétiquement modifiés présentant des tumeurs cérébrales de manière spontanée en vieillissant. Cette lignée de rats transgéniques unique au monde n'est pas commercialisée. Aucun modèle alternatif ne permet d'étudier les réactions physiopathologiques corps entier associées à la présence d'une tumeur. De plus, le cycle de reproduction rapide du rat garantit d'obtenir dans un délai raisonnable d'un nombre suffisant d'individus pour les études scientifiques. Mutualiser un élevage unique utilisé pour différents projets, permet de réduire le nombre d'animaux total utilisés pour l'ensemble de ces projets. Les schémas d'accouplement permettent en outre le maintien du modèle sur un fond génétique stable, donc de fournir dans la durée un modèle de référence calibré au plus juste.

Sur une durée de cinq ans, ce projet prévoit la génération de 500 rats, permettant le maintien respirant de cette lignée dont la reproduction peut être délicate, tout en fournissant des animaux pour des procédures expérimentales (surplus d'animaux dans les portées et réforme des géniteurs). Le développement tumoral spontané sera limité à une douleur modérée qui pourra être néanmoins traitée à l'aide de produits morphiniques.

1261. La neurostimulation des racines sacrées (NRS) est un traitement récent des troubles de la motricité digestive au niveau du côlon et du rectum. Sa principale indication est l'incontinence anale, pour laquelle la NRS améliore la qualité de vie des patients en diminuant le nombre de fuites. Plusieurs études préliminaires chez l'homme ont montré une efficacité dans la constipation ainsi que dans le syndrome de l'intestin irritable. Par ailleurs, une étude portant sur des patients avec incontinence anale et maladie inflammatoire (Crohn rectal) a montré une amélioration des symptômes à la fois sur la continence, mais aussi sur la maladie elle-même. Néanmoins, dans cette étude préliminaire, il n'a pas été montré d'effet anti-inflammatoire propre de la NRS. Nous avons donc mis au point un modèle préclinique porcin pour étudier l'impact de la NRS sur la muqueuse rectale. Cette étude a clairement mis en évidence un renforcement de la barrière épithéliale intestinale, ce qui pourrait avoir des effets bénéfiques en cas de lésion de la barrière intestinale. Or les maladies inflammatoires comme la rectite présentent des lésions de la barrière épithéliale. Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (Crohn et Rectocolite

ulcéro-hémorragique (RCH)) sont des maladies invalidantes, qui peuvent entraîner des douleurs, une altération majeure de la qualité de vie, et la nécessité de recourir à des interventions chirurgicales avec des séquelles parfois importantes en termes de transit intestinal. Leur traitement repose sur les corticoïdes et les immunosuppresseurs. Néanmoins, environ 20% des patients pour la RCH, et 80% pour la maladie de Crohn devront être opérés au cours de leur suivi. Dans ce contexte, le développement, pour les maladies inflammatoires, de traitements innovants comme la NRS pourrait représenter une alternative prometteuse, si des effets de renforcement et de reconstitution de la barrière intestinale ainsi qu'anti-inflammatoires étaient démontrés. Ce projet, faisant suite au projet 00348.02 autorisé, cherche à montrer dans un modèle d'inflammation induit par des lavements au TNBS (2,4,6- trinitrobenzene sulfonic acid), que la NRS a des effets anti-inflammatoires et réparateurs de la muqueuse rectale. Dans ce projet, nous utiliserons un maximum de 28 porcs (6 à 8 porcs par groupe). Dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés, les groupes étudiés dans ce projet seront comparés aux groupes déjà étudiés lors du projet 0348.02 (y compris groupe contrôle) selon la règle des 3R. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, les procédures de ce projet sont réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement antalgique leur est donné de façon adaptée en fonction de la procédure.

1262. Les laboratoires de recherches privés ou académiques emploient de nombreux techniciens intervenant directement dans la mise en oeuvre de projets scientifiques utilisant des animaux vivants. Ces projets ont pour but d'améliorer à la fois nos connaissances mais aussi la santé humaine ou animale. L'objectif de ce projet est d'assurer les compétences des agents réalisant des procédures expérimentales sur rongeurs conformément à la directive 2010/63/UE et le décret du 1er février 2013 sur l'utilisation des animaux vivants en expérimentation animale. Dans le cadre d'un module de spécialisation rat-souris, 2 séances de travaux pratiques (2x4h) seront réalisées chez le rat vigile. Un 1er TP, consistera en une manipulation de l'animal suivie d'habituation et de l'observation comportementale lors de tests de motricité (open field, rotarod, etc...), de sensibilité mécanique (toucher), et de phénotypage comportemental (labyrinthes, shuttle box...). Un 2ème TP réalisé avec les mêmes animaux (1 jour après le 1er TP) consistera à former les participants aux principales techniques faiblement invasives de préhension manuelle en vue d'administrations de sérum physiologique en mode sous cutané, intraperitonéal, intramusculaire, intraveineux, gavage et de prélèvement sanguin intraveineux (au niveau de la queue). Le nombre total d'animaux sera de 60 rats. La règle des 3 R sera respectée sachant que des méthodes alternatives ne sont pas disponibles en remplacement des procédures faiblement invasives dont l'apprentissage sur animal est un requis fondamental dans ce type de formation. De plus le nombre d'animaux (1 par participant) a été réduit au minimum nécessaire et suffisant pour assurer un apprentissage de qualité et les compétences demandées.

1263. La transplantation, dite ABO incompatible, a connu récemment un essor considérable, du fait des excellents résultats publiés par la plupart des équipes actives dans le domaine, sous couvert de précautions particulières préparatoires à la greffe et d'un suivi et monitoring rigoureux des anticorps. En effet, les survies à moyen et long terme de ces transplantations, sont tout à fait équivalentes désormais à celles de greffes ABO compatibles et ce malgré le retour ou la persistance des anticorps anti-érythrocytaires, faisant qualifier ce phénomène d'accommodation. La compréhension de ce phénomène s'avère majeure car il s'agit d'une véritable protection d'un organe vis-à-vis d'une réponse humorale qui pourrait être déclinée et transposée à diverses autres situations de transplantation comme chez le patient immunisé vis-à-vis de son donneur.

Précisément, outre la transplantation ABO incompatible, la situation expérimentale la plus communément impliquée dans cet enjeu de l'accommodation est la transplantation à travers la barrière du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), dans lesquelles les anticorps anti-donneurs générés vont de première intention agresser l'endothélium. Une conséquence est que ces patients restent parfois de longues années en liste d'attente, et certains d'entre eux meurent avant de se voir proposer un greffon.

Nous avons développé un modèle préclinique de rejet aigu à médiation humorale chez le porc. Les receveurs d'organe sont pré-immunisés contre leur donneur au moment de l'allo-transplantation rénale mimant la situation clinique des patients dit "hyperimmunisés", patients les plus difficiles à greffer car présentant un très fort risque de rejet à médiation humorale aigu (RHA), qui actuellement n'est pas toujours maîtrisable. Ainsi ce modèle nous permet d'étudier et de tester différentes immuno-interventions innovantes en prévention du RHA.

A partir de ce modèle de receveurs pré-immunisés contre leur donneur, nous souhaitons mettre en place de façon complémentaire et innovante un modèle d'accommodation d'un rein transplanté dans un contexte ABO incompatible (en présence d'anticorps anti-érythrocytaire) et d'allo-immunisation (en présence d'anticorps anti-CMH du donneur) pré-greffe.

Le nombre d'animaux maximal utilisé sera de 36. Cette étude se développera selon 3 phases:

- 1) identifications des paramètres d'accommodation *in vitro* à partir de cellules endothéliales du donneur et de différentes concentrations du sérum immunisé du receveur,
- 2) mise au point du pré-conditionnement de l'organe selon différentes conditions,
- 3) allo-transplantation d'organes pré-conditionnés selon les conditions définies ci-dessus.

Ainsi dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, le nombre maximum d'animaux prévus pour chaque phase est susceptible de diminuer selon les résultats obtenus dans les phases précédentes. D'autre part, et toujours dans un souci de réduction du nombre d'animaux nécessaires à l'étude, les reins d'un même et seul donneur seront greffés simultanément à deux receveurs différents. Dans un souci de limiter le stress et la douleur, toutes les procédures sont réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale, et un traitement antalgique adapté est mis en place selon la procédure.

1264. La robustesse des animaux d'élevage est une propriété importante des femelles reproductrices vis-à-vis des enjeux de pérennité et de durabilité des élevages de ruminants en situations d'aléas. Cette notion renvoie à la capacité des animaux à s'adapter aux perturbations liées à leur environnement. L'objectif de ce projet est de tester l'hypothèse suivante : la précocité des vaches (aptitude à acquérir rapidement leurs caractéristiques adultes) est-elle un levier d'adaptation et donc de robustesse des femelles reproductrices face à un aléa nutritionnel ?

Pour répondre à cette question, nous souhaitons mettre en place une expérimentation impliquant 20 vaches de races charolaise et salers, différant par leur précocité. A partir du vêlage, la moitié des animaux sera soumise à une restriction modérée des apports alimentaires (70% des recommandations) et ce jusqu'à la mise à l'herbe (environ 70 jours) tandis que l'autre moitié sera alimentée au-delà des recommandations alimentaires (120% des recommandations). A la mise à l'herbe, les femelles reproductrices seraient conduites ensemble au cours des 80 premiers jours de pâturage.

Au cours de cette période d'expérimentation, un certain nombre de mesures relatives à l'ingestion (quantité ingérée en fourrage et pâturée) et aux animaux (poids, note d'état corporel et diamètre des adipocytes, production de lait, profil plasmatique métabolique, reproduction) sera suivi finement. L'ensemble de ces paramètres sera étudié conjointement afin de comprendre quelles sont les adaptations physiologiques et/ou comportementales mises en place par les femelles au cours de cette expérimentation.

A terme, le but est que cette expérimentation serve de référence en vue de la transposition d'un certain nombre de mesures de phénotypage sur les sites expérimentaux du Pin et de Bourges (sur des effectifs plus importants : en moyenne 150 génisses /an sur chaque site).

1265. La transplantation d'organe est la seule issue thérapeutique pour la plupart des pathologies conduisant à une perte irréversible de la fonction des organes vitaux.

Le greffon (l'organe transplanté) est étranger à l'organisme du receveur et engendre une réaction immunitaire dite de « rejet », aigu ou chronique qui reste la première cause de perte de fonction du greffon à long terme. L'incidence de rejet aigu à un an après transplantation varie entre 10% (rein) et 50% (poumon) (source : inserm).

Afin d'assurer la réussite d'une transplantation (à savoir prévenir et minimiser les rejets afin de garantir une survie à long terme des greffons), le patient est soumis à un traitement immunosuppresseur visant à déprimer son immunité. Ces traitements diffèrent en fonction de la période après la greffe. Parmi les traitements dit « d'induction » administrés immédiatement après la greffe, le plus largement utilisé demeure le Sérum Anti-Lymphocytaire (SAL) ou globulines (IgG) anti-lymphocytaires. Ces anticorps sont produits par l'immunisation d'animaux (IgGs de lapin actuellement commercialisés) contre des antigènes lymphocytaires humains. Cependant, ce traitement entraîne de nombreux effets secondaires en relation avec l'immunisation des receveurs contre les antigènes « animaux », parmi lesquels la maladie sérique qui associe fièvre, arthralgies, et lésions au niveau de la greffe.

Des travaux récents ont montré une relation entre la maladie sérique est une survie écourtée du greffon et caractérisent plusieurs antigènes impliqués dans la survenue de cette MS. Ces travaux ouvrent la possibilité de produire un « SAL innovant » capable de limiter la survenue de cet effet indésirable. Un nouveau procédé de production a fait l'objet d'une demande de brevet et ce projet a trait à apporter une première étape de validation de cette invention.

L'objectif principal de ce projet est de valider i) l'efficacité immunosuppressive de ce nouveau SAL sur un modèle de greffe rénale chez le babouin (évaluation de la durée de vie du greffon) et ii) l'innocuité in-vivo de cette nouvelle stratégie thérapeutique.

Le nombre maximum d'animaux utilisés au cours de cette étude sera de 15. Dans un souci de respect de la règle des 3R, les reins d'un même et seul donneur seront greffés simultanément à deux receveurs différents. Enfin, les groupes d'animaux dits « contrôles » (sans traitement) et avec traitement faible dose du Tacrolimus (Immunosuppresseur) déjà réalisés dans des études précédentes, ne seront pas refait. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, tous les protocoles de ce projet sont réalisés chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement antalgique leur est donné de façon adaptée en fonction de la procédure. Les animaux sont hébergés avant protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental les individus traités sont hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères.

1266. Le but général des études menées dans le cadre de ce programme est de mieux comprendre d'un point de vue fondamental les mécanismes adaptatifs de l'animal soumis aux challenges environnementaux. Ceci est particulièrement important dans le cadre des changements globaux tels que nous les connaissons actuellement.

