



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

Résumés non techniques des projets autorisés (51)

5101. L'asthme allergique est une maladie chronique inflammatoire fréquente des voies respiratoires qui atteint 5 à 10 % de la population mondiale. Les corticoïdes contrôlent la maladie, mais induisent des effets secondaires et ne permettent pas toujours de prévenir les exacerbations menant parfois à un asthme de phénotype aigu, grave et au décès des malades. A long terme, la maladie induit des modifications structurales de la paroi des tissus pulmonaires, dit remodelage bronchique, qui est à l'origine du déclin de la fonction respiratoire pouvant aboutir à une insuffisance respiratoire chronique. Pour des soucis pratiques et d'éthique, de nombreuses manifestations liées à l'asthme, ne peuvent pas être étudiées chez un patient asthmatique humain. A contrario, la mise en place et l'utilisation de modèles murins présentent de nombreux avantages pour l'expérimentation et l'exploration des différents mécanismes pathologiques. Le modèle murin classiquement utilisé dans la littérature est un modèle de sensibilisation et challenge à la protéine majeure du blanc d'œuf, l'ovalbumine (OVA), associée à un adjuvant, l'alun. Bien que ce modèle soit pertinent, on note cependant que l'inflammation y est temporaire, et ne reflète pas l'aspect chronique de la pathologie. Un autre modèle murin d'asthme allergique avec remodelage utilise les acariens comme pneumallergènes pour induire ces mêmes manifestations. Cela passe par une sensibilisation proche de celle retrouvée chez l'homme basée sur 4 sensibilisations percutanées sur les oreilles des souris d'extrait total d'acarien (HDM) en solution dans du DMSO, suivi de 6 challenge intra-nasaux d'HDM en solution dans du PBS. Les résultats montrent que la stimulation bronchique par les acariens chez des souris sensibilisées par voie percutanée induit une inflammation pulmonaire mixte (éosinophile / neutrophile), une hyperréactivité des voies aériennes ainsi qu'un remodelage au niveau bronchique. Ce modèle d'induction de l'allergie aux acariens chez la souris est un outil pertinent pour étudier les phénomènes immunologiques complexes de la mise en place de l'hyperréactivité bronchique à l'exacerbation et pourra aussi être utilisé afin de tester de nouvelles thérapeutiques. L'utilisation de ce modèle pour élucider les mécanismes immunologiques au cours de l'asthme allergique et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques sera effectuée sur un nombre estimé de 1440 souris sur 5 ans. Il n'existe actuellement aucun modèle d'asthme allergique avec remodelage remplaçant le modèle animal (Remplacement). Le nombre d'animaux estimé dans ce protocole est suffisant pour justifier d'une pertinence scientifique (Réduction). Le protocole prend en compte au mieux du bien-être des animaux par un suivi régulier des animaux asthmatiques et par une mise à mort la plus éthique possible des animaux (Raffinement).

5102. La maladie d'Alzheimer (MA), une maladie neurodégénérative chronique, représente la cause la plus fréquente de démence chez les personnes âgées. Cette maladie est caractérisée par la formation de plaques séniles dans le système nerveux central (SNC), dont les principaux composants sont les plaques séniles d'amyloïde bêta (Ab).

Alors que de nombreux gènes de susceptibilité pour la MA ont été répertoriés, le seul fortement confirmé comme facteur de risque est l'apolipoprotéine E (APOE). Il existe 3 allèles codant pour la protéine APOE :

- APOE3 est neutre,
- APOE4 considéré comme favorisant le risque de développer la MA,
- APOE2 considéré comme protecteur de la MA.

Des preuves solides suggèrent que APOE2 diminue la neuropathologie liée à la MA et réduit le déclin cognitif lié à l'âge. L'influence de l'APOE sur la MA semble liée à ses effets sur le métabolisme de l'Ab.

Notre objectif est de développer une nouvelle approche thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer visant à surexprimer la protéine APOE2, en utilisant comme véhicule les cellules souches hématopoïétiques murines (CSH) (cellules sanguines de souris). Ces cellules peuvent en effet être génétiquement modifiées ex vivo pour exprimer un gène thérapeutique. Elles peuvent être ensuite réinjectées chez l'animal (modèle de la MA), après un traitement qui annihile les cellules hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse, ces cellules étant productrices des globules blancs et rouges du sang. Les cellules ainsi injectées reconstitueront le système hématopoïétique des animaux hôtes et après passage de la barrière hémato-encéphalique, pourront se différencier localement pour exprimer et sécréter la protéine APOE2.

Nous évaluerons ensuite les dépôts d'Ab (et ses dérivés), la neurodégénérescence par l'évolution comportementale de ces animaux. Ce projet a pour but d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette approche dans le but de diminuer la pathologie liée à l'accumulation de l'Ab.

Le recours à l'animal est nécessaire car aucun milieu de culture ou système synthétique ne peut aujourd'hui reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau, et en particulier leurs interactions structurelles et fonctionnelles. Les 480 rongeurs étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et ont été élevés en captivité dans des établissements agréés. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement significatives.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des rongeurs hébergés en groupe garantissent l'application du principe de raffinement.

5103. Les personnes travaillant avec des animaux de laboratoire doivent maîtriser des gestes techniques plus ou moins complexes : administrations, prélèvements, chirurgies... Leur formation initiale doit parfois être complétée par une formation spécifique, en fonction des études qu'ils seront amenés à faire et de l'évolution des connaissances et pratiques.

Le but de ce projet est de décrire le processus d'acquisition de gestes techniques réalisés, au cours des études précliniques.

Pour ce projet, nous prévoyons d'utiliser 1738 animaux (souris, rats, gerbilles, hamsters, cochon d'inde, lapins, porcs, chiens, primates) sur une durée de 5 ans. Dans la très grande majorité des cas, il s'agira d'animaux sortant d'une étude et devant être euthanasiés (animaux réutilisés). Plus rarement, il pourra s'agir d'animaux commandés pour une étude mais n'ayant pas été utilisés et devant être euthanasiés. De manière exceptionnelle, des animaux seront commandés spécifiquement dans le but de réaliser cette formation.

La personne en formation sera systématiquement accompagnée lors de sa formation par une personne experte dont la maîtrise est reconnue pour le geste. La formation se divisera en plusieurs étapes : formation théorique, observation, réalisation sous une supervision directe, réalisation sous une supervision à distance. Au cours de chaque étape, le nombre de répétitions pourra varier en fonction de la complexité du geste et de l'aptitude de la personne en formation à acquérir le geste.

Pour valider l'acquisition des gestes, la personne experte tiendra compte de critères de réussite et de critères de réalisation, définis pour chaque procédure.

- Remplacement. Pour ce projet, il n'existe pas de méthode de substitution, qui pourraient restituer fidèlement les comportements et réactions des animaux et/ou la manipulation des tissus vivants. Ces gestes étant très spécifiques de l'espèce, ils doivent être acquis chez l'espèce cible.

- Réduction. Les animaux seront, dans la mesure du possible, issus d'études et utilisés pour 2 ou plusieurs procédures de ce projet. Une supervision étroite garantira une utilisation optimale des animaux en minimisant le risque d'erreur.

- Raffinement. Les animaux bénéficient d'un enrichissement social et physique dans la zone d'hébergement. Un suivi quotidien de l'état de santé des animaux sera réalisé avec une surveillance systématique de points limites. Les procédures sont réalisées par du personnel déjà formé aux sciences et techniques des animaux de laboratoire, mais devant acquérir une expertise supplémentaire. Ce personnel en formation sera toujours sous la supervision d'une personne experte.

[Autorisation abrogée]

5104. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques qui pourraient faire preuve d'efficacité dans certaines formes d'hypertension (hypertension artérielle systémique ou pulmonaire par exemple).

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et sont mises en œuvre au sein du laboratoire. Ces tests nécessitent l'utilisation d'animaux. Même si des tests *in vitro* peuvent être réalisés au préalable afin de mettre en évidence certaines propriétés des substances testées (ex: vasodilatation), ces propriétés devront être confirmées *in vivo* dans le modèle animal. L'utilisation d'animaux est donc indispensable. Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à pouvoir interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre d'animaux qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 3000 rats. Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en l'application de mesures antalgiques appropriées et en un suivi des points limites permettant de réaliser une euthanasie pour soulager les animaux si nécessaire.

5105. La maladie de Rendu-Osler (RO) ou HHT (Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia) est une maladie rare qui se caractérise chez les patients par des épistaxis (saignements du nez) importants, des tégangiectasies (dilatations de petits vaisseaux sanguins) au niveau des muqueuses ou sur la peau et des malformations artério-veineuses (jonction directe entre veines et artères) au niveau du foie, des poumons et du cerveau dans les cas les plus graves. Il s'agit d'une maladie génétique rare impliquant plusieurs gènes, dont notamment un gène codant pour le récepteur ALK1, spécifique des cellules endothéliales (cellules qui tapissent la paroi interne des vaisseaux sanguins). ALK1 est une protéine directement impliquée dans l'angiogenèse (formation des néo-vaisseaux à partir de vaisseaux existants), un processus physiologique normal dans le développement du réseau vasculaire mais qui est également impliqué dans un certain nombre de pathologies. Chez les patients atteints de la maladie de Rendu-Osler, la mutation de ce gène, ALK1, suffit à déclencher la maladie.