Pour réaliser ce projet, nous allons étudier chez le manchot royal : 1) les relations hôtes-parasites, en nous intéressant aux caractéristiques qui rendent un hôte donné, le manchot royal, plus « profitable » pour un parasite, la tique; 2) la relation entre la qualité individuelle, le choix des partenaires et les résistances au stress et au jeûne prolongé; 3) la stratégie de reconstitution des réserves énergétiques en mer selon leur degré d'épuisement préalable lors des séjours à terre et 4) la relation entre timing de la reproduction et fitness. Au total(460 animaux) les effectifs prévisionnels d'animaux vigiles utilisés dans ce projet sont de 120 couples d'adultes et leurs 120 poussins (l'effectif de poussins est maximal, l'effectif réel dépend du succès à l'éclosion), 20 mâles adultes en début de reproduction et 40 adultes en mue de pré-reproduction et leurs 40 partenaires de reproduction (cet effectif des partenaires de reproduction est maximal il dépendra du succès de recontrôle des 40 oiseaux ayant mué venant ensuite se reproduire). Il est également prévu de collecter des échantillons sur un maximum de 10 adultes, 100 poussins et 50 œufs victimes de prédation par les prédateurs naturels.

Dans nos protocoles nous intégrons la règle des 3 R en réalisant la plupart du temps nos expériences sur deux saisons, ceci nous permet de Réduire le nombre d'animaux manipulés la deuxième saison en fonction des résultats obtenus la première. De plus nous réalisons une partie de nos études sur des animaux victimes de prédation naturelle, ce qui Réduit le nombre de manipulations sur des animaux vigiles et nous mutualisons nos études avec d'autres programmes quand c'est possible (PE 4 par exemple) ou en n'utilisant qu'un groupe d'oiseau pour plusieurs problématiques (PE 2 par exemple). En termes de Raffinement de nos études nous tenons compte des caractéristiques de la biologie de ces oiseaux. Ainsi nous les faisons jeûner dans des conditions (PE 2 ou P5) qui correspondent à celles qu'ils rencontrent naturellement durant la mue ou la reproduction, aux mêmes périodes alors qu'ils y sont préparés physiologiquement, nous utilisons des cagoules pour les calmer lors des manipulations, et nous arrêterions les manipulations en cas de polypnée (indice du stress de l'animal). Enfin, si dans ce type d'étude il n'est pas possible de Remplacer littéralement les modèles animaux nous avons pris soin de choisir pour répondre à notre problématique une espèce animale en effectifs importants et présente dans de nombreux sites au travers de l'Océan Austral ; de plus nous ne travaillons que dans une seule des nombreuses colonies de l'archipel Crozet. Ces expérimentations nous permettront de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux compromis entre la reproduction en cours et future, ainsi qu'entre la survie à court et à long terme. Parallèlement, nous allons déterminer l'impact d'un environnement variable sur la croissance du poussin en déterminant la cinétique de maturation des tissus (muscles locomoteurs et squelette). Le but ultime de ces travaux est de comprendre la relation entre les modalités de croissance des poussins et l'impact à court terme sur le phénotype du jeune adulte.

1267. Les sérums anti-lymphocytaires (SAL) sont des immunoglobulines ciblant des cellules humaines, et sont largement utilisés en thérapeutique humaine pour prévenir les rejets de greffe. Leur utilité a aussi été prouvée dans de nombreuses autres applications, comme le traitement du rejet aigu de greffe, la réaction du greffon contre l'hôte en greffe de moelle, ou l'anémie aplasique par exemple. Ces immunoglobulines sont obtenues par immunisation de lapins ou autres espèces animales contre des lymphocytes humains (cellules essentielles dans l'initiation des rejets) et purifiées à partir de ces sérums immuns. Actuellement, les SALs proposés commercialement sont principalement produits chez le lapin. Notre objectif est de proposer un nouveau SAL d'origine porcine, possédant de nouvelles caractéristiques et moins d'effets secondaires (effet immunogène moindre). De plus, l'utilisation du porc au lieu du lapin pourrait, compte tenu de leur poids supérieur et des connaissances sur leur élevage, permettre la réalisation de prélèvements sanguins itératifs sans nécessité de sacrifice d'animaux. L'étape préliminaire à l'obtention de ce SAL est d'optimiser la procédure d'immunisation dans cette espèce, afin d'obtenir un sérum immun efficace, ainsi que des immunoglobulines polyclonales d'un titre et d'une affinité satisfaisante pour les applications thérapeutiques proposées. Dans ce sens, les expériences présentées ici représentent une étape comparative avec le protocole initial décrit dans l'autorisation de projet 00007.01. Suite aux résultats encourageants obtenus lors de première phase, ces nouvelles expériences visent à améliorer le protocole d'immunisation initialement établi chez le porc. Dans ces expériences, deux protocoles différents seront réalisés, pour un nombre maximum de 9 animaux utilisés. Par souci du respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux par groupe est réduit au minimum nécessaire pour s'affranchir de la variabilité interindividuelle tout en s'assurant de la validité des résultats. Les résultats obtenus ici seront comparés à ceux de l'étude réalisée préalablement au cours de la première phase. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures de ce projet sont réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement antalgique leur est donné de façon adaptée en fonction de la procédure.

1268. Les perturbations métaboliques constituent l'une des principales caractéristiques de nombreuses pathologies (syndrome métabolique, obésité, diabète) conduisant au développement de l'athérosclérose, première cause de mortalité dans les pays occidentaux. La fréquence des perturbations métaboliques est élevée et représente une charge importante, à la fois sociale et financière. Ces perturbations sont à l'origine de 40% des frais médicaux et d'hospitalisation en France. L'approche nutritionnelle représente une voie essentielle de prévention des troubles métaboliques. De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence la relation inverse entre la consommation de certains aliments comme les fruits et légumes et les maladies cardiovasculaires. Des composés issus de ces aliments (e.g. les polyphénols) rendraient au moins en partie compte de ces effets. Cependant, l'impact métabolique des nutriments ainsi que leurs cibles cellulaires restent à identifier. De plus, la variabilité de la qualité nutritionnelle engendrée par la diversité génétique des plantes sources de ces aliments ou par les conditions de production ou de conservation est rarement prise en compte dans la mesure de cet impact. Le projet vise l'identification et l'optimisation de l'impact de nutriments contre les maladies métaboliques et cardiovasculaires (principalement le développement de l'athérosclérose et ses conséquences). Il propose d'aborder de façon intégrative l'impact de la variabilité végétale sur la santé humaine afin d'orienter la conduite des productions vers une composition optimisée de nutriments bénéfiques. Il établira son modèle de recherche à partir de composés issus de la carotte et de la pomme. La carotte est un aliment santé par excellence du fait de sa richesse en antioxydants (caroténoïdes, polyphénols) et en fibres. La pomme est un pourvoyeur de fibres, glucides, acides organiques, polyphénols et minéraux. Des travaux épidémiologiques suggèrent que leur consommation participerait à la prévention de certains cancers, de maladies cardiovasculaires, du diabète ou encore de la dégénérescence maculaire. La méthodologie de notre étude sera la suivante : après avoir préalablement étudié les effets des échantillons de pommes et de carottes sur le métabolisme de différents types cellulaires (hépatocytes, adipocytes, cellules musculaires lisses et endothéliales, macrophages), nous sélectionnerons deux échantillons de pomme et deux échantillons de carotte. A partir de ces échantillons, nous effectuerons une analyses phytochimiques afin d'identifier les molécules et nutriments responsables des effets observés. Ce sont ces échantillons sélectionnés que nous introduirons dans l'alimentation des souris dès le plus jeune âge (sevrage) afin d'étudier leur impact sur les paramètres biologiques, vasculaires et

immunitaires des animaux. Pour l'ensemble du projet nous utiliserons un total de 320 souris (160 souris d'un modèle hypercholestérolémique et 160 souris d'un modèle témoin). Les principes de remplacement, de réduction et de raffinement seront respectés. Les procédures ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

1269. La radiobiologie cherche à potentialiser les effets des rayonnements ionisants (RI), utilisés en radiothérapie sur les tissus tumoraux, et de minimiser au maximum l'impact de ces derniers sur les tissus sains. Effectivement, la difficulté à délimiter exactement une tumeur et les marges nécessaires à prendre au niveau de sa périphérie font que les RI traversent aussi les tissus sains. Lors de cancers de la tête et du cou, les effets secondaires à court terme de l'interaction tissus sains - RI peuvent se manifester sous de très nombreuses formes (érythème cutané, desquamations, pharyngite, ...) et notamment sous forme de mucite buccale (inflammation de la muqueuse). La mucite buccale est très fréquente (97 à 100% des patients en fonction du fractionnement de la radiothérapie). Elle est à l'origine d'une altération considérable de la qualité de vie pour le patient, limite le traitement et peut même parfois réduire l'espérance de vie des patients. L'objectif du projet que nous souhaitons mener, est de tester, sur un modèle murin, une application locale à l'aide d'un gel d'une molécule déjà connue pour protéger les tissus sains ORL des RI sans protéger la tumeur. Cette molécule sera dissoute dans le gel étudié, ce dernier possédant des propriétés particulières, lui permettant une bonne diffusion de la molécule à l'endroit désiré. L'utilisation de ce gel en thérapeutique humaine pourrait permettre d'utiliser des molécules à fort potentiel en local mais qui ont de forts effets secondaires en systémique. Pour mener à bien ce projet et avoir une idée précise du potentiel en thérapeutique humaine de ce nouveau produit, une centaine de souris sera nécessaire à son évaluation. Cette estimation se base sur des analyses statistiques qui permettent de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans cette étude. Le développement des effets radio-induits chez les animaux seront suivis une à deux fois par jour en fonction de leur sévérité. Le scoring de ces effets se fera avec le score de Parkins. De la même manière, un suivi quotidien voire biquotidien des éventuels signes de souffrance sera effectué. Les souris seront sacrifiées dès qu'un point limite sera atteint.

1270. Ce projet consiste à évaluer l'innocuité de l'administration d'une dose et d'une dose répétée d'un produit immunologique destiné à protéger une espèce de carnivore domestique contre une maladie mortelle pour cette espèce. La réalisation de ce projet comprend une seule procédure expérimentale permettant d'évaluer à la fois l'innocuité de l'administration d'une dose et l'innocuité de l'administration d'une dose répétée de ce produit immunologique. La procédure expérimentale du projet est conçue sur la base des exigences des textes réglementaires en vigueur (Monographie de la Pharmacopée Européenne). Les exigences de remplacement, raffinement et réduction (3R) seront considérées à travers : - l'observation quotidienne des animaux, - l'hébergement en groupe et l'enrichissement des box, - la définition de points limites adaptés pour éviter toute souffrance ou douleur inutile à un animal. - un nombre d'animaux strictement conforme aux recommandations des textes réglementaires : le nombre d'animaux sera de 8 ; si la procédure devait être refaite, il conviendra de doubler le nombre total d'animaux, soit 16 au maximum pour ce projet.

1271. Les parasites internes du cheval peuvent être mortels et affectent le bien-être et les performances des chevaux, même adultes. Le contrôle de ces infestations repose sur l'administration de vermifuge. Ces traitements onéreux sont aujourd'hui rendus inefficaces. En effet, certains parasites sont devenus résistants à toutes les molécules disponibles. La fréquence des résistances est en constante augmentation et leur diffusion est mondiale. Cette situation préoccupante pourrait conduire à l'impossibilité de protéger les chevaux de ces parasites. Parmi ces parasites internes, les cyathostomes représentent une menace majeure pour les équidés. Une des stratégies de gestion intégrée des parasites vise à identifier les chevaux les plus infestés et de ne traiter que ces chevaux afin de limiter les traitements appliqués. Un marqueur immuno-diagnostique rendant compte du niveau d'infestation des chevaux a récemment été développé et un premier projet a permis d'établir la dynamique de la réponse immunitaire au cours d'une saison de pâture. Notre projet vise désormais à étudier les conséquences épidémiologiques liées à l'utilisation de ce marqueur dans un schéma de vermifugation raisonné. Pour cela le projet consistera à suivre deux lots de 20 poneys au pré. La vermifugation dans le 1er lot sera décidée sur la base du dosage du marqueur immuno-diagnostique tandis que le niveau d'excrétion fécale d'œufs de parasite conditionnera la vermifugation du 2e lot. Dans chaque cas, une évaluation de la contamination des prairies ainsi que le niveau de bien-être des chevaux seront comparés entre les lots. De plus, les niveaux individuels d'excrétion fécale d'œufs de parasite et les concentrations individuelles en marqueur immunologique seront déterminées. Au total 40 poneys seront utilisés pour cette expérimentation.

1272. Les troubles envahissants du développement, y compris les troubles du spectre autistique (TSA) sont associés à des dysfonctionnements du comportement, de la cognition et de la perception. Un nombre croissant de preuves associe aussi depuis peu les TSA avec des troubles moteurs complexes, dont l'ataxie. Plusieurs cliniciens vont jusqu'à proposer que ces déficits moteurs peuvent être prédictives des TSA surtout qu'ils semblent apparaître avant les troubles comportementaux et cognitifs; il est même soupçonné que les dysfonctionnements moteurs pourraient sous-tendre du moins en partie des fonctionnalités cognitives associées aux TSA. Une attention particulière dans nos études actuelles et futures est faite sur le striatum et le cervelet, et leurs implications dans les troubles du mouvement associés à des pathologies du développement psychiatriques tels que l'autisme et les pathologies apparentées. L'objectif du projet est d'utiliser différents modèles animaux

de l'autisme (souris C57/Bl6), de caractériser leur activité motrice, qui n'a que peu été réalisé auparavant, et de disséquer les réseaux neuronaux impliqués dans ce trouble au niveau anatomique, électrophysiologique et neurochimiques. Nous émettons l'hypothèse que cette caractérisation peut ouvrir une nouvelle voie dans le diagnostic quantitative de ces troubles, et potentiellement identifier les réseaux neuronaux communs qui sous-tendent les troubles cognitifs caractéristiques de ces pathologies.

1273. Des facteurs tels que la température ou la nutrition peuvent moduler le métabolisme des animaux. A l'heure actuelle, nous cherchons à améliorer la capacité d'adaptation des poulets de chair aux conditions d'élevage en orientant leur métabolisme de manière précoce. Récemment, il a été montré que l'injection dans l'œuf de différents nutriments (substrats énergétiques, acides aminés, acides gras...) modifiait durablement le métabolisme des embryons et induisait des différences de performances des poussins à l'éclosion (poids, stock de glycogène, rendement en filet), et que ces modifications restaient pérennes jusqu'à l'âge d'abattage des animaux. Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons identifier des nutriments capables de moduler la programmation embryonnaire des oiseaux, mieux comprendre l'utilisation des nutriments par l'animal afin d'améliorer la qualité du poussin au démarrage, augmenter l'efficacité de son métabolisme et obtenir des animaux adultes plus robustes pouvant s'adapter à des conditions d'élevage données tout en maîtrisant l'élaboration de produits de qualité. Ce projet de manipulation très précoce de l'environnement de l'embryon in ovo a pour finalité d'enrichir les connaissances sur la compréhension des interactions entre nutrition, programmation métabolique et élaboration du phénotype à long terme. Cette approche devrait permettre l'adaptation des animaux à de nouvelles conditions d'élevage. Une première étape consistera à identifier les conditions optimales d'injection (site, dose et âge) d'un nutriment d'intérêt qui garantissent l'éclosabilité, le bien-être des poussins et favorise leur démarrage. Pour respecter la loi des trois R, nous avons étudié la littérature et pris en considération les taux classiques d'éclosabilité décrits suite à des injections de nutriments dans l'œuf. 360 œufs embryonnés de même calibre seront prévus et repartis en un groupe contrôle (non injecté), un lot injecté uniquement avec le diluant (sham) et les œufs restants seront les œufs injectés avec un nutriment d'intérêt. L'éclosabilité et la mortalité embryonnaire seront évaluées et les animaux seront caractérisés à l'éclosion (qualité du poussin, poids,...). Les animaux seront mis en élevage jusqu'à J7. 24 animaux (12 mâles et 12 femelles) seront euthanasiés à J0 et à J7 et des prélèvements de tissus seront réalisés pour caractériser les animaux et évaluer le démarrage des poussins. Suite à cette première caractérisation générale, une seconde expérience sera mise en place pour comprendre les modifications métaboliques induites par la nutrition in ovo et vérifier que les effets observés restent pérennes jusqu'à J35. Trois lots (voire seulement 2 si le sham n'est pas différent du contrôle) de 100 œufs seront alors mis en incubation et seul le groupe traité présentant les résultats de phénotypage les plus pertinents sera alors testé. Des prélèvements de sang seront alors réalisés sur 12 femelles et 12 mâles de chaque traitement à J0, ces animaux seront ensuite euthanasiés et les différents tissus prélevés en vue des analyses métaboliques. Le reste des animaux sera gardé en élevage classique jusqu'à J35, un nouveau prélèvement de 12 animaux de chaque sexe et chaque traitement sera réalisé comme décrit pour J0 à J7 puis un dernier un J35.

1274. La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative affectant la mémoire et les facultés cognitives, fréquentes surtout chez les personnes âgées au-delà de 65 ans. Cette pathologie est en pleine expansion dans les pays développés, surtout du fait du vieillissement de la population. La physiopathologie de la maladie consiste essentiellement en une dégénérescence neuronale et synaptique dans plusieurs régions du cerveau, du fait de l'accumulation anormale de peptides amyloïdes dérivés de la protéolyse pathologique de la protéine APP (amyloid precursor protein). L'utilisation de souris transgéniques qui n'expriment plus la néprilysine (NEP) dans leur organisme, en particulier au niveau cérébral, constitue un modèle pour l'étude de la maladie d'Alzheimer. En particulier, elles permettent de comprendre le rôle de la NEP dans les modèles animaux de maladies d'Alzheimer. Notre projet est d'utiliser ces animaux pour mettre au point des substances médicamenteuses favorisant la protection des neurones cérébraux au cours du temps et réduisant l'intensité de la maladie d'Alzheimer. Le but du projet est de tester des molécules (60/an, soit 300 sur 5 ans) dans un premier temps dans un modèle en culture de cellules (neuroblastome humain (SH-SY5Y)). Les molécules qui auront données des résultats les plus efficaces seront testées in vivo sur des souris à hauteur de 10 souris transgéniques (NEP négative) et 10 souris non transgéniques (NEP positive) par molécule. Sachant qu'au mieux environ 10 % des molécules, soit 30 substances sur les 5 ans, seront retenues pour la partie in vivo, un maximum de 600 souris sera utilisé pour ce projet. Ce nombre est réduit au minimum statistique acceptable pour pouvoir observer et mesurer un effet de la molécule testée. Pour la reproduction et l'obtention de femelles gravides pour la production de neurones primaires NEP -/-, nous avons besoin de 3 souris mâles et de 6 femelles supplémentaires. Ce qui fait un total de  $600 + 3 + 6 = 609$  animaux. Ou 606 animaux si on ne compte pas les mâles utilisés pour la reproduction. Dans tous les cas, nous avons privilégié l'administration intra-nasale pour le test des différentes substances in vivo. Nous connaissons bien ce mode d'administration. L'animal ne manifeste aucune souffrance apparente, les quantités injectées sont très faibles et la toxicité éventuelle des produits sera testée individuellement au préalable sur un seul animal avec observation pendant 48 heures. Ce procédé permet l'administration cérébrale des divers produits sans se soucier des problèmes de passage au travers de la barrière hémato-encéphalique. Ceci est un gage d'innocuité et d'efficacité. Il n'existe pas de dommages prévus dans l'opération. Les avantages sont potentiellement très importants, puisqu'il s'agit de confirmer in vivo ou en culture de cellules, les mécanismes visant à contrôler par des substances originales spécifiques les causes fondamentales de la maladie d'Alzheimer humaine.

1275. Le diplôme Universitaire de microchirurgie s'adresse à des internes dans des services de chirurgie et permet à ceux-ci d'acquérir la technique, les compétences et le diplôme nécessaire pour pratiquer la chirurgie réparatrice des



microvaisseaux.

Pour acquérir ces gestes il est indispensable de travailler sur des vaisseaux avec du sang circulant pour pouvoir apprendre à réparer ces veines et artères de manière à ce que celles-ci soient à nouveau opérationnelles sans hémorragie et sans thrombose. L'utilisation d'animaux vivants est donc indispensable. Les Rats utilisés dans ces travaux pratiques seront anesthésiés profondément et seront euthanasiés avant leur réveil. Tous les travaux pratiques se feront sous la responsabilité de quelqu'un possédant le niveau de conception des procédures expérimentales et des projets. Les étudiants de ce DU reçoivent au préalable une formation de microchirurgie sur du matériel inerte afin de limiter au maximum le nombre d'animaux ceci afin de respecter au mieux la règle des 3 R. Ce DU est proposé à une dizaine d'étudiants par an et un minimum de 15 séances de travaux pratiques sur animal sont prévues dans le programme il est donc envisagé d'utiliser 150 rats par an environ, ces animaux peuvent, sans conséquences sur les travaux pratiques, appartenir aux souches Sprague ou Wistar et être des mâles ou des femelles ce qui permet d'utiliser les animaux des élevages internes de notre établissement utilisateur toutefois si le besoin s'en faisait sentir nous pourrions acheter éventuellement des Rats chez un fournisseur agréé.

1276. Ce projet a pour objectif de valider l'utilisation du rat dans le cadre d'expérience préclinique et de mettre en œuvre toutes les procédures nécessaires pour obtenir des résultats quantitatifs en imagerie cardiaque TEP (tomographie à émission de positons). Les résultats obtenus seront alors considérés comme la référence lors de futurs projets de recherche utilisant les mêmes protocoles sur d'autres modèles animaux tels que la souris ou le primate non-humain. Le projet proposé se place dans le cadre d'études cardiovasculaires. Il s'agit ici de reproduire les protocoles utilisés en routine clinique chez l'homme afin d'évaluer le flux sanguin des artères coronaires et du muscle cardiaque. Cet examen appelé « PET Myocardial Perfusion Stress Test » (PMPST) consiste en l'injection d'une molécule d'imagerie en deux étapes. En effet, cette évaluation sera réalisée au repos et après induction d'un stress cardiaque induit par l'injection d'un composé pharmaceutique (produit utilisé en routine clinique) qui reproduit les effets d'un effort physique ou de stress sur le cœur. Les images obtenues (en 2D et 3D) par cette technique différencient, grâce à une échelle de couleur, les zones saines perfusées (en rouge) qui captent le traceur radiomarqué des zones hypoperfusées pathologiques (en bleu) qui ne captent pas ou peu ce traceur. Cette technique permet donc par exemple de diagnostiquer les zones d'ischémie cardiaque après un infarctus, d'évaluer la fonction cardiaque ou d'évaluer les effets d'un traitement sur le cœur. C'est une technique fiable, précise et non invasive qui permet à un animal d'être suivi sur plusieurs jours et d'être son propre témoin.

Afin de respecter la règle des 3 R, nous utiliserons le nombre minimal d'animaux (6 par groupe + éventuellement 3 animaux supplémentaires pour remplacer une sortie d'étude précoce) pour pouvoir avoir des résultats significatifs. L'utilisation de l'imagerie TEP permet également de réduire le nombre d'animaux par groupe car le même animal peut être suivi longitudinalement. De plus, les animaux seront observés quotidiennement et les observations reportées sur une grille d'évaluation qui évaluera les signes éventuels de souffrance et les points limites et donc les actions à mener en fonction du score obtenu.

1277. La tuberculose est une maladie infectieuse provoquée par l'infection pulmonaire avec *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Malgré l'existence d'un vaccin (*M. bovis*-BCG) depuis 1921, cette maladie reste encore un problème majeur de santé publique avec 9 millions de morts en 2013 et 1/3 de la population mondiale chroniquement infecté. Le succès de Mtb à persister dans l'hôte après infection est le résultat de sa résistance aux antibiotiques et son évasion des mécanismes mis en place par le système immunitaire pour éliminer ce pathogène. Notre projet de recherche vise à mieux comprendre les mécanismes défaillants au cours de la réponse immunitaire antituberculeuse. Pour cela, nous utilisons un modèle murin préclinique de tuberculose, et différentes méthodologies (Cytométrie en flux, Microscopie confocale et biphotonique, protéomique et transcriptomique) qui, ensemble, nous permettront d'explorer la fonction de différents types cellulaires au cours de l'infection. En parallèle, nous étudierons la réponse immunitaire contre des composants purifiés de la paroi de Mtb, décrits comme étant des facteurs de virulence capable de moduler cette réponse, mais dont les mécanismes d'action restent encore peu connus. Notre objectif principal est d'identifier des potentielles cibles thérapeutiques pour renforcer le système immunitaire contre Mtb. Le recours aux modèles murins et plus précisément à 8151 animaux pour nos études suivras une démarche éthique stricte qui consiste à : 1. Utilisation d'une approche méthodologique qui élimine la majorité de la variabilité biologique et qui augmente notre sensibilité de détecter des différences entre les groupes expérimentaux (expériences répétées au moins 3 fois). Celle-ci combinée avec la quantification d'un nombre maximal de paramètres sur différents organes et l'utilisation de procédures non-invasives et longitudinales (ex. imagerie), permet de réduire le nombre total d'animaux utilisés dans notre projet. 2. Suivi quotidien des animaux (tous les jours) pour détecter précocement des altérations de l'état général des animaux et l'utilisation de l'anesthésie dans toutes nos procédures de façon à minimiser l'angoisse et la souffrance à chaque procédure. 3. Nous effectuerons les mises aux points nécessaires in vitro avant de procéder à des procédures chez l'animal et si nécessaire des mises au point in vivo sur des animaux excédentaires d'élevage de nos collègues n'ayant subi aucune autre procédures.

1278. La cryptosporidiose est une maladie zoonotique due au parasite protozoaire *Cryptosporidium parvum*. La contamination par ce parasite se fait par voie orale après ingestion d'aliments ou d'eau contaminée par le parasite. Ce parasite protozoaire se développe dans l'intestin de son hôte et provoque des diarrhées dont l'importance dépend du statut immunitaire de l'hôte. Ainsi, les jeunes ou les sujets immunodéficients sont très sensibles à cette maladie. Chez l'homme, cette maladie est très répandue dans les pays en voie de développement et dans les pays industrialisés, il arrive que ce parasite soit à l'origine d'épidémies notamment l'été lorsqu'il contamine les eaux des piscines. En santé vétérinaire, ce parasite est un réel

problème pour les éleveurs de jeunes ruminants puisqu'il est le premier agent responsable des diarrhées néonatales des veaux. Les infections des jeunes veaux ont un impact sur le coût de production mais également pour la contamination de l'environnement puisque les ruminants sont le réservoir principal de ce parasite. Le modèle souris est très utilisé pour les études fondamentales en immunologie mais également pour les essais de traitement. Les souriceaux développent l'infection et élimine naturellement le parasite en 3 semaines comme le font les jeunes ruminants. La souris adulte est relativement résistante à l'infection sauf si elle est déficiente pour des composants de la réponse immunitaire. Cette demande concerne l'utilisation du modèle expérimental murin de la cryptosporidiose (souriceaux nouveau-nés ou souris adultes, conventionnels ou génétiquement modifiés, flore conventionnelle ou altérée) pour des études en immunologie, ayant pour but l'identification des mécanismes immunitaires protecteurs. Les expériences sur les souriceaux sont les plus fréquentes (1 à 2 par mois selon l'expérience) alors que les études sur adultes sont plus ponctuelles. Cette demande sur 5 ans représente environ 3600 souriceaux (soit 720 par an), 720 mères gestantes (soit 144 par an), 780 souris adultes (soit 156 par an). Notre demande respecte le principe des 3R (Réduire, Raffiner et remplacer). Réduire et raffiner: Malgré l'enrichissement avec des feuilles de soplain pour que les mères y cachent leur progéniture, l'état de stress qui caractérise les souris C57BL/6 fait que certaines mères ne s'occupent pas de leur petit, c'est pourquoi plus d'animaux sont mis en reproduction. Du point de vue statistique, nous réalisons des analyses en modèles mixtes en utilisant 6 animaux par lots et en réalisant les expériences 3 fois. Les animaux surnuméraires sont toujours utilisés et peuvent être introduits dans un autre protocole. Remplacer : l'étude de l'immunologie mucoale dans un contexte infectieux ne peut être réalisée sans expérimentation animale. En effet, les études in vitro ne tiennent pas compte de la complexité des coopérations cellulaires.