Notre équipe a identifié la protéine BMP9 (Bone Morphogenetic Protein 9), un facteur de croissance, comme ligand du récepteur ALK1. L'objectif de cette étude vise à déterminer le rôle potentiel de BMP9 sur la vascularisation sanguine et lymphatique et son implication dans la maladie de Rendu-Osler. Pour répondre à cette question, nous utiliserons des souris privées de Bmp9 que nous comparerons à des souris normales. Cette souche murine Bmp9-KO a été choisie en accord avec les connaissances scientifiques car elle présente un phénotype proche de la maladie de Rendu-Osler. Notre étude vise à identifier des malformations (tégangiectasies, malformations artério-veineuses dans les différents organes fréquemment touchés par la pathologie tels que le foie, le cerveau et les poumons) chez ces souris Bmp9-KO s'apparentant à ceux de la pathologie humaine. Ceci permettra de valider ce modèle murin pour l'étude de la pathologie. Il est attendu que ces phénotypes apparaissent et s'intensifient sur les animaux vieillissants comme c'est le cas dans la pathologie humaine.

Aucune méthode cellulaire ou informatique ne peut fournir ces informations, importantes pour l'élaboration ultérieure de stratégies thérapeutiques. Le recours à des investigations *in vivo* est donc nécessaire.

Le modèle rongeur a été choisi pour réaliser cette étude. Les animaux sont nés et élevés dans un établissement agréé. L'étude porte sur 1400 animaux (700 animaux normaux et 700 animaux privés de Bmp9). Ce nombre a été déterminé sur la base de données scientifiques et de nos observations de nos modèles rongeurs pour répondre aux exigences d'un test statistique (test non paramétrique de Mann-Whitney) qui sera appliqué pour chaque paramètre observé. Néanmoins, nous veillerons à n'utiliser que le minimum nécessaire d'animaux pour assurer la validité des résultats.

Les animaux sont hébergés en groupe dans un environnement enrichi. Une surveillance rapprochée des animaux sera réalisée pour détecter au plus tôt les premiers signes de la maladie. Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis pour éviter les douleurs lors des interventions sur les animaux, ainsi que des critères d'arrêt pour prendre en compte d'éventuels effets inattendus.

5106. Le virus influenza D (INFD) est un virus à tropisme respiratoire qui a été récemment identifié chez les jeunes bovins aux USA, en France, en Chine et en Italie. Pour le moment les données scientifiques sont récentes et peu nombreuses, notamment sur son rôle dans la pathologie respiratoire des jeunes bovins, pathologie la plus importante économiquement.

L'objectif de ce projet est de définir le pouvoir pathogène du virus influenza D chez le veau, hôte naturel, les voies de transmission du virus entre bovins et la réponse immunitaire de l'hôte. Ces données collectées sur 19 jours (J-3 à J15 post inoculation) permettront:

- De déterminer l'impact du virus INFD en pathologie respiratoire des jeunes veaux avec des applications en termes de diagnostic et de biosécurité (modalités de transmission).
- De déterminer la nature de la réponse immunitaire et le niveau de protection associé, pour des applications vaccinales potentielles.
- D'établir un modèle d'infection expérimentale qui puisse être utilisé pour des futures études de pathogénicité mais aussi d'efficacité -innocuité vaccinale.

Pour cela des études d'infection expérimentales par le virus INFD seront réalisées.

En pratique, différentes doses et voies d'inoculation du virus seront testées. Des suivis clinique, lésionnel, virologique et immunologique seront réalisés, nécessitant divers prélèvements;

Un maximum de 34 veaux mâles sera donc nécessaire pour mener à bien ce projet d'une durée maximum de 5 ans

Remplacement : il s'agit d'une étude visant à étudier le pouvoir pathogène d'un virus émergent chez son hôte naturel. Il n'existe aucun modèle, in vitro ou in silico, permettant de répondre à cette question.

Réduction: l'étude préliminaire de détermination de la voie d'inoculation optimale permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaires à ce projet.

Raffinement: Les veaux seront hébergés en groupes sociaux et bénéficieront de logettes équipées de tapis adaptés ainsi que d'une aire d'exercice. Chaque animal de l'étude permettra de collecter des données sur un nombre important de paramètres (immunologique, hématologique, physiologique et physiopathologique), permettant ainsi une amélioration des connaissances sur l'infection INFD. Le suivi biquotidien des animaux par un vétérinaire pendant toute la durée de l'étude, la définition d'un point limite et le conditionnement des procédures à l'état de santé des animaux contribuent à réduire la douleur et le stress.

L'utilisation de bollus ruminants pour l'enregistrement en temps réel de la température corporelle, permettra de réduire les manipulations des animaux et assurera un suivi fiable et direct de ce paramètre.

5107. La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie rare, chronique et progressive. Elle présente à 5 ans après le diagnostic un taux de mortalité supérieur à 70% et il n'existe pas de thérapie efficace. La FPI est essentiellement caractérisée par une accumulation de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) et de fibroblastes dans les espaces aériens distaux aboutissant à une insuffisance respiratoire. Les fibroblastes accumulés dans les foyers fibroblastiques sont les principaux acteurs de cette accumulation de MEC. Lors de la FPI, il se met en place un mécanisme de réparation anormal au cours duquel on assiste à une réactivation de phénomènes impliqués dans le développement embryonnaire. PRRX1 (Paired Related Homeobox protein-1) est un facteur de transcription impliqué dans le développement embryonnaire, en particulier au cours de la morphogenèse crânio-faciale et de la squelettogenèse.

Notre hypothèse est qu'il existe une perturbation de l'expression de PRRX1 dans le poumon au cours de la fibrogénèse pulmonaire et que ceci pourrait contribuer au processus de fibrose pulmonaire. En effet, peu présent en temps normal dans les tissus adultes, l'expression de PRRX1 se trouve augmentée dans le noyau des fibroblastes chez des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique. Nous avons confirmés ces résultats ex vivo par immunohistochimie et in vitro sur des fibroblastes en culture. PRRX1 permettrait aussi de maintenir les fibroblastes dans un état indifférencié. Ainsi l'utilisation de différents modèles de fibrose chez la souris nous permettrait de valider le rôle du facteur de transcription PRRX1 comme cible thérapeutique dans la fibrose pulmonaire.

A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives à l'utilisation de souris pour modéliser le développement de la fibrose pulmonaire. Le nombre d'animaux utilisé sera celui nécessaire afin d'atteindre les objectifs du projet. La pathologie humaine de la fibrose pulmonaire affectant les adultes nous utiliserons des souris de 8 à 12 semaines. En respectant ces exigences de remplacement (utilisation de la culture cellulaire), de réduction (calcul du nombre minimum d'animaux à utiliser pour pouvoir réaliser des analyses statistiques et de raffinement (utilisation des prélèvements animaux pour plusieurs types d'analyses) (3Rs) nous avons calculé que le nombre d'animaux nécessaire à cette étude serait d'un total de 896 souris pour l'ensemble des expériences.

5108. Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines, des peptides ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une structure épitopique conformationnelle. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les anticorps polyclonaux ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie.

Les antisérum sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui stimule la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. Des échantillons de sang de l'animal sont prélevés pour évaluer la réponse immunitaire et le niveau de production d'anticorps. Lorsque le titre est suffisamment élevé, l'antisérum est préparé à partir de prise de sang suivie de l'isolement du sérum, puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants :

- 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps);
- 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps;
- 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps;
- 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocoles et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 100 protocoles, représentant 200 lapins.

La période minimum d'immunisation est de 45 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modéré en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, biscottes...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

5109. Notre projet consiste à explorer, par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), un nouveau type de contraste, phénomène physique qui permet de distinguer différents tissus biologiques entre eux, comme un tissu sain d'une tumeur.

Habituellement, en IRM à bas champ (IRM clinique), ce contraste est obtenu en injectant des produits à base de Gadolinium. Pour éviter l'injection de ces produits, nous proposons l'utilisation d'une technique, appelée cyclage de champ, qui consiste en l'application d'une variation minimale de l'intensité du champ magnétique principal de l'IRM durant un examen classique. Cette perturbation magnétique supplémentaire, permettrait de rehausser le contraste entre deux tissus de nature différente. Des résultats préliminaires ont été obtenus par une équipe écossaise, qui suggère la possibilité de distinguer tissus sains et tissus tumoraux par cette méthodologie, en raison des variations de l'environnement moléculaire (teneur en protéines) dans ces tissus. Ce type de méthode pourrait permettre une détection plus précise et plus précoce des pathologies cancéreuses chez les patients, et ainsi de proposer une prise en charge mieux ciblée.

Ayant les compétences du cyclage de champ sur un IRM clinique, nous souhaitons démontrer l'apport du cyclage de champ IRM dans l'étude du carcinome du rein. L'évolution d'un cancer dans un organisme vivant ne pouvant être aujourd'hui modélisée par une technique informatique ni par une technique in vitro, il est indispensable de réaliser ces examens sur un animal.

Cette étude nécessitera au total 35 rongeurs (minimum requis pour la fiabilité du traitement statistique des résultats) nés et élevés dans des établissements destinés aux recherches scientifiques. L'optimisation du protocole et des paramètres de l'IRM sera réalisée à l'aide d'un matériau mimant la matière vivante aussi appelé « fantôme », pour éviter l'emploi d'animaux supplémentaires. De plus, et afin d'en réduire encore plus le nombre, nous utiliserons des animaux d'une autre étude sans effet cumulatif après contrôle d'un vétérinaire.

Ils sont hébergés en groupe sociaux dans un environnement enrichi de modules dans le but d'améliorer leur bien-être. Ils sont observés quotidiennement par des équipes en charge des soins. Les méthodes expérimentales du présent projet ont été choisies de façon à éviter tout stress ou toute souffrance de l'animal : l'examen d'IRM est un examen non invasif pour l'animal. Toutefois, dans le cas d'apparition de douleurs, des protocoles d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. De plus, nous avons établi une liste de critères d'arrêt de l'étude afin d'intervenir au plus vite auprès de l'animal.

5110. Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines, des peptides ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une structure épitopique conformationnelle. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes. Elle constitue une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants :

- 1) la quantité nécessaire d'anticorps (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps);
- 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps;
- 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps;
- 4) l'utilisation prévue des anticorps.

La poule est notamment utile pour la production d'AcP contre des protéines ou des peptides de mammifères, car elle est éloignée phylogénétiquement de la classe des Mammalia. Le choix de poule peut être considéré comme un raffinement de la production d'AcP, car ces derniers peuvent être extraits du jaune d'œuf sans avoir à prélever du sang sur l'animal. De plus, l'utilisation de poules contribue également à la réduction du nombre d'animaux utilisés, ces dernières produisant de plus grandes quantités d'anticorps que les rongeurs de laboratoire. De manière générale, les poules sont d'excellentes productrices d'anticorps et leur réponse immunologique est comparable à celle des mammifères. Il faut cependant souligner que les poules ne conviennent pas à toutes les applications.

En se basant sur le nombre moyen de protocoles et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 100 protocoles, représentant 200 poules.

La période minimum d'immunisation est de 43 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 14 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modéré en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les poules sont hébergées dans des installations appropriées et elles disposent d'enrichissement (grattoir, coquille d'huitre, pommes).

5111. Le traitement des cancers s'est amélioré en raison d'une meilleure connaissance de l'oncogénèse et du développement de nouvelles thérapies ciblées, comme les anticorps monoclonaux. Dans le but de sélectionner les molécules les plus efficaces, les

études précliniques représentent donc une étape importante. Différents modèles précliniques de cancers chez l'animal peuvent être utilisés. La réalisation de ces modèles constitue un processus à long terme comportant diverses étapes dont l'objectif final est de montrer qu'ils possèdent une haute valeur prédictive de l'efficacité thérapeutique et imitent fidèlement des situations observées en oncologie – telles que les résistances aux traitements, les métastases et les récurrences. L'établissement d'un modèle animal fiable, reproductible et stable est donc une étape indispensable pour pouvoir réaliser des études précliniques notamment chez la souris.

L'objectif de ce projet est de mettre en place un modèle murin standardisé, reproductible et fiable afin de pouvoir évaluer in fine l'efficacité de molécules à visée thérapeutique chez l'homme. Nous souhaitons comparer le potentiel tumorigénique d'une lignée de lymphome dans deux souches de souris C57BL6J de provenance différente. En effet, nous avons observé qu'en fonction de la provenance de nos souris, la survie des animaux et le potentiel tumorigénique de notre lymphome étaient différents.

Nous utiliserons un total de 48 souris C57BL6J de deux provenances différentes, chaque fournisseur nous approvisionnera en 24 souris, ces 24 souris seront réparties en 4 groupes de 6 souris (4 quantités de cellules tumorales inoculées seront testées). Nous suivrons la survie de nos souris au cours du temps afin de déterminer le modèle animal le plus fiable, reproductible et stable.

Ce projet a été élaboré en prenant compte de la règle des 3R: l'utilisation d'un modèle murin est la seule approche permettant d'étudier le lien de causalité entre la survie des animaux et le nombre de cellules tumorales injectées, il ne peut donc pas être remplacé (principe de remplacement). Nous avons défini un nombre minimal d'animaux (principe de réduction). Les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux en assurant des soins et une médication appropriée (principe de raffinement).

5112. Un grand nombre de pathologies cérébrales demeurent incurables notamment parce que leurs causes ne sont pas toujours identifiées, ce qui limite l'arrivée de thérapies ciblées. Un des principaux verrous dans la compréhension de ces maladies réside dans l'incapacité à prélever du tissu dans des régions du cerveau associées à de grandes fonctions vitales, chez les patients, à des stades précoces de la maladie.

La maladie de Parkinson, caractérisée par la mort des neurones dopaminergiques dans des noyaux profonds du cerveau, incarne parfaitement cette problématique. Elle est aujourd'hui prise en charge par des traitements qui soulagent les symptômes de la maladie mais ne la guérissent pas. De très nombreuses études sont conduites pour en comprendre les causes et rechercher des traitements mais les analyses interviennent en "post mortem" et ne représentent que des stades très avancés, terminaux du processus pathologiques.

Nous avons mis au point un dispositif chirurgical qui repose sur l'utilisation de surfaces en silicium pour capter des échantillons tissulaires par simple contact avec le tissu nerveux. Les travaux antérieurs ont permis de démontrer l'efficacité et la sécurité de cette nouvelle procédure biomédicale, l'"empreinte tissulaire" et un essai clinique évalue actuellement son intérêt pour les patients atteints de tumeurs cérébrales.

Le présent projet prépare la voie à son utilisation chez des patients atteints de maladie de Parkinson. Pour atteindre cet objectif, nous avons développé de nouvelles surfaces en silicium répondant mieux aux contraintes chirurgicales pour aborder le cerveau neurodégénératif. Aussi, il est nécessaire d'évaluer l'efficacité et la sécurité de dispositifs utilisant cette nouvelle génération de surfaces en silicium. Tous les tests de biocompatibilité requis ont d'abord été faits in vitro puis in vivo chez le petit animal. Les résultats encourageants motivent une dernière étape de validation dans un modèle de primate non humain et constitue la dernière étape nécessaire, en l'absence d'un modèle alternatif (principe de remplacement), pour anticiper un transfert en pratique clinique. Il nous est en effet impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

Ce projet utilisera 12 Macaques Fascicularis, ce qui constitue le nombre maximum d'animaux impliqués dans ce projet tout en garantissant des résultats statistiquement significatifs et permettant de ne faire qu'une seule fois cette étude (principe de réduction). Les personnels impliqués dans ce projet disposent d'une grande expérience dans le suivi du bien être des primates, et dans les procédures d'analgésie pouvant être mises en œuvre pour réduire au maximum les contraintes associées au projet. Les animaux seront examinés quotidiennement et leur état clinique sera évalué par une grille quantifiée qui permet de détecter précocement tout signe de souffrance et de le prendre en charge efficacement par des mesures antalgiques appropriées (principe de raffinement).

5113. Des antibiotiques sont à l'heure actuelle utilisés en élevage de volailles et de porcs lors d'infections d'origine virale. Cette pratique est très contestable car elle contribue à un usage inutile d'antibiotiques qui peut contribuer à la sélection de bactéries résistantes potentiellement transmissibles à l'Homme.

Sur le terrain, une amélioration clinique des animaux infectés par un virus et traités avec un antibiotique est observée alors que l'antibiotique ne devrait avoir aucun effet.

Une hypothèse est que certains antibiotiques auraient des propriétés anti-inflammatoires.

Ce projet a pour but d'étudier chez la souris l'effet anti-inflammatoire de certains antibiotiques en les comparant à des molécules anti-inflammatoires de référence.

Différents types d'inflammation seront testés afin de vérifier si l'effet anti-inflammatoire est dépendant ou non du type d'inflammation induite: inflammation induite chimiquement, inflammation induite par une infection bactérienne, inflammation induite par une infection virale.

Pour chaque comparaison antibiotique vs anti-inflammatoire avec les différents types d'inflammation, 30 souris seront nécessaires (10 souris avec antibiotique, 10 souris avec anti-inflammatoire, 10 souris avec placebo).

En fonction des résultats obtenus dans les différentes phases du projet, un maximum de 360 souris seront utilisées.