1279. L'implication des gènes du développement est cruciale pour la formation du tissu osseux et ces gènes sont connus pour agir sur le modelage et le remodelage de l'os à la fois pendant la croissance et le vieillissement. Le facteur de transcription et homéogène Msx2 pourrait être impliqué à plusieurs niveaux dans la régulation de la formation osseuse chez la souris après la naissance. Il a été montré par exemple que l'expression de plusieurs gènes important pour l'activité des ostéoblastes (les cellules qui forment le tissu osseux) est régulée par Msx2. Notre étude consistera à déterminer le rôle spécifique de l'homéogène Msx2 dans l'ostéoblaste sur la formation osseuse in vivo. Nous avons déjà montré dans une étude antérieure que l'inactivation ubiquitaire du gène Msx2 chez la souris conduit à une diminution de la formation osseuse qui est la conséquence d'une diminution à la fois du nombre et de l'activité des ostéoblastes, et également à une augmentation de la dégradation du tissu osseux (résorption osseuse). Néanmoins, nous savons par ailleurs que Msx2 a une fonction dans d'autres organes tels que le rein, et la perte osseuse induite par l'inactivation ubiquitaire de Msx2 est donc difficile à interpréter. En effet l'homéostasie osseuse ne dépend pas que de l'activité de cellules du tissu osseux. Elle est par exemple régulée par un système hormonal complexe dépendant en partie des taux de calcium circulant, qui est lui-même finement régulé au niveau rénal. Des études utilisant des cultures cellulaires sont donc incapables de mimer cette complexité et nous devons recourir à un modèle animal pour ce projet. Nous utiliserons un modèle de souris dans lequel le gène Msx2 sera invalidé de façon spécifique dans l'ostéoblaste. Ce modèle unique nous permettra de montrer la fonction spécifique de l'homéogène Msx2 qui est exprimé dans l'ostéoblaste, et sa capacité à participer au contrôle de la masse osseuse chez la souris adulte. Les différents paramètres du tissu osseux (densité, microstructure...) seront évalués chez ces souris au cours du temps (souris jeune, adulte et au cours du vieillissement) en utilisant des approches classiques. Les souris seront hébergées par fratrie du sevrage à la mise à mort. Nous nous assurerons grâce à une observation hebdomadaire et en utilisant un traitement adapté, du bien-être de l'animal pendant toute l'étude. Nous utiliserons 252 souris maximum pour l'ensemble de cette étude qui s'étendra sur 3 ans. Une étude longitudinale du phénotype osseux utilisant une évaluation non invasive (densitométrie osseuse) sera réalisée sur un même groupe permettant ainsi de limiter le nombre d'animaux. Les autres analyses du phénotype osseux (histologie osseuse et analyses moléculaire et cellulaire) nécessitent la mise à mort de l'animal car le prélèvement de biopsies osseuses in vivo chez la souris serait dommageable pour l'animal et douloureux. Pour réaliser ces analyses, les souris utilisées pour le suivi longitudinal seront mises à mort à l'âge de 8 mois (groupe souris âgées) et des lots de souris supplémentaires seront produits pour l'analyse du phénotype osseux aux temps intermédiaires (groupes de souris jeunes de 6 semaines et groupe de souris adultes de 16 semaines). Nos données pourront apporter des informations importantes sur le rôle spécifique de Msx2 dans la formation et la résorption osseuse chez la souris dans les os longs et la participation de ce facteur au mécanisme de la perte osseuse liée au vieillissement.

1280. Les faisceaux d'ions qui seront utilisés dans ce protocole d'étude possèdent des propriétés physiques et biologiques qui leurs confèrent des avantages significatifs par rapport aux rayons conventionnels (rayons X) utilisés en clinique. Contrairement à ces rayons conventionnels dont le profil de dose délivrée aux tissus diminue progressivement avec la profondeur traversée, celui des ions est caractérisé par un dépôt de dose élevé en fin de parcours, alors que la dose déposée en amont, est beaucoup plus faible. Ainsi, la dose d'irradiation reçue par le patient et la morbidité sont moindres avec cette approche thérapeutique. Cette technologie permet aussi de déposer le maximum d'énergie au sein d'un volume cible circonscrit (la tumeur), tout en épargnant les tissus sains en amont et en aval. Grâce à ces propriétés, alliées à une faible diffusion latérale, la dose déposée dans les tissus peut être strictement confinée au volume cible avec une précision nettement plus grande qu'en radiothérapie conventionnelle. Notre étude consiste à étudier, dans un modèle tumoral induit par injection en sous cutané de cellules cancéreuses chez la souris NMRI immunodéficiente, les effets biologiques d'une irradiation proton sur la tumeur en imagerie. L'irradiation sera faite sur des tumeurs de 5 mm de diamètre. Le protocole d'irradiation sera mis au point de manière à protéger les souris au maximum et les irradiations seront administrées de manière ciblées (protocoles d'anesthésie, dose de rayonnement ciblée, dosimétrie). Les effets biologiques induits par l'irradiation seront évalués par une

étude longitudinale en imagerie TEP de 17 à 21 jours au cours de laquelle la souris recevra 5 doses d'un des 3 traceurs radiomarqués sélectionnés. Ces marqueurs ciblent le métabolisme cellulaire ([<sup>18</sup>F]-FDG), la prolifération cellulaire ([<sup>18</sup>F]-FLT) et l'apoptose ([<sup>18</sup>F]-ML10). Afin d'obtenir des données significatives du point de vue statistique, nous utiliserons des lots de 7 souris par condition, ce qui amènerait le nombre total d'animaux à 142. Un 4ème marqueur ciblant l'annexine sera utilisé selon le même protocole en imagerie  $\mu$ TEMP (28 souris). Au total, en incluant les souris de l'étude histologique et les animaux prévus pour les études de courbe de croissance tumorale et de biodistribution des traceurs, le nombre total d'animaux de cette étude est de 336. La règle des 3 R sera appliquée car l'utilisation de l'imagerie permet de suivre l'évolution de paramètres biologiques sur le même animal sur plusieurs jours, réduisant ainsi le nombre d'animaux. La douleur et la souffrance seront pris en compte par un suivi quotidien des animaux avec une grille de notation de la douleur et de la croissance tumorale qui déterminera les points limites (20% de perte de poids et volume tumoral de 200mm<sup>3</sup> par exemple) nécessitant une éventuelle mise à mort de la souris. En cas de douleur, des analgésiques seront utilisés pour y remédier. Cette étude ayant pour objectif de suivre les effets biologiques d'une irradiation proton sur la tumeur, celle-ci ne peut s'appliquer sur une étude *in vitro* car nous n'aurions pas l'implication du tissu environnant (vascularisation) sur les effets de cette irradiation.

1281. Nous avons récemment mis en évidence que l'habénula latérale possédait une activité oscillatoire synchronisée, au rythme  $\theta$ , avec celle de l'hippocampe dorsal, une structure clé dans les processus de mise en place d'une mémoire spatiale. Cette étude faisait suite à une étude plus ancienne qui avait permis de montrer des déficits de mémoire spatiale chez le Rat suite à une lésion de l'habénula. Si ces données suggèrent une implication de l'habénula latérale dans la mémoire spatiale, elles ne sont pas très précises en termes de dynamique de mise en place et de restitution de la mémoire spatiale. Cette connaissance est nécessaire si l'on veut bien comprendre comment s'établit une mémoire spatiale, c'est-à-dire comment les structures appartenant au système hippocampo-cortical, interagissent avec des structures sous corticales afin d'orienter la mise en place et la restitution d'une mémoire spatiale. Donc, ce projet, qui nécessitera 330 animaux (rats de souche Long-Evans) aura pour but de réaliser des inactivations réversibles à différentes étapes clés du test de la piscine de Morris, un test aquatique évaluant la mémoire spatiale de référence chez le rongeur. Les rats seront implantés avec des guides canules au-dessus de l'habénula latérale, ou de structures adjacentes, par chirurgie stéréotaxique. Ensuite, les instillations seront effectuées pendant le test de la piscine de Morris sur différents groupes de rats, aux différentes étapes mentionnées plus haut. D'autres tests seront effectués en complément de cette étude. Ils concerneront un test d'anxiété, le labyrinthe en croix surélevé, un test de coordination sensorimotrice, le test de la barre, une mesure d'activité locomotrice en cage d'élevage, et un test de mémoire de travail en boîte de conditionnement opérant, afin de rendre compte si les éventuels déficits de mémoire spatiale observés suite à l'inactivation de l'habénula latérales n'auront pas été la conséquence d'effets secondaires dus à l'inactivation, et ayant pu entraîner une hyperanxiété, des désordres sensorimoteurs, des désordres locomoteurs ou des déficits de mémoire de travail, respectivement. Enfin, des contrôles seront effectués en réalisant le test de la piscine de Morris sur des rats recevant les injections soit dans l'hippocampe dorsal, soit dans la région thalamique, soit dans le ventricule, afin de vérifier les éventuels effets de la diffusion dans ces structures adjacentes des composés injectés dans l'habénula latérale. Règle des 3R: Réduction: le nombre d'animaux par groupe est calculé au plus juste des pré-requis statistiques; Raffinement : le choix des tests a été guidé par leur validité dans le domaine et le choix de l'espèce - Rat - par son adaptation naturelle à réaliser les tests avec un minimum de stress; Remplacement: dans la mesure où il s'agit ici d'étudier l'impact d'activation de récepteurs spécifiques il n'est pas possible de recourir à d'autres modèles. Afin de réduire au minimum le niveau de souffrance et d'angoisse des animaux ces derniers seront habitués à la manipulation de manière répétée et progressive.

1282. L'infection par le gammaherpesvirus Epstein-Barr (EBV) est liée à l'apparition de cancers comme les lymphomes mais également d'autoimmunité. Ce virus infecte en particulier les lymphocytes B (LB). L'implication de l'autophagie, mécanisme intracellulaire de dégradation, est suspectée dans la réponse immune contre le virus EBV et pourrait donc être modulée afin de combattre l'infection et de limiter l'apparition des pathologies qui y sont associées. Aucune preuve *in vivo* à ce sujet n'a cependant été apportée. Nous nous proposons donc d'étudier un modèle d'infection murin par un virus proche d'EBV infectant la souris, le MHV68 (murine herpesvirus 68) pour définir l'impact de l'autophagie des cellules B sur la réponse anti-gammaherpesvirus *in vivo*. Nous nous focaliserons sur l'apparition de symptômes autoimmuns et sur l'apparition de cancers chez les souris infectées, en présence ou en absence d'autophagie dans les LB. Pour ce projet, nous envisageons d'utiliser un total de 53 animaux. Afin de réduire ce nombre au minimum requis une expérience pilote sur 5-6 animaux sera réalisée. Afin de raffiner au mieux notre méthodologie, nous utiliserons des points limites que sont les signes de douleurs persistants plus de 48h. Il est à noter que ces signes pourraient n'apparaître que dans le versant « cancer » de notre étude. Afin de remplacer le plus possible l'utilisation d'animaux, nous réalisons, quand cela est possible, un maximum de tests *in vitro* sur lignées cellulaires.