Les souris seront hébergées en groupe dans des conditions conformes à la réglementation avec un enrichissement (papier, abris, ...). Une période d'acclimatation de 7 jours sera systématiquement mise en place avant chaque expérience. Le nombre de souris sera réduit au minimum en réalisant les expériences successivement. Si les 2 premiers essais avec 60 souris ne montrent aucun effet anti-inflammatoire des antibiotiques, le projet sera stoppé.

5114. L'activité au sein de la plateforme IRM petit animal nécessite des développements méthodologiques pour mettre au point des séquences IRM pour divers protocoles d'imagerie structurale, fonctionnelle et spectroscopique afin de répondre aux demandes variées des projets de recherche. L'IRM chez le petit animal consiste à acquérir des images des structures internes du cerveau (ou potentiellement d'autres organes) mais aussi de son fonctionnement et de son métabolisme énergétique. Pour les protocoles les plus fréquents cela implique une anesthésie des animaux au gaz pendant toute la durée des acquisitions. Nous utiliserons sur 5 ans un total de 100 souris et 50 rats. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ; 3) remplacement, les études in vitro et sur animaux invertébrés ne permettant pas l'étude de comportements complexes, le rongeur est une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude.

5115. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) concerne 800 000 à un million de personnes en France et la fréquence de la maladie augmente avec l'âge. La forme exsudative, qui se caractérise par l'apparition de vaisseaux anormaux sous la rétine (néovaisseaux), est la moins fréquente mais son évolution peut être particulièrement rapide et invalidante.

Bien que des traitements soient disponibles pour cette forme (traitements « anti-VEGF ») depuis quelques années, ils ne permettent pas de bloquer complètement la maladie et nécessitent par conséquent des injections répétées dans l'œil. De plus, ce type d'injection peut entraîner des complications particulièrement sévères.

La thérapie génique est l'une des stratégies possible pour assurer une production continue et à long terme d'une protéine thérapeutique. Nous avons donc développé une thérapie non virale par électrotransfert dans le muscle ciliaire de plasmide permettant l'expression dans le vitré du VEGF-Trap et du récepteur soluble du TNF α .

L'objectif de notre étude est de déterminer l'effet de ces deux plasmides sur la pousse vasculaire et la perméabilité vasculaire dans un modèle de néo-vascularisation choroïdienne (CNV) chez le rat. L'ensemble du projet nécessitera 480 rats.

Dans le cadre de la règle des 3R, le modèle CNV est le seul modèle expérimental permettant de démontrer l'efficacité de notre technologie. Les procédures mises en place pour réaliser le projet sont peu traumatiques, de courte durée et sont réalisées sous anesthésie générale. Par ailleurs, des points limites sont identifiés afin de minimiser l'inconfort, la souffrance ou la détresse potentiels des animaux et de mettre en place la conduite à tenir.

5116. Le projet a pour objectif d'évaluer une nouvelle voie d'administration d'un traitement des voies respiratoires supérieures (VRS) qui serait mieux tolérée par l'animal. Les chevaux montrent souvent des signes de toux/ de dysphagie transitoires après les chirurgies trans-endoscopiques au laser ou après laryngoplastie dans le cadre du traitement du cornage ; les traitements médicaux topiques visent à diminuer l'inflammation et la douleur post-opératoire. La voie d'application classique est la voie nasopharyngée, avec une tolérance variable du cheval traité. La voie d'application orale pourrait faciliter le traitement et donnerait la possibilité au propriétaire de continuer le traitement une fois que l'animal a quitté l'hôpital. Compte tenu de l'anatomie des VRS du Cheval, on peut supposer que la distribution d'une solution administrée par voie orale n'atteindra pas le larynx (hypothèse 1). Après réalisation d'une chirurgie laryngée, on constate en pratique cependant un dysfonctionnement transitoire au niveau pharyngé/laryngé, qui laisse supposer que la voie orale peut permettre le traitement du larynx (hypothèse 2). La distribution topographique des traitements pharyngés/laryngés topiques n'a pas été évaluée de façon standardisée à notre connaissance.

Les objectifs de l'étude sont : 1. comparer la distribution topographique d'une préparation topique colorée administrée par voie nasale ou orale chez des chevaux sains et 2. Evaluer la distribution topographique de cette même préparation chez des chevaux ayant subi différents types de chirurgie des voies respiratoires supérieures (VRS).

L'étude utilise une préparation courante utilisée pour le traitement topique des VRS, colorée avec du colorant alimentaire bleu. Les deux voies d'administration (orale vs nasale) seront testées dans un ordre aléatoire chez 5 chevaux adultes, avec application de 20 ml de solution par administration. Une endoscopie des VRS sera réalisée après chaque traitement et les structures anatomiques colorées en bleu seront identifiées et documentées par enregistrement d'images. Chez les chevaux traités pour chirurgie des VRS (n=4x5, soit 20 animaux), le test sera effectué en pré-opératoire, en post-opératoire immédiat (24-48h) et après 6 semaines minimum pour objectiver des modifications éventuelles de la distribution topographique de la solution associées à l'intervention ou à l'inflammation post-opératoire.

Ce type d'essai ne peut produire de résultats valides que lorsqu'il est réalisé dans l'espèce cible des traitements envisagés, du point de vue de la réduction du coût en termes d'inconfort généré chez les animaux, il est à noter que les animaux inclus dans cette étude auraient de toute façon bénéficié du traitement anti-inflammatoire testé ici, sous sédation légère, et que la seule différence avec l'exercice de la médecine vétérinaire non expérimentale est l'adjonction d'un colorant alimentaire à la préparation et que l'impact de la présence de ce colorant est probablement nul pour les animaux. Des groupes expérimentaux de 5 animaux sont constitués, ce nombre est aussi réduit que possible tout en tenant compte des variations interindividuelles.

Les images enregistrées lors de chaque test seront évaluées en aveugle à l'issue de l'étude et les résultats traités de façon descriptive. Les chevaux intégrés dans l'étude retourneront à leurs conditions de vie et activités respectives (chevaux d'enseignement et chevaux de clients).

5117. Ce protocole de recherche préclinique s'inscrit dans le cadre du développement d'une nouvelle plateforme de navigation électromagnétique (EMN) appliqué au domaine de la chirurgie guidée par l'image. Cette technologie s'intègre dans les protocoles de soins associés au traitement guidé par l'image des pathologies touchant les voies aériennes. La mise en place de cette technologie requiert des validations précliniques afin de tester les différentes itérations technologiques.

Une plateforme de navigation semi-automatique permettant l'accès aux nodules pulmonaires périphériques. À ce jour, l'EMN est utilisée pour le guidage des biopsies du poumon périphérique ou encore pour guider la mise en place de marques de recalage en radiothérapie ciblée. L'efficacité de l'EMN a également été démontrée dans la délivrance de thérapie dans le cas de cancer des voies supérieures (brachio-thérapie). Cependant, nous pensons qu'un accès précis et sécurisé aux nodules périphériques permettra d'amener la thérapie appropriée en utilisant les dernières techniques d'endoscopie interventionnelle telle que la radio-ablation.

Ce projet remplit les conditions des 3R :

Remplacement : Ce projet de recherche requiert l'utilisation d'animaux vivants permettant de valider les performances techniques ainsi que l'efficacité et la sécurité d'utilisation de notre innovation dans un contexte de procédure guidée par l'image. Le porc est un modèle de choix, par sa taille, permettant d'utiliser des dispositifs de chirurgie hybride conçus pour un usage chez l'homme.

Réduction : Dans le but de minimiser l'utilisation d'animaux, un modèle de poumon artificiel a été développé et testé [3]. Ce modèle permet de limiter le nombre d'animaux utilisé en validant les modèles en amont de l'étude préclinique. Le nombre d'animaux utilisé pour la validation du dispositif et la mise en place de la procédure a été réduit à 18. Ce nombre nous permettra d'obtenir des résultats significativement exploitables.

Raffinement : Le projet prévoit des procédures réalisées sous anesthésie générale conventionnelle avec contrôle de la douleur peropératoire. Le sacrifice après évaluation de la qualité de la cicatrisation sera effectué sans réveil pour ne pas engendrer de souffrances animales.

5118. Bien que les animaux modifient leur comportement individuel selon leurs multiples expériences de vie, de nombreuses études ont montré qu'il existe au niveau individuel des constances dans leur profil comportemental. Ces constances dans leurs réponses comportementales dans le temps et dans divers contextes conduisent à identifier des profils actuellement communément qualifiés de "personnalités animale", de "tempérament" ou de syndromes comportementaux.

Depuis plusieurs années, notre groupe de recherche étudie les mécanismes précoces et tardifs conduisant à l'émergence de ce phénomène et cherche à en évaluer la fonction adaptative. Nos intérêts concernent tout particulièrement l'intégration de ce phénomène dans la vie sociale de l'animal.