1283. La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après l'étude multicentrique STAR\*D, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement. En outre, les patients rétablis à la suite d'un premier épisode dépressif présentent un risque de récurrence dans les 6 mois évalué à 50% en cas d'arrêt du traitement et il a été montré qu'en l'absence de traitement 15% des patients

succombent à la suite d'un suicide et qu'entre 60% et 80% des suicides (entre 10000 et 15000 par an en France) sont le fait d'individus fortement dépressifs. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements et la compréhension des mécanismes physiopathogéniques et étiopathologiques sous-jacents. Certains de ces mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant l'utilisation de techniques d'immunohistochimie par exemple. Une restriction pour les recherches précliniques qui veulent étudier le mécanisme d'action des antidépresseurs (ADs) chez l'animal est qu'elles sont surtout réalisées chez des animaux normaux, qui ne sont pas dans un état « dépressif-like » (similaire à un état dépressif ou « depressed-like state »). Or les traitements aux antidépresseurs induisent très peu d'effets chez l'homme sain. Ces études ont été une première étape pour définir le spectre des actions possibles des ADs mais demeurent limitées pour déterminer les effets qui sont réellement nécessaires à l'action thérapeutique. C'est la raison pour laquelle nos travaux se basent sur l'utilisation du modèle du stress chronique léger imprédictible (SCI). Il s'agit d'un protocole initialement développé par Willner et al. (1987) que nous utilisons au laboratoire. De façon intéressante, il s'agit du seul modèle pour lequel il existe une signature moléculaire commune entre la dépression humaine et celle existant après stress chronique imprédictible chez la souris. Ce modèle de stress chronique imprédictible a également été validé pharmacologiquement, et semble le mieux adapté et le plus pertinent pour étudier la pathophysiologie de la dépression et le mécanisme d'action des ADs. Le but de cette expérience est d'évaluer, chez la souris, les effets d'un stress chronique sur l'expression de diverses protéines impliquées dans la dépression dans les régions du cerveau affectées chez les patients souffrant de dépression majeure. En outre, étant donné qu'il existe une grande variabilité de la réponse au stress, nous envisageons, au sein du lot stressé, de comparer les l'expression des protéines en question mRNA et microRNAs des souris les plus vulnérables à celui des souris les plus résilientes. Pour cette expérience, 36 souris sont requises. En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude: Raffinement : les stress appliqués aux animaux peuvent être qualifiés de léger à moyen, sans stress physique de type nociceptif. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu. Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chronique chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire in vitro n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés. Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=12 sujets par groupe pour les aspects comportementaux parmi lesquels 6 souris sont sélectionnées en fonction des résultats comportementaux pour l'expression des protéines) mRNAs). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

1284. La dépendance à la cocaïne, et aux drogues en général, est une pathologie chronique du cerveau qui se caractérise par une perte du contrôle de la consommation et une recherche extrêmement motivée du produit, pouvant même être réactivées longtemps après un arrêt de la consommation. Le développement de ce comportement non adapté provient de modifications à long terme du fonctionnement de neurones situés dans plusieurs régions cérébrales constituant collectivement un système fonctionnel impliqué dans les processus émotionnels et motivationnels. La plasticité de ce réseau est permise par la modification durable de l'expression de nombreux gènes. Les processus de régulation sont multiples et comprennent notamment les facteurs épigénétiques. Parmi eux, un nouveau type de régulation a été mis en lumière récemment dans le domaine du fonctionnement cérébral : l'interférence ARN, qui consiste par exemple en la destruction d'ARN messagers par d'autres ARN dits « interférents » (ARNi). Ces mécanismes sont déjà démontrés comme intervenant dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Or, il a été démontré que la cocaïne pouvait augmenter ou diminuer la quantité d'ARNi dans des régions cérébrales d'intérêt, et que certains participaient aux adaptations comportementales à la drogue. Contrairement à ces études parfois très invasives, notre projet est de nous intéresser à l'implication globale des ARNi dans les processus de dépendance (ou de résilience) à la cocaïne par une approche de neuropharmacologie comportementale basée sur le fait qu'il a été démontré très récemment que l'enoxacine, un antibiotique essentiellement utilisé dans le traitement des infections urinaires, augmente en réalité l'expression de nombreux ARNi et présente donc une activité d'interférence ARN, notamment dans le cerveau. Maîtrisant la technique d'auto-administration intraveineuse (AAiv) de cocaïne chez le rat, nous mesurerons l'impact de l'administration d'enoxacine sur le comportement de consommation et de recherche de cocaïne via divers protocoles. Cette étude sera réalisée chez le rat mâle jeune adulte. Le nombre d'animaux par condition pharmacologique sera de 12 en tenant compte de pertes éventuelles liées à la chirurgie, à la non-conformité de certains animaux vis-à-vis des critères comportementaux, et en considérant la variabilité interindividuelle. Au total, nous estimons devoir utiliser, pour cette étude, un maximum de 180 animaux. Concernant la règle des 3R, nous apportons les précisions suivantes : (i) REMPLACEMENT. Dans le domaine de la dépendance aux drogues, pathologie éminemment complexe nécessitant l'intégrité du cerveau en fonctionnement normal, il est impossible de s'affranchir de l'utilisation d'animaux vivants. (ii) RAFFINEMENT. Il est important de noter que la chirurgie nécessaire à ce type d'expériences est plutôt légère et n'induit pas, sauf cas exceptionnel, de souffrance détectable chez le rat. Par la suite, toutes les administrations de produits se font sans piqûre, par le biais du cathéter intraveineux, ce qui réduit considérablement stress et/ou douleur. Un suivi sanitaire méticuleux est néanmoins assuré, veillant au bien-être de l'animal. Par ailleurs, la chronicité des expériences, inévitable dans la modélisation d'une pathologie au développement lent mais tenace, est réduite au maximum dans le sens où les expériences sont arrêtées dès qu'une modification significative du comportement est apportée par l'intervention pharmacologique. Si aucun effet n'est observé après 15 jours d'AA quotidienne, l'expérience est interrompue. (iii) REDUCTION. Nous avons réduit au maximum le nombre de rats nécessaires aux analyses statistiques en tenant compte (notamment) de la variabilité inter-individuelle dans le

comportement (12 rats/conditions pharmacologiques) et dans la biologie moléculaire (6 rats/conditions pharmacologique pour les groupes contrôle non soumis au comportement).

1285. La Peste Porcine Africaine (PPA) est une des maladies les plus graves chez le porc ou le sanglier, avec une mortalité pouvant atteindre 100% dans les cheptels infectés. Elle est causée par un virus à ADN, de la famille des Asfarviridae et du genre Asfivirus. Aucun vaccin ou antiviral n'est actuellement disponible pour lutter contre cette maladie. En Afrique de l'Est et Australe, la PPA est établie du fait, entre autre, de son portage naturel par des organismes réservoirs et/ou vecteurs tels que les suidés sauvages (phacochères et potamochères) et les tiques molles appartenant au complexe d'espèces *Ornithodoros*. Dans le reste du monde, la maladie apparaît généralement par « flambées ». Éradiquée en Europe dans les années 90, à l'exception de la Sardaigne, elle a été de nouveau introduite en 2007 en Géorgie et a diffusé vers l'Ouest, pour atteindre, début 2014 les états membres situés à la frontière de l'Union européenne (Pologne, Lituanie, Lettonie, Estonie). L'homologie des souches virales d'Iran et du Caucase avec celles de Zambie, du Mozambique et de Madagascar confirme la possibilité de nouvelles interactions virus-tiques avec des conséquences encore inconnues sur les dynamiques épidémiologiques locales. La capacité des tiques *O. erraticus* à multiplier le virus Géorgien une fois inoculées a été démontrée. Parce que le risque de persistance en élevage de la PPA repose en partie sur la capacité du virus à s'installer, à se maintenir dans des populations locales de tiques et à transmettre le virus aux porcs ou sangliers, il est essentiel de mieux connaître les facteurs qui régissent ces interactions virus-tiques-porcs. L'objectif de cette expérimentation est d'évaluer la capacité de tiques *O. erraticus*, infectées expérimentalement en laboratoire, à transmettre le virus au porc via une morsure naturelle. Dix-huit porcs répartis en quatre groupes seront utilisés. Le porc étant l'espèce cible pour la maladie, l'utilisation de ces animaux est donc indispensable. Pour six porcs, les tiques infectées seront apposées sur une oreille de chaque porc pendant 60 minutes, temps nécessaire et suffisant pour transmettre le virus à l'occasion d'un repas de sang. Les réponses des porcs aux piqûres de tiques seront appréciées pendant les 3 semaines qui suivront les morsures (mesures de paramètres zootechniques, virologiques, sérologiques, immunologiques et lésionnels). Ces réponses seront comparées à celles de 6 porcs infectés par voie intradermique avec une dose connue de virus (102 HAD50) et de 3 porcs piqués par des tiques *O. erraticus* non infectées par le virus. Trois porcs non piqués par des tiques et non infectés seront également suivis afin de disposer de valeurs de référence pour l'appréciation de l'impact de l'infection et/ou de la piqûre de tique sur les performances zootechniques. A la fin de la procédure, les animaux seront euthanasiés et autopsiés. Les expérimentations seront conduites dans le respect de l'éthique et du bien-être des animaux. En particulier, le nombre de porcs utilisés sera le plus faible possible tout en permettant l'obtention de résultats statistiquement robustes.

1286. Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche destiné à identifier des nouvelles molécules permettant de traiter les maladies auto-immunes (sclérose en plaque, psoriasis, arthrite rhumatoïde, et inflammations chroniques intestinales)

Ce projet de recherche aura recours à l'utilisation d'animaux vivants et s'adressera plus particulièrement aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin grêle et du gros intestin (Inflammatory Bowel Diseases : IBD).

Elles se traduisent par des signes cliniques alternant des phases symptomatiques aiguës et des phases de rémissions. L'étiologie de ces pathologies prend sa source dans une anomalie de réponses d'immunité innées et adaptatives. Les deux formes les plus répandues sont la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Ce sont des pathologies dans lesquelles la réaction immunitaire de la muqueuse intestinale est inopportune et excessive vis à vis de la flore intestinale. La prévalence en France est de 1 sur 1000, 5 à 10 cas sont diagnostiqués pour 100 000 individus par an. Ces pathologies sont actuellement prises en charge par des thérapies dont les effets secondaires sont importants (apparition de tumeurs ou phénomènes de tolérance) chez certains patients traités. Par exemple, l'utilisation des biothérapies longues de type anti-TNF- $\alpha$  devenait inefficace après un an sur la moitié des patients et que 20 % ne répondaient pas du tout. Actuellement, plusieurs voies de recherche et de développement sont en cours chez Genfit pour améliorer les traitements de ces maladies. Notre approche vise à développer des candidats médicament permettant de réduire ou d'annihiler les processus immunitaires et inflammatoires à l'origine de ces désordres. Donc, afin d'étudier et d'étayer nos hypothèses lors du développement de nos molécules, il nous sera inévitable d'avoir recours à des modèles animaux présentant une pathologie similaire à celle qui se produit chez l'Homme, des modèles alternatifs n'étant pas disponibles actuellement. Il existe plusieurs méthodes pour induire expérimentalement une inflammation intestinale chez l'animal de laboratoire. Selon le procédé utilisé, on "emprunte" préférentiellement une voie de signalisation plutôt qu'une autre. Au cours de ce projet nous reproduirons par le stimulus employé, les symptômes plutôt assimilés à ceux de la rectocolite hémorragique. Le processus complexe de protection via l'immunomodulation requiert le recours à l'animal. Nous choisissons de focaliser l'essentiel de nos travaux pendant la phase précoce et d'utiliser un modèle permettant de développer notre stratégie d'immuno-modulation qui retardera les effets délétères bien avant que les animaux n'entrent dans une phase sévère de la maladie. Seules les meilleures molécules seront évaluées sur un nombre restreint d'animaux en phase plus sévère. Cette stratégie nous permet de définir préalablement des points limites éthiquement et scientifiquement acceptables, en tenant compte des objectifs de l'étude. Ce projet engagera des souris et des rats et dans un nombre estimé à xxx individus pour la durée que couvrira ce projet. Le nombre d'animaux utilisé dans chaque lot de chaque procédure est réduit, il correspond au seuil minimal qui puisse nous permettre d'apprécier avec nos moyens techniques et en fonction de la variabilité inter-individus les effets désirés. A terme nos travaux pourraient ouvrir de nouvelles voies de traitement de certaines formes de maladies auto-immunes, aujourd'hui ce besoin médical est clairement établi. L'effet anti-tumoral de cette approche d'immunothérapie cellulaire, appelé effet GVL est le plus souvent associé au développement d'une réponse T cytotoxique dirigée contre les tissus sains du receveur. Cette réaction est appelée

maladie du greffon contre l'hôte (GVH) et est responsable de lésions cutanées et digestives qui peuvent se compliquer d'une morbidité et mortalité élevées. Ces lésions, notamment les lésions cutanées de GVH n'engendrent pas de façon systématique de la douleur chez l'animal, elles sont plus le reflet d'un conflit immunologique. L'objectif des projets de recherche dans le domaine de la greffe de CSH allogénique est de déterminer des stratégies qui pourraient permettre de séparer les effets GVH et GVL. Nombreux travaux de recherche ont considéré l'immunomodulation de la GVH par la thérapie cellulaire. Certaines voies de recherche ont montré des résultats prometteurs sur l'immunomodulation de la GVH, mais aucune n'a à l'heure actuelle permis de séparer l'effet GVH de GVL. Nos travaux de recherche sont axés sur la détermination de nouvelles approches d'immunomodulation permettant de contrôler l'effet GVH sans impacter sur la GVL ni la prise de greffe. Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 300 souris femelles NOD/ShiLtSz-scid/IL2Rnull(NSG) 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 la GVHD aiguë. Il n'est pas possible de créer in vitro la complexité du système immunitaire 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 inter-groupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'arrêt précoce des expériences en cas de pic aigu de GVHD est réalisé. Un score est établi pour chaque souris au cours du temps, selon la méthode décrite ci dessous: posture, perte de poids, activité, intégrité de la peau, fourrure. Lorsqu'une souris présente un score total supérieur ou égal au score autorisé, l'expérience est arrêtée.

1288. Le but de la radiobiologie est de permettre l'amélioration de l'efficacité des radiations ionisantes (RI) sur les tumeurs (en diminuant la radiorésistance), et de minimiser les effets secondaires sur les tissus sains traversés par les RI. La vascularisation tumorale et l'angiogenèse jouent un rôle essentiel dans la survie et la croissance de la masse tumorale et le développement des métastases. Le ciblage de la vascularisation tumorale fait à l'heure actuelle partie d'axes majeurs de recherche et de développement de nouvelles stratégies antitumorales. Les liens entre angiogenèse/vascularisation tumorale et irradiation sont complexes. L'irradiation pourrait favoriser l'angiogenèse alors qu'une mauvaise vascularisation tumorale crée des zones hypoxiques résistantes à l'irradiation. De nombreux agents antiangiogéniques sont développés, chacun ayant leur spécificité et leur mode d'action. Pour un grand nombre de molécules, il a été montré que contrairement à ceux que l'on prévoyait, la vascularisation tumorale était meilleure suite à un traitement par l'antiangiogénique, ce qui permettait d'avoir des tumeurs mieux oxygénées et donc une meilleure efficacité des radiations ionisantes sur ces tumeurs. L'objectif de ce projet est de vérifier l'efficacité anti tumorale in vivo de la combinaison d'une nouvelle molécule antiangiogénique avec l'irradiation. Ce nouvel inhibiteur combine des effets sur différents récepteurs cellulaires impliqués dans l'angiogenèse et pourrait s'avérer être plus efficace que les molécules déjà testées. L'élaboration de nouvelles stratégies de traitement combinant les radiations ionisantes à des molécules ciblées représente une approche prometteuse afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique de la radiothérapie. Pour mener à bien ce projet et avoir une idée précise du potentiel en thérapeutique humaine de ce nouveau produit, cent huit souris seront nécessaires à son évaluation. Cette estimation se base sur des analyses statistiques qui permettent de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans cette étude.

1289. Le projet s'inscrit dans le cadre de l'amélioration technique et conceptuelle de thérapies cellulaires pour le traitement de maladies neurodégénératives, notamment la maladie de Parkinson (MP), et pour lesquelles subsistent des obstacles d'ordre neurologique, éthique et logistique. L'objectif de ce projet est d'évaluer le bénéfice d'une greffe de neurones dopaminergiques au sein de la substance noire (SN) en comparaison avec une greffe au niveau du striatum (ST), SN et ST étant les 2 régions cibles dans la MP. Ainsi, dans un modèle expérimental animal de souris lésées avec de la 6-OHDA, nous allons étudier le devenir des neurones transplantés au cours du temps, sur le plan neuroanatomique et fonctionnel en particulier par de l'imagerie cérébrale in vivo. Ce projet a un intérêt dans le domaine de la recherche fondamentale puisque nous espérons démontrer que le cerveau adulte est permissif à la repousse de neurones transplantés d'une manière spécifique et à grande distance avec une amplitude non soupçonnée auparavant. Sur le plan de la santé publique, notre projet ouvre la possibilité de réparation de structures lésées et le rétablissement d'une connectivité entre neurones. Ce type d'étude, en clinique, n'est pas envisageable dû à la greffe de neurones, à l'injection de radiotracteur et à la nécessité d'avoir des témoins pour exploiter les données (remplacement). Cette étude portera sur 30 animaux au total, les animaux seront hébergés avec présence d'un enrichissement (raffinement). L'utilisation de l'imagerie scintigraphique permet de réduire le nombre d'animaux utilisé car permet la réalisation d'études longitudinales et chaque animal est son propre contrôle (réduction). Des études préliminaires indiquent que des petits effectifs (n= 5 pour le groupe témoin et =7 à 9 pour les groupes avec chirurgie) sont nécessaires et suffisants en imagerie pour dégager des effets significatifs au seuil de p<0,05 compte tenu de la variabilité inter-individuelle des animaux et de l'expérience. Des statistiques de type one-way ANOVA suivi de post-hoc test seront réalisées sur les données d'imagerie.

1290. Le projet Fr-AgEncode fait partie d'un effort international pour identifier les éléments fonctionnels des génomes d'animaux d'élevage afin de pouvoir associer génotype et phénotype et d'exploiter au mieux la variabilité génétique. Ce projet s'inspire du projet 'Encode' conduit sur le génome humain. L'objectif est d'étendre la connaissance des génomes d'espèces situées à diverses distances évolutives (porc, poule, chèvre et bovin) par le biais d'analyses moléculaires. Le nombre d'animaux est restreint à 2 animaux mâles par espèce, sur lesquels des cellules sanguines seront prélevées pour

être analysées immédiatement puis ultérieurement. Chez le porc mâle, une comparaison entre le stade jeune et le stade adulte est prévue. Des expériences de séquençage d'ARNs et, pour la première fois chez les animaux d'élevage, de caractérisation de la structure de la chromatine seront réalisées. Plusieurs centaines de millions de cellules sanguines sont nécessaires pour obtenir une quantité suffisante de cellules immunitaires (quelques dizaines de millions), après séparation au trieur cellulaire. Chez le porc en croissance, ce nombre de cellules ne peut être obtenu que par la répétition de prises de sang du vivant de l'animal, chacune d'un volume assez limité pour respecter le bien-être animal. C'est pourquoi il est demandé de pouvoir réaliser 6 prélèvements de sang sur un rythme mensuel sur 6 porcelets mâles, dont 2 seront finalement retenus pour les analyses finales. En effet, Afin de sécuriser le projet et dans l'objectif d'obtenir 2 porcs mâles pubères, nous sélectionnerons 6 porcelets mâles au sevrage. Le projet consiste donc à collecter et conserver des cellules sanguines au cours de la croissance de porcelets mâles jusqu'à leur puberté. Dès l'âge d'un mois, puis tous les mois un prélèvement de sang à la veine jugulaire sera réalisé, soit 6 prélèvements totaux. On estime à 65ml /kg ; le volume sanguin moyen chez le porc. Pour un porcelet de 26 jours pesant en moyenne 8 kgs, le volume sanguin est de 455 ml. Un prélèvement de 10 ml ne représente que 2% du volume sanguin de l'animal, ce qui est bien inférieur aux préconisations éthiques. Par la suite, le volume augmente un peu mais moins que le poids (20 ml à 50kg et 30 ml à 100kg). Une période de récupération d'un mois entre chaque prélèvement sera respectée. La règle des 3 Rs a été prise en compte, il n'est pas possible de remplacer, nous souhaitons obtenir des cellules sanguines au cours de la croissance des porcelets. Afin de réduire les prélèvements, dès que les 2 premiers porcs pubères seront obtenus, plus aucun prélèvement ne sera effectué. Afin de raffiner les conditions d'élevage, leur litière sera constituée d'une couche épaisse de paille, de 15-20 cm environ, renouvelée toutes les semaines. Ce substrat permet une activité de fouille et de comportement exploratoire.

1291. Le projet Fr-AgEncode fait partie d'un effort international pour identifier les éléments fonctionnels des génomes d'animaux d'élevage afin de pouvoir associer génotype et phénotype et d'exploiter au mieux la variabilité génétique. Ce projet s'inspire du projet 'Encode' conduit sur le génome humain. L'objectif est d'étendre la connaissance des génomes d'espèces situées à diverses distances évolutives (porc, poule, chèvre et bovin) par le biais d'analyses moléculaires. Le nombre d'animaux est restreint à 2 femelles par espèce, sur lesquelles des cellules sanguines seront prélevées pour être analysées immédiatement puis ultérieurement. Des expériences de séquençage d'ARNs et, pour la première fois chez les animaux d'élevage, de caractérisation de la structure de la chromatine seront réalisées. Plusieurs centaines de millions de cellules sanguines sont nécessaires pour obtenir une quantité suffisante de cellules immunitaires (quelques dizaines de millions), après séparation au trieur cellulaire.

Chez le porc, ce nombre de cellules ne peut être obtenu que par la répétition de prises de sang du vivant de l'animal, chacune d'un volume assez limité pour respecter le bien-être animal. C'est pourquoi il est demandé de pouvoir réaliser 5 prélèvements de sang sur un rythme mensuel sur 3 truies reproductrices, pendant un cycle de reproduction complet, 2 truies seront finalement retenues pour les analyses finales. Le projet consiste donc à collecter et conserver des cellules sanguines au cours de la gestation et l'allaitement de 3 truies reproductrices, soit 5 prélèvements totaux par femelle. On estime à 65ml /kg ; le volume sanguin moyen chez le porc, une truie pèse en moyenne 200 kgs, le volume sanguin est de 13 litres, des prélèvements de 20 à 30ml sont donc très inférieurs aux préconisations éthiques.

Une période de récupération d'un mois entre chaque prélèvement sera respectée. Afin de sécuriser le projet et dans l'objectif d'obtenir le sang de 2 truies sur toute la période de gestation et d'allaitement, nous sélectionnerons 3 femelles.

La règle des 3 Rs a été prise en compte, il n'est pas possible de remplacer, nous souhaitons obtenir des cellules sanguines au cours de la gestation et de l'allaitement. Afin de réduire les prélèvements, si une femelle ne s'avérait pas gestante après insémination, elle serait retirée de l'étude, plus aucun prélèvement ne serait effectué sur celle-ci. Afin de raffiner les conditions d'élevage, des jeux (tuyaux et chaînes) seront mis à disposition afin de stimuler leur comportement exploratoire.

1292. Le conditionnement ischémique à distance « Remote Ischemic Conditioning : RIC » est une stratégie de cardioprotection contre l'infarctus du myocarde. Il s'agit d'une application de brèves séquences d'ischémie-reperfusion au niveau d'un organe à distance du cœur avant une ischémie cardiaque. Le conditionnement ischémique à distance semble impliquer la libération au niveau plasmatique de très petites molécules ou métabolites non identifiées capables de protéger le myocarde contre l'infarctus. Dans notre laboratoire, afin d'identifier ces molécules, une approche de métabolomique consistant à détecter les plus petits métabolites circulants au niveau plasmatique, nous a récemment permis d'identifier plusieurs molécules mises en circulation suite à un RIC appliqué aussi bien chez le rat que chez l'homme (résultats non publiés).

Dans le cadre de ce projet de thèse, l'idée serait de réinjecter ces molécules identifiées au sein du laboratoire EA3860 à des rats (*Rattus Norvegicus*) et de regarder si cela reproduira l'effet cardioprotecteur du RIC en quantifiant la taille d'infarctus chez ces rats. Ensuite, une analyse des voies de signalisation intracellulaires serait nécessaire pour expliquer par quels mécanismes passe l'effet cardioprotecteur du RIC.

Nous utiliserons entre 26 à 30 animaux par groupe (soit 13 groupes, le pourcentage de perte lié à la procédure compris), soit au total 382 rats pour répondre aux objectifs de ce projet. Le nombre d'animaux utilisé pour cette étude est justifié par la variabilité importante induite par la modélisation de l'infarctus du myocarde chez le rat. Un nombre suffisant d'animaux est donc requis. Seules les expériences indispensables seront réalisées. Il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience. La procédure chirurgicale sera réalisée sous anesthésie générale au pentobarbital (pentobarbital 80mg/kg) complétée par une analgésie au Temgesic (Buprénorphine 0.1mg/kg). Une analyse statistique des résultats sera réalisée (Analyse de variance ANOVA suivie d'un test posthoc (test de comparaison multiples): Test de Différence Significative Minimale entre les variances

des différents groupes pour déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes) limitant ainsi le risque de résultats finalement non discriminants. Le développement des thérapies destinées à l'homme passe impérativement par une étape d'expérimentation animale in-vivo après les études in-vitro et ex-vivo. En effet, le rat est un modèle pertinent pour la modélisation de l'infarctus du myocarde, il n'existe aucune autre méthode alternative. L'étude sur un modèle « intégré » approchant au mieux toute complexité de la maladie chez l'homme est à même de valider l'efficacité de celle-ci avant de la tester chez l'homme. Cette étape in-vivo est donc irremplaçable.

1293. Le cancer de la prostate (PCa) est le problème majeur de santé pour les hommes (deuxième cancer le plus mortel dans le monde). La radiothérapie fait partie du traitement de référence pour les tumeurs localisées à la prostate. Bien que la plupart des tumeurs répondent à la radiothérapie, certaines sont résistantes et la radiothérapie ne permet pas toujours d'éradiquer entièrement la tumeur. Par conséquent, il existe un risque de rechute accompagnée souvent de métastases. Il est donc important de sensibiliser les tumeurs à la radiothérapie.

Dans le cadre de ce projet, des nanoparticules, (c'est-à-dire des objets présentant un diamètre compris entre 1 et 100 nm) inertes, d'une taille de 50 nm sont testées. Lors de leur exposition aux rayonnements ionisants (c'est-à-dire des rayonnements électromagnétiques, comme les rayons X, capables d'émettre une quantité d'énergie suffisante pour enlever ou ajouter une charge à un atome qui n'est donc plus neutre électriquement et devient un ion), elles s'activent et déposent une quantité très importante d'énergie à l'intérieur des cellules tumorales, provoquant la formation de radicaux libres détruisant les cellules cancéreuses. Ces nanoparticules permettent donc d'amplifier la dose de rayonnements ionisants au sein même de la tumeur. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet antitumoral de nanoparticules (NPs) activées par les rayonnements ionisants, par comparaison avec la radiothérapie seule, en termes de retard de croissance tumorale et de survie, associés à une très bonne tolérance chez des souris xénotransplantées avec des cellules de PCa. Pour cela, 3 lignées cellulaires humaines de cancer de la prostate seront xénotransplantées à des souris nude par voie sous-cutanée. Les nanoparticules étant radio-opaques, certaines souris porteuses d'une tumeur seront utilisées pour évaluer la dispersion des NPs dans la tumeur après injection intratumorale par imagerie par tomographie par rayon X.