Nous orientons par ailleurs depuis quelques années une partie de nos activités de recherche sur les émotions. Tout en employant des critères comportementaux pour leur évaluation nous complétons ceux-ci par des mesures physiologiques. Nous cherchons tout particulièrement à améliorer et à valider la pertinence d'une méthode non-invasive d'évaluation des réponses autonomes des animaux: la thermographie infrarouge.

Associant l'expertise de notre équipe dans ces deux domaines de recherche complémentaires, ce projet vise à établir des relations entre les "traits de tempérament" et les profils émotionnels chez un petit rongeur (la souris domestique). Ces relations seront recherchées dans des contextes sociaux et non sociaux.

Des souris domestiques (*Mus musculus domesticus*), avec un haut niveau d'hétérogénéité génétique interindividuelle (animaux sauvages élevés dans le laboratoire depuis peu de générations), seront utilisées comme modèle animal.

Ces animaux seront suivis depuis leur naissance jusqu'à l'âge adulte. Des "tests de personnalité" visant à établir des constances dans leur profil comportemental au travers de divers contextes et à des âges différents (jeunes pubères et adultes) seront alors réalisés.

Auparavant, les réponses (cris ultrasonores et modifications thermiques) de ces individus lors d'une brève séparation de leur mère dans leur seconde semaine de vie auront été mesurées. Ces mesures serviront à relier l'amplitude du stress de ces jeunes à leur "tempérament" ultérieur.

A l'âge adulte, l'intérêt et la réponse thermique de ces individus pour des odeurs de congénères du sexe opposé seront évalués. Un lien pourra alors être établi entre les traits de "tempérament" des individus et leur motivation sexuelle.

Ce test sera reconduit mais en plaçant l'odeur de congénère dans un milieu anxiogène (objet nouveau placé au sol). Les individus les plus téméraires devraient alors rapidement se diriger vers cette odeur malgré la perturbation liée au nouvel objet (test de conflit motivationnel).

Les animaux seront également confrontés à un partenaire séparé par une grille. Ce dernier recevra alors un léger choc électrique au niveau des pattes. Nous prévoyons que l'état émotionnel de cet individu affectera le sujet testé de manière différente selon la "personnalité" de celui-ci (test de contagion émotionnelle).

Enfin, des procédures permettent d'évaluer au travers de la réponse comportementale des individus si ceux-ci sont "pessimistes" ou "optimistes" (biais cognitif) au travers d'apprentissage de 2 signaux environnementaux associés à des récompenses alimentaires (l'une importante, l'autre peu importante). Suivis par un test où le signal est ambigu, la réponse de l'animal est alors indicatrice de son biais cognitif. De telles procédures seront employées afin de relier ces traits aux traits de "tempérament" des individus.

Le nombre total d'animaux prévus pour cette étude est de 148 souris (124 mâles et 24 femelles). Un lot de 100 mâles est destiné à l'étude des traits de tempérament. Si ces études nécessitent un nombre conséquent d'individus afin de caractériser des différences interindividuelles de "tempérament". Ceux-ci seront employés pour des divers tests au cours de leur vie. Cette étude étant prévue pour s'étendre sur une période de 3 années, différentes cohortes d'animaux seront néanmoins utilisées pour certains tests (30 individus pour le test de conflit motivationnel, 40 individus pour le test de contagion émotionnelle, 30 individus pour le test de biais cognitif).

Les 48 autres souris (24 mâles et 24 femelles) seront d'une part utilisés pour valider le test de séparation précoce des jeunes de leur mère comme inducteur de réponses ultrasonores et thermiques (3 groupes de 16 individus (8 mâles - 8 femelles): contrôle, odeur de la mère, odeur d'un mâle); d'autre part ces animaux serviront à l'âge adulte de pourvoyeur d'odeur (femelles), et seront les congénères employés lors du test de contagion émotionnelle.

Cette étude comportementale nécessite que les animaux soient dans un bon état physiologique et psychologique. Les tests susceptibles de stresser les animaux sont choisis pour qu'ils n'induisent que des anxiétés modérées. Ces tests sont de courte durée (quelques minutes). Une vigilance sera portée sur les réponses anormales (panique) des animaux à ces situations anxiogènes et elles conduiront à une interruption immédiate de la procédure de test.

En fin d'étude, les animaux seront euthanasiés, par décapitation (pour les animaux suivis pour leur personnalité) afin de prélever des échantillons sanguins utilisés pour un dosage de corticostérone et de testostérone. Les autres animaux seront euthanasiés par asphyxie au CO₂.

5119. De nombreuses pathologies s'accompagnent d'une perte de masse musculaire (atrophie) soit de façon primaire, où le muscle est pathologique comme dans le cas des myopathies, ou secondaire, où la fonte musculaire est associée à une autre pathologie comme le cancer, le choc infectieux grave, l'accident vasculaire cérébral par exemple. Cette atrophie musculaire s'accompagne de façon quasi systématique d'une diminution de la force musculaire développée par le(s) muscle(s) atteint(s) et donc à une perte de fonction pouvant aller jusqu'à la perte de mobilité. L'évaluation de la force musculaire à l'aide d'un ergomètre permet d'obtenir une mesure pertinente de l'état général du muscle. Cette mesure indolore et peu invasive peut être répétée plusieurs fois sur l'animal anesthésié dont on souhaite faire un suivi longitudinal et assure un excellent complément aux analyses biologiques et histologiques.

Au sein de notre laboratoire nous étudions les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sont responsables tout ou partie de l'atrophie musculaire pathologique. Nous évaluons également des stratégies thérapeutiques visant à restaurer la fonction musculaire. Dans ce contexte, il nous est donc primordial de pouvoir mesurer la force musculaire que peut développer une souris que ce soit au cours du développement de la maladie ou pour évaluer le bénéfice d'une approche thérapeutique.

Nous avons récemment acquis un appareil de mesure de force (ergomètre) dédié à l'utilisation chez la souris. Cet appareil nous permet de faire des mesures de force musculaire chez l'animal anesthésié (mesure in vivo) ou sur muscle isolé (ex vivo et in vitro). Il nous est donc indispensable de passer par une étape de mise au point afin d'utiliser l'ergomètre selon des procédures fiables et reproductibles. Dans les cas de mesures ex vivo et in vitro, une approche chirurgicale fine du muscle est primordiale au maintien de son intégrité physiologique et donc à une mesure correcte des paramètres musculaires.

L'ergomètre que nous avons acquis fait référence au niveau international. L'existence de procédures expérimentales validées et publiées dans la littérature scientifique nous permettra de raffiner au maximum les expériences qui seront réalisées. Par définition la mesure d'une force musculaire implique de travailler sur un muscle entier, il est impossible de remplacer cette expérimentation par des expériences menées sur des cellules. S'agissant d'une mise au point, nous avons prévu d'utiliser 60 souris, réparties en 3 groupes de 20 souris sauvages pour la mise au point des 3 façons de mesurer la force musculaire : in vivo sur animal anesthésié, ex vivo et in vitro pour des animaux avec une anesthésie sans réveil. Cependant ce chiffre pourra être réduit car dès la mise au point effectuée le présent projet sera clos. Afin de valider notre technique nous utiliserons 9 souris porteuses d'une myopathie donc avec une force diminuée et 9 souris hypermusclée dont la force est augmentée. Trois souris seront utilisées par type de mesure in vivo, ex vivo et in vitro.

Au total un maximum de 78 souris est envisagé pour ce projet.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérés grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant/anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 2 à 4), dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

5120. La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neuro-dégénérative caractérisée par des troubles cognitifs et psycho-comportementaux entraînant une perte d'autonomie. Avec le vieillissement de la population, cette maladie représente un véritable enjeu scientifique, humain, social et économique. Faciliter le diagnostic de la maladie représente un enjeu de santé public majeur.

Dans des études antérieures, il a été montré que la souris P301S (modèle murin de la MA) présentait des altérations de la rétine dès l'âge de 2 mois avec l'apparition d'agrégats de protéine Tau, bien avant le début du déclin cognitif (6 mois). Cependant aucune étude démontrant une corrélation entre ces altérations et un déficit fonctionnel de la rétine n'a été réalisée à ce jour.

Le but de ce projet est donc de voir si nous pouvons corrélérer l'évolution de la MA au déficit fonctionnel de la rétine. Des études seront menées sur la souris P301S à 3, 6 et 9 mois. En plus des imageries du fond de l'œil et de la structure de la rétine, nous évaluerons l'acuité visuelle de ces animaux par des tests optocinétiques et la fonction rétinienne par des électrorétinogrammes.

Au total 380 souris seront analysées en incluant les contrôles.

Si l'étude est concluante, l'étude de la fonction rétinienne pourrait être aussi utilisée dans l'avenir pour le diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer mais également pour juger de l'efficacité de nouveaux traitements.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les conditions d'hébergement seront adaptées au modèle animal et des mesures antalgiques seront mises en œuvre. Le nombre d'animaux utilisé dans ce projet est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus.