Puis, de nouveaux groupes de souris seront xénotransplantés (selon les conditions préalablement déterminées) afin d'évaluer l'efficacité des NPs activées par des rayonnements ionisants. Les NPs sont administrées par injection intratumorale. Plusieurs doses seront testées en fonction de la radiorésistance ou radiosensibilité de la lignée cellulaire, préalablement estimée in vitro. Ces doses de rayonnements ionisants devront mettre en évidence un bénéfice du traitement par les nanoparticules, en termes de régression tumorale et/ou de survie par rapport à la radiothérapie seule. 24 heures après injection IT des nanoparticules, la dose de rayonnements ionisants sera délivrée localement en fraction sur la tumeur afin de se mettre dans les conditions utilisées en clinique. Bien que les données in vitro fournissent des informations importantes sur la performance des NPs activées par la radiothérapie, la démonstration de l'efficacité antitumorale constitue le seul moyen d'obtenir les données nécessaires pour la démonstration préclinique de l'efficacité du traitement. L'expérimentation animale n'ayant pu être évitée, les modèles cellulaires ont été choisis avec soin. Pour ce projet 490 souris au maximum, sur 2 ans, pourront être nécessaires afin de répondre aux objectifs cités précédemment. En cas de contrainte pour les animaux, l'inconfort, la douleur ou l'anxiété subis, seront pris en compte afin de les réduire ou de les supprimer par des analgésiques (ex. buprénorphine en sous-cutanée, 0,1mg/kg toutes les 12 heures pendant 5 jours). D'autre part, des points limites stricts ont été définis et seront appliqués. Les résultats de ce projet permettront d'appréhender l'efficacité des nanoparticules activées par la radiothérapie dans des modèles de PCa, afin de préparer de futurs essais cliniques.

1294. La leucémie aigüe est un cancer des cellules du sang, caractérisée par l'impossibilité de former des cellules sanguines matures. Ces leucémies sont composées, entre autres, de cellules souches leucémiques qui sont résistantes au traitement par chimiothérapie et sont responsables chez l'homme du taux de rechute important (50%). La compréhension des mécanismes contrôlant ces cellules est donc primordiale pour le développement de nouvelles thérapeutiques plus efficaces. Les cellules souches leucémiques sont en étroite interaction avec les autres cellules de la moelle osseuse, notamment des cellules stromales mésenchymateuses. L'objectif de notre projet est de mieux comprendre le rôle de ces cellules stromales mésenchymateuses médullaires dans le développement leucémique. Concernant les règles de remplacement/réduction/raffinement, le développement leucémique ne pouvant être modélisé in vitro et les cellules souches leucémiques n'étant identifiables que sur des critères fonctionnels (agressivité), et non morphologiques, ce projet nécessite l'utilisation de modèles animaux.

Le modèle murin est bien décrit dans le domaine de l'hématopoïèse leucémique. La greffe de cellules leucémiques humaines dans des modèles immunodéficients ou de cellules leucémiques murines dans un modèle autologue sont bien documentées dans la littérature. Ceci évite l'utilisation d'un nombre important d'animaux dans des expériences de mise au point. Nous disposons également d'outils d'analyse permettant un suivi longitudinal de la leucémie pour chaque souris, nous permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux requis.

L'ensemble des animaux seront sacrifiés au cours ou au terme de l'expérimentation, pour raisons sanitaires dès l'apparition des premiers signes cliniques de développement leucémique, et/ou pour analyser la présence d'une leucémie résiduelle dans des organes non prélevables sur animaux vigiles (rate et moelle osseuse), respectivement. Les douleurs potentiellement induites par les injections cellulaires seront prises en charge par l'administration d'un analgésique, la buprénorphine, lors de l'injection, et la mise sous paracétamol si l'animal présente des signes de souffrance dans les jours qui suivent les injections.



Ce modèle est adapté à notre projet qui nécessitera l'utilisation de 24 souris immunodéficientes NSG (souche génétiquement altérée ; partie cellules leucémiques humaines) et de 24 souris C57BL-6J (souche sauvage non altérée génétiquement ; partie cellules leucémiques murines), soit un total de 48 souris.

Ces travaux doivent nous permettre de mieux comprendre la physiopathologie des leucémies et pourraient permettre l'ouverture de pistes thérapeutiques originales dans les leucémies aiguës en ciblant les interactions entre les constituants des niches et les cellules souches cancéreuses pour les sensibiliser aux chimiothérapies.

1295. Les coccidioses représentent le premier fléau parasitaire de l'aviculture conduisant à d'importantes pertes économiques de plus de 1,5 milliards d'euros dans le monde et par an. Ces maladies infectieuses sont provoquées par la multiplication de parasites protozoaires du genre *Eimeria*. Une fois ingérés, ces parasites envahissent les cellules intestinales et se multiplient massivement avant d'être excrétés sous forme d'oocystes. Les oocystes sont pourvus d'une coque résistante aux agents chimiques, rendant difficile leur éradication.

Les pertes de production observées dans les élevages avicoles sont principalement dues à une morbidité qui se traduit par une malabsorption, une faible croissance et une mauvaise efficacité alimentaire chez le poulet de chair. En fonction de l'espèce parasitaire et du degré de l'infection, il peut également être observé des diarrhées hémorragiques pouvant entraîner la mort de l'animal.

Face à ce fléau, le moyen de lutte principal consiste à administrer des anticoccidiens dans l'aliment des animaux pendant toute la durée de l'élevage (à l'exception de la période de retrait légale avant l'abattage). Les anticoccidiens ne sont pas des médicaments et sont soumis à la législation européenne des additifs alimentaires (directive 1831/2003 du 22/09/2003 abrogeant la directive 70/254/CEE du 23/09/1970). Ils ont un effet coccidiostatique : ils limitent la multiplication du parasite mais ne permettent pas de l'éliminer complètement des intestins de l'animal. Cependant, suite à leur utilisation depuis plus de 50 ans, des souches de coccidies résistantes sont apparues dans les élevages, rendant les traitements inefficaces et se traduisant par des coccidioses persistantes.

Actuellement, onze produits sont autorisés dans les élevages de poulets de chair. Une utilisation raisonnée de ces anticoccidiens permet de retarder l'apparition de résistances qui constituent la principale limite à leur utilisation. Par conséquent, ils sont souvent utilisés en combinaison ou dans des programmes permettant d'alterner les produits d'un cycle de production à l'autre.

Pour optimiser ces procédés et aider l'industriel à choisir de façon raisonnée des programmes anticoccidiens optimaux, nous testons la sensibilité des souches isolées à partir des élevages vis-à-vis de différents anticoccidiens. Ce test appelé anticoccidiogrammes ou AST (« anticoccidial sensitivity test »), est à l'heure actuelle, le seul outil permettant d'évaluer le degré de résistance des parasites vis-à-vis des anticoccidiens. Un AST consiste à induire expérimentalement la maladie à partir des souches parasitaires isolées dans les élevages et tester l'efficacité de différents anticoccidiens en mesurant différents paramètres.

Le degré de pathogénicité est dépendant des souches isolées des élevages. *E. acervulina* est présente dans tous les élevages et est principalement responsable d'une diminution du gain de poids. *E. maxima* et *E. tenella* peuvent également être retrouvées mais de manière moins fréquente. Chaque inoculum fait l'objet d'une attention particulière pour administrer des doses bien définies et adaptées en fonction des espèces présentes et ainsi éviter une pathogénicité trop importante. Après inoculation de l'agent infectieux, une visite quotidienne est réalisée dans la salle expérimentale afin de surveiller l'éventuelle apparition des premiers symptômes liés à la maladie : plumes ébouriffées, prostration.

Les essais sont réalisés selon un protocole bien défini permettant d'exploiter au maximum chaque étude (gain de poids, excrétion parasitaire dans les feces, consommation d'aliment...). Ces paramètres sont analysés à l'aide d'outils statistiques permettant une analyse fiable à partir de lots constitués de 18 poulets. Les essais sont réalisés par paire (2 isolats d'élevages sont testés en même temps) afin de réduire le nombre d'animaux en constituant un lot témoin commun aux 2 tests (le lot "témoin non inoculé"). Pour le raffinement des conditions d'hébergement, des pièces métalliques sont suspendues à l'intérieur des cages

Ce projet sur 5 ans permettra d'évaluer le degré de résistance des parasites présents dans de nombreux élevages (issus de différents pays). Le nombre de tests réalisés dépend des besoins des éleveurs. Un essai (avec 2 isolats de terrain) nécessite 396 poulets pour tester 6 à 7 anticoccidiens par isolat. En considérant 7 tests par an, jusqu'à 70 isolats de terrains peuvent être testés sur 5 ans, soit au maximum 13860 animaux.

1296. cellules impliquées dans de nombreux processus biologiques, comme 1) le CD9 et le CD81 dans la fusion des gamètes, c'est-à-dire l'ovocyte et le spermatozoïde,) qui dans le processus de reproduction permet le mélange des matériels génétiques issus de la mère et du père et le développement de l'embryon puis de l'organisme, 2) l'infection hépatique par *Plasmodium*, l'agent du paludisme (CD81), 3) le processus invasif tumoral et métastatique (Co029, CD9, CD151). La fonction de la plupart des tétraspanines à l'échelle de l'organisme est mal connue. Une des approches les plus fructueuses pour faire avancer la connaissance dans ce domaine est l'établissement de lignées de souris mutantes. Par l'approche dite d'invalidation génique chez la souris, technique par laquelle on bloque complètement l'expression d'un gène, il a été montré que la tétraspanine CD9 était nécessaire à la fusion des gamètes. De même l'expression de la tétraspanine CD81 est requise pour l'infection hépatique par *Plasmodium*, ce qui a été mis en évidence grâce aux études sur les souris invalidées pour CD81. D'autres exemples issus de divers laboratoires ont apporté des contributions importantes pour la connaissance de la biologie des tétraspanines par l'utilisation des modèles murins. Pendant longtemps, le CD9 a été la seule molécule de la membrane de l'ovocyte connue pour

être nécessaire à la fusion des gamètes. Plus récemment une autre molécule appelée Juno qui est le récepteur de la molécule Izumo du spermatozoïde s'est avérée être également nécessaire à la fusion des gamètes.

Le couple moléculaire Juno-Izumo semble intervenir dans l'adhérence mais n'est pas suffisant pour produire la fusion. L'hypothèse est formulée du rôle de CD9, et peut-être également de CD81, comme des organisateurs moléculaires à la surface des gamètes qui feraient progresser le processus d'adhérence entre les gamètes vers la fusion de leurs membranes. Pour analyser ce processus il est nécessaire de disposer d'ovocytes de souris sauvages ou déficientes en CD9 et/ou CD81 et de suivre les mouvements moléculaires des autres molécules dans ce contexte.

Une bonne compréhension des mécanismes de la fusion des gamètes est nécessaire pour envisager d'améliorer les thérapies de la stérilité et de développer des méthodes contraceptives moins toxiques. Il s'agit donc d'une approche in-vivo/in-vitro dans la mesure où il n'est pas encore possible de produire en culture des ovocytes ou des spermatozoïdes capables de fusionner. Les souffrances infligées aux animaux sont très légères puisqu'il s'agit principalement d'injections pour déclencher l'ovulation et d'euthanasie par gradient de CO<sub>2</sub>.

Pour ce projet nous estimons à 625 le nombre de souris que nous utiliserons.

Règle des 3 R - Les 2 procédures proposées n'induiront que des souffrances modérées liées à l'euthanasie par gradient de CO<sub>2</sub>. Pour des raisons scientifiques et éthiques, nous tenterons de remplacer les ovocytes par des cellules en culture dans lesquelles on peut exprimer les molécules nécessaires à la fusion avec le spermatozoïde. Le nombre d'ovocytes utilisés est réduit de manière à utiliser peu de souris femelles dans chaque expérience.

1297. Une diminution progressive de la fertilité des bovins laitiers a été observée parallèlement à l'augmentation de la production de lait par animal ces dernières décennies. Un facteur majeur conditionnant la période fertile et la réussite à l'insémination est la migration de spermatozoïdes mobiles depuis leur lieu de dépôt dans les voies génitales jusqu'au site de la fécondation, dans l'oviducte. Cependant, cette étape de migration et de conservation spermatique reste une boîte noire pour laquelle les observations sont difficiles. L'enjeu du projet présenté dans cette demande est de développer une technique de phénotypage non invasive permettant de caractériser la migration et la mobilité des spermatozoïdes dans le tractus génital in vivo après insémination chez les bovins. Le projet se décompose en deux étapes successives dont une première phase de mise au point de la technique de micro-endoscopie confocale, déjà utilisée chez la brebis, pour visualiser et quantifier la migration in vivo des spermatozoïdes depuis le corps utérin jusqu'à la jonction utéro-tubaire en utilisant 4 génisses issues d'un projet antérieur. Si cette mise au point n'est pas concluante au bout du temps initialement alloué (6 mois), le projet prendra fin. Dans le cas contraire, des mesures de la migration spermatique in vivo en période fertile seront effectuées chez deux lots de 8 génisses de race Prim Holstein à index « synthèse de fertilité » contrasté et sur 4 cycles sexuels successifs. Le phénotypage fin de ces deux populations extrêmes permettra d'évaluer la variabilité intra et interindividuelle des paramètres mesurés dans un objectif de sélection. Le projet présenté répond donc à la règle des 3R: (1) REMPLACEMENT: compte-tenu de l'objectif même de l'étude qui vise à comprendre la migration spermatique in utero, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in silico ; (2) REDUCTION: le projet étant construit en 2 phases distinctes permet de s'assurer de la réduction des effectifs de cette approche très exploratoire puisque 4 femelles seront utilisées dans la phase de mise au point puis, en cas de succès 2 lots de 8 génisses pour évaluer la variabilité phénotypique sur les caractères qui seront mesurés; (3) RAFFINEMENT: les génisses utilisées dans le projet seront placées sous surveillance continue (activité, rumination) et hébergées dans une stabulation récente répondant aux enjeux du bien-être animal chez cette espèce (10m<sup>2</sup> par animal avec un accès aisé à l'auge et aux points d'abreuvements, présence de tapis caoutchouc derrière pour le confort des applombs, accès à des brosses latérales et dorsales...). D'un point de vue scientifique, ce projet apportera donc des réponses importantes pour la compréhension des mécanismes à l'origine de la non fécondation/mortalité embryonnaire précoce en hausse chez les bovins laitiers. D'un point de vue génétique, ce projet permettra de progresser dans la recherche de marqueurs génétiques liés à la capacité des femelles à soutenir la migration spermatique pour la sélection de femelles plus fertiles.