5121. Cet enseignement a pour but d'initier les étudiants à l'expérimentation en cage à métabolisme pour évaluer les fonctions rénales avec des analyses statistiques sur ordinateur de données préalablement collectées. Plus particulièrement, les étudiants seront amenés à tester les effets d'un diurétique (le furosémide) utilisé couramment en expérimentation animale ainsi qu'en médecine humaine afin de diminuer le volume extracellulaire (chose souhaitable dans certaines maladies à œdèmes, l'hypertension ou l'insuffisance cardiaque). D'un point de vue pédagogique, le furosémide est adapté à une expérimentation courte parce que ses effets sont rapides.

La réalisation de ce projet nécessitera l'utilisation de 120 souris. Ce nombre, qui prend en compte les exigences réglementaires est incompressible car seules les souris nous permettront de réaliser cette expérimentation. Pour respecter la règle des « 3R », le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière attentive. Enfin, des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

5122. L'objectif de notre recherche est d'améliorer l'effet anti tumoral à long terme d'un anticorps pour soigner les patients atteints d'un cancer des globules blancs, le myélome, cancer pour lequel il n'existe pas de traitement permettant la guérison. A cette fin, nous avons donc développé différents anticorps contre une molécule, CD38, surexprimée par les cellules cancéreuses de myélome. Afin de choisir l'anticorps le plus efficace pour effectuer un essai clinique chez des patients atteints de myélome, nous devons d'abord évaluer lequel de ces anticorps montre la plus forte activité anti-tumorale à long terme chez des souris. La retombée principale attendue du travail est le développement d'un nouveau médicament (anticorps anti-CD38) pour traiter les patients ayant un myélome. Pour sélectionner un tel médicament, nous devons utiliser des souris exprimant la molécule CD38 humaine, cible des anticorps, et injectées avec des cellules cancéreuses CD38+. Nous allons étudier les capacités protectrices anti-tumorales induites par l'administration in vivo de ces anticorps en monothérapie et en combinaison avec des thérapies déjà utilisées dans les cancers du sang. Il n'existe pas de techniques alternatives in vitro qui permettent d'évaluer une protection anti-tumorale à long terme et l'apparition d'une mémoire immunitaire. Les animaux seront hébergés dans des portoirs ventilés et ne seront expérimentés qu'après une période de stabulation d'au moins une semaine après leur arrivée. Ils seront surveillés quotidiennement par les expérimentateurs et le personnel de l'animalerie pendant toute la durée de leur hébergement. Pour cette étude, 1100 animaux seront nécessaires. Afin d'assurer une validité statistique aux expériences et de respecter la règle des 3R (remplacement des animaux par des expériences in vitro, réduction du nombre d'animaux, raffinement ou amélioration des conditions de vie), un nombre maximum de 10 souris par groupe sera utilisé (≤ 5 souris/cage). En outre, chaque expérience ne sera répétée que deux fois. Le raffinement des conditions de vie sera marqué par i) un nombre limité d'animaux par cage ; ii) une surveillance quotidienne de l'état de santé ; iii) une nourriture et de l'eau *ad libitum*, iv) la mise en place d'un enrichissement du milieu (tunnels en carton, nids végétaux). Concernant la limitation des douleurs, souffrances et angoisses, un tableau d'analyse comportementale a été mis en place pour en permettre la prise en charge la plus précoce possible.

5123. Les troubles de la vision sont un problème de santé publique touchant un grand nombre de personnes. Selon l'OMS, en 2002, plus de 161 millions de personnes étaient atteintes de déficiences visuelles dont 15.5 millions de personnes en Europe et plus particulièrement les personnes âgées de plus de 50 ans. Avec le vieillissement de la population, le nombre de personnes atteintes de déficiences visuelles/cécité augmente. En Europe, ces déficiences visuelles sont principalement dues à des rétinopathies pigmentaires et à la DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge). Dans ces pathologies, ce sont les photorécepteurs de la rétine qui sont affectés par une dégénérescence. Depuis de nombreuses années, le développement de techniques tel que la prothèse rétinienne redonne l'espoir à ces patients de revoir un jour. Toutefois, cette technologie n'est pas accessible à des patients ayant perdu la vue suite à une rétinopathie diabétique (atteintes des vaisseaux de la rétine) ou à un glaucome (atteinte du nerf optique). C'est à eux que s'adresse principalement cette étude qui vise à restaurer la vision chez ce type de patients.

Dans ce projet, nous voulons étudier la possibilité d'utiliser l'optogénétique dans des aires visuelles cérébrales comme outil pour restaurer la vision à des patients présentant des déficits visuels. Cette stratégie se fait en deux étapes. La première consiste en la transfection de neurones par des vecteurs viraux qui permettent d'activer localement des neurones. Cette technique a déjà donné des résultats encourageants chez le rongeur et le primate au sein de différentes structures cérébrales mais aucune étude n'a été menée à ce jour à un niveau supérieur c'est-à-dire en administrant ces vecteurs au niveau du cortex visuel ou du corps géniculé latéral afin de pouvoir restaurer des propriétés visuelles. La seconde étape consiste en l'enregistrement des activités neuronales suite à une stimulation optogénétique grâce à l'imagerie optique fonctionnelle et des enregistrements électrophysiologiques unitaires.

Pour tester cette stratégie, nous injecterons des virus contenant un gène de protéine photosensible ou mécanosensible dans une aire choisie préalablement (V1 ou le corps genouillé latéral). L'efficacité du système sera évaluée par l'enregistrement de l'activité de neurones suite à des stimulations lumineuses ou mécaniques.

Si les résultats sont concluants, des essais pourront ensuite être menés chez le macaque puis chez l'Homme.

Au total 700 rats seront nécessaires à cette étude. Nous avons recours à ce modèle animal car il nous est nécessaire de disposer d'un système biologique dans son intégrité : de l'œil jusqu'au cerveau. De plus, nous disposons déjà d'une souche de rats (P23H) sur laquelle une dégénérescence des photorécepteurs est observée au bout de quelques semaines. Les rats contrôles seront issus de chaque groupe mais l'opsine y sera remplacée par une molécule insensible à la stimulation visuelle ou mécanique.

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

Nous prendrons soin de considérer la règle des 3R pour le bien-être des animaux :

- Réduire : Nous allons utiliser au maximum le principe des fenêtres chroniques afin de pouvoir réutiliser un même animal sur différents jours d'expérimentation. De plus, il nous sera possible de croiser les protocoles de nos animaux afin de limiter une fois de plus le nombre de rats nécessaires.

- Raffiner : Nous prendrons grand soin des anesthésies réalisées avec des tests à la douleur réguliers. De plus, une surveillance régulière sera effectuée auprès des animaux afin de s'assurer de leur bien-être constant. Les animaux sont hébergés dans des cages sur des portoirs ventilés, avec alimentation et eau illimitée, et avec un enrichissement du type bâton de bois et papier kraft.

- Remplacer : il nous est malheureusement impossible de remplacer l'animal car nous avons besoin d'un système biologique intègre : de l'œil jusqu'au cerveau. Cependant, des premiers essais in-vitro et ex-vivo ont déjà été réalisés pour les méthodes de restauration visuelles qui seront testées sur le rat de façon in-vivo.

5124. Le pancréas est un organe mixte à la fois impliqué dans la digestion et dans la régulation du métabolisme du glucose. L'adénocarcinome du pancréas (qui représente 80% des tumeurs pancréatiques) est une tumeur solide très agressive, souvent inopérable, représentant la 5ème cause de mortalité par cancer.

Ces tumeurs sont de pronostic sombre, avec une survie à 5 ans de moins de 5%, plus de la moitié des patients décédant moins d'un an après diagnostic.

A l'heure actuelle, le traitement de référence est la chimiothérapie à base de Gemcitabine mais son efficacité reste limitée et la caractérisation de nouvelles stratégies thérapeutiques contre ce cancer constitue donc un réel enjeu clinique majeur.

L'objectif de ce projet est de mettre en évidence in vivo les effets potentialisateurs d'un certain nombre de combinaisons d'anticorps thérapeutiques visant différentes voies de signalisation sur le traitement à la Gemcitabine pour les adénocarcinomes pancréatiques.

En effet, il a été montré que l'utilisation d'anticorps thérapeutiques en adjuvant du traitement à la Gemcitabine pouvait augmenter la survie globale sur des modèles murins.

Nous souhaitons à présent combiner des anticorps visant différentes voies de signalisations associés au traitement à la Gemcitabine afin d'essayer d'optimiser la réponse au traitement.

Les anticorps dont nous souhaitons déterminer les effets sur l'animal, ont déjà fait l'objet de travaux préalables in vitro sur plusieurs lignées cancéreuses, ainsi qu'in vivo. Ces études ont démontré les propriétés anti-tumorales adjuvantes de ces composés, leur attribuant donc un fort potentiel thérapeutique.

Ainsi, seule l'utilisation d'un modèle murin pertinent mimant la pathogénèse humaine nous permettra d'évaluer l'effet de ces différentes combinaisons de molécules.

Le modèle murin génétiquement modifié que nous avons choisi pour réaliser cette étude reproduit parfaitement la pathologie tumorale pancréatique humaine.

Il correspond à l'introduction de deux mutations géniques fréquemment retrouvées chez les patients.

A l'instar de ce qui est observé chez l'Homme, les lésions précancéreuses pancréatiques se développant chez les souris génétiquement modifiées sont microscopiques et asymptomatiques. Toutefois, une attention particulière sera apportée à l'éventuelle apparition de signes évocateurs de mal-être ou de souffrance et le cas échéant, les dispositions adéquates préalablement établies seront immédiatement mises en application.

Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Une définition précise des points limites et une surveillance des animaux permet de veiller à leur bien-être.

1040 animaux seront inclus dans ce projet au maximum.

5125. Le pancréas est un organe mixte à la fois impliqué dans la digestion et dans la régulation du métabolisme du glucose. L'adénocarcinome du pancréas (qui représente 80% des tumeurs pancréatiques) est une tumeur solide très agressive, souvent inopérable, représentant la 5ème cause de mortalité par cancer.

Ces tumeurs sont de pronostic sombre, avec une survie à 5 ans de moins de 5%, plus de la moitié des patients décédant moins de 6 mois après diagnostic.

A l'heure actuelle, le traitement de référence est la chimiothérapie à base de Gemcitabine mais son efficacité reste limitée et la caractérisation de nouvelles stratégies thérapeutiques contre ce cancer constitue donc un réel enjeu clinique majeur.

Afin de pouvoir étudier les mécanismes d'apparition de cette pathologie et ainsi tester de nouveaux raisonnements thérapeutiques innovants, il est nécessaire de disposer de modèles animaux pertinents mimant au plus près la pathologie humaine.

Le croisement de 2 lignées de souris possédant chacune une mutation fréquemment retrouvée chez les patients permet d'obtenir des souris développant spontanément une pathologie mimant parfaitement la pathologie humaine avec une grande reproductibilité. Ces souris présentant donc un phénotype dommageable (l'apparition spontanée de tumeurs pancréatiques), il est nécessaire de prendre des précautions particulières lors de leur génération et de leur entretien.

Le modèle murin génétiquement modifié décrit ici reproduit parfaitement la pathologie tumorale pancréatique humaine.

Il correspond à l'introduction de deux mutations géniques, fréquemment retrouvées chez les patients.

A l'instar de ce qui est observé chez l'Homme, les lésions précancéreuses pancréatiques se développant chez les souris génétiquement modifiées sont microscopiques et asymptomatiques. Toutefois, une attention particulière sera apportée à l'éventuelle apparition de signes évocateurs de mal-être ou de souffrance et le cas échéant, les dispositions adéquates préalablement établies seront immédiatement mises en application.

Le nombre d'animaux générés a été réduit au maximum et correspond au nombre d'animaux nécessaires pour les différents projets nécessitant ces animaux.

Nous envisageons de générer au maximum 50 animaux par an sur une période de 5 ans, soit un maximum de 250 animaux à des fins de prélèvement d'organes pour des études in vitro.

5126. L'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques, impose que les personnels exerçant les fonctions suivantes doivent en avoir acquis la compétence suite à une formation spécifique :

1° conception ou réalisation de procédures expérimentales ;

2° application de procédures expérimentales aux animaux ;

3° soins aux animaux ;

4° mise à mort des animaux.

Notre projet est donc éducatif et requis par la loi. Il consiste à former les personnels désignés au 1, 2 et 4 ci-dessus, à la pratique de procédures expérimentales faiblement invasives sur des souris.

Il s'agit d'initier ces personnels aux techniques suivantes :

- préhension, contention, manipulation adaptées aux différentes procédures de routine ;

- marquage individuel ;

- administration et prélèvements de routine ;

- anesthésie et asepsie ;

- mise à mort

Les travaux pratiques seront précédés de cours théoriques où des démonstrations sous forme de vidéos seront présentées et commentées, et les avantages et inconvénients de chaque méthode seront discutés.

De façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés pour ce projet, la compétence des personnels inscrits à la formation et ayant acquis les compétences décrites ci-dessus lors d'une expérience professionnelle antérieure sera évaluée ; les personnels jugés compétents seront exemptés de la formation à la pratique de procédures expérimentales faiblement invasives sur souris. De façon à prévenir toute douleur, souffrance et angoisse des animaux, la taille des groupes de formation sera réduite à 4 personnes par formateur et toutes les procédures exceptée la prise de sang seront réalisées après anesthésie des animaux.

Il y aura 2 sessions de formation par an. Chaque session de formation impliquera l'utilisation de 75 souris maximum, lesquelles seront des animaux réutilisés de projets d'élevage autorisés dans l'établissement. Le projet utilisera un maximum de 750 souris sur 5 ans. Les gestes pratiqués sur les animaux seront de gravité légère.

De façon à garantir la qualité de la formation, les formateurs seront des personnels choisis pour leur compétence dans la réalisation technique de chacune des procédures et leurs aptitudes pédagogiques, et un formateur encadrera au maximum 4 personnes.

5127. La prise en charge des douleurs inflammatoires chroniques constitue un défi majeur. Les molécules antalgiques utilisées à l'heure actuelle présentent des effets indésirables trop importants pour être utilisés de façon chronique (c'est le cas de la morphine) ou ne sont pas suffisamment efficaces (c'est le cas des antidépresseurs et antiépileptiques).

L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets antalgiques de candidats-médicaments dans un modèle de douleur inflammatoire chronique chez le rat.

Ce type particulier de douleur sera modélisé par administration aigue d'un facteur de neurotrophique directement au niveau de la moelle épinière (intratéchale).

Un test de référence de douleur mécanique sera utilisé pour mesurer les seuils douloureux chez les animaux et évaluer l'effet antalgique d'une molécule de référence et de l'élément d'essai.

Les animaux développeront une hyperalgésie (seuil de tolérance à la douleur diminué par rapport au seuil avant injection).

Une très faible proportion d'animaux peut ne pas développer d'hyperalgésie, ces animaux ne seront alors pas inclus dans l'étude.

Le seuil de douleur sera mesuré après traitement avec une molécule de référence positive (morphine et/ou gabapentine) ou avec l'élément d'essai. Pour cela, les animaux seront répartis en 5 groupes (dose 1, dose 2, dose 3, produit de référence, contrôle).

Pour ce projet, le nombre total d'animaux est estimé à 750 rats (sur 5 ans).

Ce projet est conçu en accord avec le principe des 3Rs:

Remplacement : dans le cadre du développement de certains nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets analgésiques. Or, avant toute administration à

l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'un candidat médicament. A ce jour, le rat est l'espèce la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

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

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

- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à des procédures peu invasives réalisées sous anesthésie locale
- la surveillance renforcée des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

5128. Les anomalies génétiques sont à l'origine de nombreuses maladies oculaires entraînant une dégénérescence de différents types cellulaires constituant la rétine.

Il a été montré qu'il était possible de prévenir cette dégénérescence par administration à l'aide de vecteurs viraux de protéines neuroprotectrices à l'œil.

Afin de sécuriser au maximum le parcours de soins du patient, nous proposons dans ce projet de valider la possibilité de délivrer ces protéines neuroprotectrices à l'aide de particules non virales, plus précisément par utilisation de transporteurs lipidiques ou polymériques.

Les nanoparticules formées in vitro entre ces transporteurs et les ARNm des protéines d'intérêt seront administrés dans l'œil de souris sauvages C57BL6 par injection intravitréenne (cette lignée est utilisée depuis de très nombreuses années pour l'étude du système nerveux et en particulier du système visuel). En atteignant l'intérieur des cellules de la rétine, les ARNm seront alors traduits en la protéine d'intérêt. Pour nos tests, nous utiliserons l'ARNm d'une protéine reportrice couramment utilisée par la communauté scientifique : la GFP (green fluorescent protein).

L'évaluation de l'expression des protéines au niveau de la rétine s'effectuera in vitro après euthanasie de l'animal. Ces résultats seront comparés à ceux d'une administration « classique » par utilisation de vecteurs viraux.

Au total, un maximum de 130 souris (C57BL6) adultes sera nécessaire à cette étude en incluant les contrôles. Nous avons choisi la souris comme modèle animal, car la structure de son œil est proche de celui de l'Homme. De plus, la souris a déjà été utilisée dans de nombreuses études (par la communauté scientifique) sur lesquelles nous pouvons nous reposer.

Toutes les études préliminaires sur explants in vitro ont déjà été réalisées. A ce stade, le passage à l'animal est indispensable pour vérifier la bonne expression des protéines administrées au niveau des cellules de la rétine. Les groupes d'animaux ont été réduits au maximum pour obtenir des résultats permettant de valider l'objectif scientifique de ce projet. Les animaux seront hébergés dans des cages de stabulation avec enrichissement (tunnel, carré de cellulose, bâton à ronger). Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries et les mesures d'antalgie sont mises en œuvre.