1298. Le cancer colo-rectal est actuellement le 2ème cancer en terme de mortalité avec 17 000 décès en France en 2012 et le 3ème en terme d'incidence avec 39 000 nouveaux cas. La pathogénie est actuellement bien connue et implique la transformation de la muqueuse colique en adénome puis la dégénérescence vers le cancer. Nous estimons qu'environ 1 polype adénomateux sur 10 va dégénérer en cancer. Actuellement, le principal moyen de prévention repose sur la coloscopie et la possibilité de résection des polypes adénomateux. Le traitement endoscopique par résection des polypes est efficace. Son taux de morbidité est faible, mais au vu du nombre élevé d'examen réalisés (1,2 million de coloscopie par an en France en 2012), elle n'est pas négligeable. Les perforations coliques représentent selon les séries entre 1 et 20/1000 alors que les hémorragies retardées représentent 7% des patients après résection endoscopique d'une lésion de plus de 10mm. Ce taux pourrait même être supérieur en cas de traitement anticoagulant associé. Actuellement, aucun traitement préventif, visant à favoriser la cicatrisation muqueuse, n'a prouvé son efficacité.

Le butyrate est un acide gras présent dans la lumière du tube digestif à l'état physiologique. Il représente environ 8% des acides gras à chaîne courte dans le colon. Ces acides gras à chaîne courte dérivent du métabolisme des sucres alimentaires par le microbiote intestinal. De nombreuses études ont concerné le butyrate et ont permis de caractériser plusieurs propriétés : un effet antinéoplasique, une diminution du stress oxydatif, une neuromodulation du système entérique et un effet anti-inflammatoire sur la muqueuse du tube digestif. Plusieurs études cliniques ont permis de montrer l'efficacité d'un traitement par butyrate (sous forme de lavement intra-rectal) dans des atteintes inflammatoires du tube digestif : rectite radique, colite d'exclusion, pouchite. Son efficacité dans le traitement des formes distales de maladies inflammatoires chroniques reste en revanche débattue. L'effet d'un traitement par butyrate sur la cicatrisation muqueuse après lésion endoscopique n'a en revanche jamais été étudié.

En parallèle, la neurostimulation des racines sacrées (NRS) est un traitement récent des troubles de la motricité digestive au niveau du côlon et du rectum. Sa principale indication est l'incontinence anale, pour laquelle la NRS améliore la qualité de vie des patients en diminuant le nombre des fuites. Plusieurs études préliminaires chez l'homme ont montré une efficacité dans la constipation ainsi que dans le syndrome de l'intestin irritable. Par ailleurs, une étude portant sur des patients avec incontinence anale et maladie inflammatoire (Crohn rectal) a montré une amélioration des symptômes à la fois sur la continence, mais aussi sur la maladie elle-même. Néanmoins, dans cette étude préliminaire, il n'a pas été montré d'effet anti-inflammatoire propre de la NRS. Nous avons donc mis au point un modèle préclinique porcin pour étudier l'impact de la NRS sur la muqueuse rectale. Cette étude a clairement mis en évidence un renforcement de la barrière épithéliale intestinale, ce qui pourrait avoir des effets bénéfiques en cas de lésion de la barrière intestinale. En effet les résections endoscopiques des muqueuses comportent de nombreuses indications sur l'ensemble du tube digestif (résection de lésions précancéreuses coliques notamment) et sont un acte clinique fréquent. Les principales complications de ces traitements, sont les hémorragies aiguës ou retardées et les sténoses cicatricielles qui peuvent conduire à des hospitalisations et possèdent une morbi-mortalité certaine. Différentes approches thérapeutiques pour prévenir ces complications ont été proposées, par exemple, l'utilisation d'anti-TNF dans l'amélioration de la réparation muqueuse, la greffe de cellules orales autologues, ou la transplantation tissulaire de muqueuse digestive. A cause de l'efficacité partielle de ces traitements, il existe un fort besoin pour développer d'autres approches innovantes mini- invasives. Des études récentes in vivo ont permis de montrer que l'activation du système nerveux entérique, en particulier via la NRS et la stimulation vagale était capable d'activer les cellules gliales entériques, et de contribuer au renforcement et à la protection de la barrière épithéliale. Néanmoins, le rôle de la stimulation vagale et/ou sacrée dans les processus de réparation muqueuse reste à ce jour à déterminer.

Ce projet, faisant suite au projet antérieur autorisé, cherche à évaluer les effets d'une neurostimulation ou d'un traitement au butyrate sur la réparation/cicatrisation de la muqueuse digestive suite à des lésions endoscopiques rectales. Nous souhaitons également déterminer la capacité des cellules gliales à favoriser la réparation/cicatrisation en greffant ces cellules autologues dans les berges d'ulcères. Dans ce projet, nous utiliserons un maximum de 40 porcs (6 porcs par groupe+2 porcs si besoin). Les groupes étudiés dans ce projet seront comparés aux groupes déjà étudiés lors du projet antérieur (y compris groupe contrôle) selon la règle des 3R. L'ensemble des procédures suivra le principe des 3R: limitation des effectifs (6 par groupe), raffinement: condition d'hébergement en box individuel, diminution du stress, de la souffrance et de la douleur: les procédures de ce projet sont réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement antalgique leur est donné de façon adaptée en fonction de la procédure.

1299. La maladie (ou « démence ») à corps de Lewy (MCL) est la principale pathologie cognitive neurodégénérative de la personne âgée, après la maladie d'Alzheimer (MA). Ainsi elle représente 20% des patients déments. La maladie commence entre 50 et 85 ans. Le nombre de patients avec une MCL en France est estimé à environ 200000 sujets. Il s'agit donc comme pour la MA d'un enjeu majeur de santé publique. Les symptômes habituels de la MCL associent des troubles cognitifs comme par exemple des troubles de la mémoire, des troubles du comportement (illusions ou hallucinations visuelles), un syndrome parkinsonien -souvent discret en début de maladie- et des fluctuations attentionnelles. Au niveau cérébral, la MCL est caractérisée par la présence d'agrégats de protéines  $\alpha$ -synucléines, formant ce que l'on appelle les corps de Lewy. On retrouve ces agrégats également dans la maladie de Parkinson (MP), sauf qu'ils sont localisés dans une structure bien particulière (la substance noire) alors qu'ils sont plus diffus dans l'ensemble du cerveau dans la MCL. Les modèles animaux existant à l'heure actuelle sont créés pour modéliser la maladie de Parkinson et présentent souvent cette atteinte prédominante de la substance noire. Un facteur de risque de la MA, l'apolipoprotéine E (APOE4), est également retrouvé dans la MCL. Cependant, alors que la MP présente les mêmes types d'agrégat que pour la MCL, l'APOE4 n'est pas un facteur de risque dans cette pathologie. Dans ce projet, nous proposons de créer et caractériser un modèle double transgénique de la pathologie (APOLEWY), dans lequel l' $\alpha$ -synucléine humaine est co-exprimée avec l'APOE4 humaine

Dans la mesure où nos travaux portent sur l'étude des fonctions mnésiques, il n'est pas possible de recourir à un autre type de modèle d'étude qu'à celui de l'animal entier éveillé, soumis à des tests comportementaux. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires, les mêmes groupes d'animaux subiront l'ensemble des tests comportementaux et ce seront ces mêmes groupes qui seront analysés à la fin dans le but de mettre en évidence les caractéristiques de la pathologie au niveau du cerveau.

Prenant en compte la stratégie des 3R (remplacement, réduction et raffinement) et des calculs de puissance statistique, sachant que nous travaillerons qu'avec des souris mâles, qu'en plus de notre groupe APOLEWY, nous constituerons plusieurs groupes contrôles, groupes que nous étudierons à différents âges, nous estimons le nombre d'animaux utile à la réalisation de l'objectif à 300 souris. Afin de minimiser l'anxiété, la douleur et de la souffrance (raffinement), les animaux sont manipulés 1 à 2 min/jour, durant la semaine précédant le début du test comportemental. Ces manipulations ont pour but d'habituer les souris à l'expérimentateur et aux conditions de l'expérience pour réduire au minimum le stress ou la peur que l'animal pourrait ressentir devant une situation nouvelle et qui fausserait les paramètres d'évaluation de la mémoire. Ainsi, les animaux seront plus coopératifs à la réalisation de la tâche, nous permettant une interprétation correcte de leurs performances d'apprentissage et de mémoire et donc une optimisation du nombre d'animaux (réduction).

1300. La recherche préclinique in vivo, consiste à explorer en utilisant les modèles animaux pathologiques qui sont les plus proches de la pathologie humaine, les mécanismes qui aboutissent à l'apparition de la maladie, pour mieux la comprendre et pour ensuite développer des futurs traitements pour la combattre. Cette science est, par définition consommatrice d'animaux. La volonté du chercheur est toujours d'obtenir un plus grand nombre d'enseignements à partir de ses procédures expérimentales et de la technologie dont il dispose. Il se doit de respecter les règles éthiques des 3 R's envers l'animal et les

principes qui gouvernent la pratique de l'expérimentation sur animaux vivants, un de ces fondements vise notamment à réduire le nombre d'animaux utilisés. Cela conduit à la fois le concepteur de nouvelles technologies et le chercheur qui les utilise à adopter une attitude responsable qui puisse satisfaire à toutes ces exigences. Les évolutions technologiques, cette prise de conscience de l'expérimentateur et la législation contribuent à réduire le nombre d'animaux utilisés et surtout à protéger l'animal de l'inconfort et de la douleur.

Les études qui sont menées sur des longues périodes, imposent parfois de réaliser au cours du temps plusieurs examens, à différents stades de l'évolution ou de la régression de la maladie. Dans certaines situations, seul l'examen clinique post mortem est possible, ces cas sont les plus consommateurs d'animaux

Dans le cadre de nos projets de recherche qui sont orientés vers les maladies du foie et du système digestif, il est nécessaire d'explorer les organes de la manière la plus fine possible, c'est-à-dire au niveau de la cellule pour évaluer les dommages subis par l'évolution de la maladie étudiée. Les méthodes de références pour ces analyses sont celles qui sont pratiquées par les histopathologistes à partir de biopsies (petit fragment de l'organe étudié) prélevées sur l'animal en cours d'étude ou le plus fréquemment à partir de l'organe entier prélevé sur l'animal euthanasié en fin d'étude. Chez l'animal de laboratoire de petite taille, le prélèvement de biopsies n'est pas aisé, et c'est plus généralement la seconde solution qui est employée. Des technologies élaborées utilisant des microscopes permettent d'étudier les tissus à l'échelle de la cellule avec en plus une dimension de profondeur en plus de la microscopie classique ont été largement développées et ont même fait l'objet de l'apparition de dispositifs permettant d'explorer in situ chez le patient en complément des méthodes usuelles classiques d'imagerie médicale les sites qui peuvent présenter des lésions

La technologie a aussi été mise à la disposition des laboratoires de recherche, elle permettrait de pouvoir réaliser sur un même animal un suivi longitudinal de l'évolution d'une pathologie, contribuant ainsi à la réduction du nombre d'animaux nécessaires, mais aussi à accroître le niveau de précision des informations recueillies.

Notre objectif n'est pas de substituer par cette nouvelle technologie la méthode de référence, mais d'améliorer la qualité de nos résultats expérimentaux tout en contribuant à la réduction du nombre d'animaux engagés dans nos travaux. Ce projet fera appel à des rats chez lesquels une pathologie hépatique déjà maîtrisée au laboratoire aura été induite et chez lesquels sera évalué le dispositif d'imagerie confocale. Un total maximum de 240 animaux pourrait être utilisé pour ce projet qui contribuera à significativement réduire le nombre des animaux utilisés dans les procédures ultérieures qui feront appel à cette technologie.

Les procédures expérimentales qui seront décrites dans ce dossier de demande d'autorisation de projet consisteront à détailler les méthodes de préparation et d'instrumentation des animaux destinés à évaluer la technologie dont il est question. Les méthodes utilisées sont qualifiées de peu invasives car nécessite que l'introduction d'une sonde au travers d'une simple aiguille pour atteindre l'organe à visualiser, les gestes sont pratiqués sous anesthésie et l'utilisation d'antalgiques locaux permettront d'atténuer la douleur au lieu de l'injection.

Réduction du nombre d'animaux utilisés, raffinement des procédures par l'emploi des produits analgésiques, et remplacement de technologies par des méthodes innovantes plus performantes sont les bénéfices escomptés à mettre en avant pour justifier ce projet.