5129. Les maladies métaboliques comme le diabète de type-2 et l'obésité sont généralement associées à une accumulation excessive de lipides dans le foie. Cette accumulation anormale de lipides intra-hépatique va induire un stress inflammatoire provoquant le développement d'une fibrose hépatique. Cette fibrose va alors provoquer un dérèglement des fonctions hépatiques allant de la cirrhose au cancer du foie. Il est bien établi aujourd'hui que les macrophages hépatiques (cellules de Kupffer) jouent un rôle important dans la mise en place de cette fibrose. Cependant les acteurs moléculaires sont moins bien connus. Récemment nous avons identifié deux protéines GPS2 (G-protein pathway suppressor 2) et IRF5 (Interferon Regulatory Factor 5) comme des modulateurs de l'activation des macrophages dans le contexte du diabète et de l'obésité. Leurs rôles dans l'inflammation hépatique restent cependant énigmatiques. Dans ce projet, nous souhaitons démontrer le rôle de ces 2 protéines dans les processus cellulaires impliqués dans le développement de la fibrose hépatique. Pour ceci, nous allons appliquer différents modèles connus pour induire une fibrose hépatique (régimes, traitement pharmacologique et chirurgie) dans les souris WT et les souris GPS2 et IRF5 invalidées spécifiquement dans les macrophages. Des données préliminaires (non-publiées) chez l'homme démontrent une dérégulation de l'action de GPS2 et IRF5, confortant fortement notre hypothèse de travail.

La stratégie des 3R sera respectée. Les animaux sont acclimatés à l'animalerie et sont habitués à être manipulés avec un suivi de poids hebdomadaire qui permet, en plus des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux. Les mesures d'antalgie seront prises le cas échéant.

Nombre d'animaux utilisés : 480 souris (20 souris par groupe et par conditions expérimentales)

Protocole expérimental: étude du phénotype métabolique, inflammatoire des souris invalidées pour IRF5 et GPS2 spécifiquement au niveau des macrophages (IRF5 et GPS2 MacKO) soumis à un régime normal, un régime riche en graisse, régime déficient en méthionine et choline, suite à une ligature des voies biliaires et un traitement pharmacologique pro-fibrosant.

5130. La résistance à l'insuline est un trait caractéristique du diabète de type 2 (DT2) et joue un rôle majeur dans la pathogénèse de la maladie. Dans des situations de pléthore lipidique chronique (obésité), les acides gras s'accumulent dans les muscles où une partie est métabolisée sous forme de dérivés lipidiques spécifiques. Le but de ce projet est de mettre en évidence la fonction de certains de ces dérivés lipidiques dans l'établissement de l'insulinorésistance et du diabète de type 2. En augmentant génétiquement spécifiquement au niveau musculaire la voie de biosynthèse de certains lipides, nous espérons mettre en évidence leurs propriétés protectrices sur la sensibilité à l'insuline musculaire. Les muscles squelettiques sont considérés comme la cible

principale dans l'apparition de la résistance à l'insuline car ils constituent 40% de la masse du corps humain et sont quantitativement les plus gros utilisateurs de glucose en réponse à l'insuline. En conséquence, et au contraire d'une étude in vitro sur des cellules musculaires isolées, travailler sur l'animal entier nous permettra d'évaluer les conséquences de perturbations métaboliques observées au niveau musculaire sur l'animal entier. Nous avons choisi d'utiliser la souris comme modèle métabolique intégré. Ce modèle est le seul disponible actuellement et permet de reproduire facilement des situations physiopathologiques normalement observées chez l'homme.

Ce projet prévoit d'utiliser 168 souris. Cet effectif est nécessaire pour obtenir des résultats homogènes lors de tests métaboliques pratiqués dans ce projet. Il est à noter que nous réutilisons les mêmes souris pour plusieurs procédures, réduisant ainsi le nombre total d'animaux sacrifiés.

Le bien-être des animaux est au cœur de nos préoccupations. Ainsi, des protocoles d'enrichissement de l'environnement de l'animal seront mis en place avec notamment la présence de nids végétaux. Notre projet comportant l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés, une attention très particulière sera portée à ces animaux afin de déceler tout comportement anormal. Enfin, le sacrifice des animaux sera réalisé sur des animaux préalablement anesthésiés et les mesures antalgiques seront prises.

5131. Le but de ces expériences est non seulement de générer les lignes transgéniques indiquées mais de mettre au point cette technique et développer ce savoir-faire dans la plateforme de transgénèse de l'ICM, qui sera de grande utilité pour toutes les équipes qui modélisent chez la souris les conséquences des mutations trouvées chez des patients des maladies du système nerveux. Pour notre projet, nous étudions le rôle de Chd8 (muté dans certain enfant autistes) et Tns3 dans la différenciation des oligodendrocytes. Nos résultats non publiés montrent une forte expression dans les oligodendrocytes pendant leur différenciation et leur expression dans des lésions remyélinisantes dans les tissus des malades avec la Sclérose en Plaques.

Le but est de créer une lignée transgénique murine avec un tag (V5) dans la protéine Tns3 et des allèles Tns3 et Chd8 modifiés avec des sites LoxP pour générer un knock-out conditionnelles,

La lignée Tns3-V5 permettra de trouver les protéines qui interagissent avec Tns3 dans le noyau des cellules oligodendrogiales par protéomique

Les lignées Tns3flox et Chd8flox o permettrons d'invalider ces gènes spécifiquement dans les oligodendrocytes avec un control temporal de cette invalidation.

Ces lignées transgéniques nous permettront de démontrer l'importance de ces gènes dans la différenciation des oligodendrocytes et leur relevance dans la pathologie telle que la Sclérose en Plaques (qui affecte ~80,000 personnes en France), et dans l'avenir proche développer des thérapies pour réparer les lésions chez ces patients.

Nous utiliserons sur 2 ans un total de 110 souris pour la durée du projet. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de créer notre lignée transgénique ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte le bien-être des animaux. Tous les animaux sont hébergés en portoirs ventilés par cage de 5 individus pour les souris et les milieux sont enrichis avec des nids de coton. La température et l'hygrométrie sont contrôlées est tout est mis en œuvre pour réduire au minimum la douleur infligée ; 3) remplacement, la création d'une lignée transgénique murine est une technique de pointe qui est impossible à réaliser in vitro ou sur une autre espèce.

La lignée sera sans phénotype dommageable car le peptide V5 n'affecte pas l'activité de la protéine Tns3, et les allèles Tns3flox et Chd8flox doivent avoir une expression normale des protéines Tns3 et Chd8, respectivement.

5132. La réparation des fractures ou défauts osseux représente un défi majeur de santé publique : chez les personnes âgées, la survenue d'une fracture réduirait jusqu'à 6 ans l'espérance de vie. En France, les dépenses hospitalières annuelles liées à l'ostéoporose féminine (essentiellement les fractures du col du fémur) sont estimées à 600 millions d'euros et celles liées à l'ostéoporose masculine à 200 millions d'euros. Les grandes pertes osseuses résultent en des défauts de consolidation responsables de soins prolongés et de séquelles invalidantes. Par ailleurs, chez les sportifs, lors d'une blessure osseuse, la convalescence entraîne une baisse de performance et de compétitivité sur la saison. L'os est un tissu dynamique qui se remodèle en fonction des contraintes appliquées. L'exercice physique est donc nécessaire au renforcement osseux, comme pour le muscle. Par exemple, il augmente la densité osseuse chez les femmes ostéoporotiques. Toutefois, tous les types d'exercice ne sont pas équivalents. Certaines études suggèrent que les impacts répétés ou le déplacement de charges lourdes seraient les plus favorables au renforcement osseux alors que l'effet des exercices d'endurance serait limité. Ainsi, les effets locaux de l'exercice sur le tissu osseux incluant les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse et les effets de l'exercice sur la réparation osseuse sont encore mal compris ou inconnus. L'exercice physique ayant des effets systémiques, son étude sur les propriétés de l'os et les biomarqueurs du remodelage osseux ne peut être envisagée in-vitro, d'où la nécessité d'une étude chez l'animal.

Les objectifs de ce projet sont :

1- de caractériser et d'expliquer chez le Rat les effets de différents modèles d'exercice physique sur l'os à l'échelle d'organe, c'est-à-dire sur ses propriétés structurales, mécaniques et biologiques, ainsi qu'à l'échelle locale, notamment cellulaire, c'est-à-dire sur l'ostéocyte (cellule du tissu osseux agissant comme un mécanorécepteur et permettant de réguler l'activité de synthèse de l'os), sa matrice environnante et sur les cellules souches mésenchymateuses (cellules multipotentes ayant la capacité de proliférer et de se différencier en différentes lignées cellulaires incluant les ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes) de la moelle osseuse.

Pour cette étude, seront nécessaires au total 96 rats Wistar, répartis en 4 groupes de 24 animaux, divisé chacun en 2 sous-groupes de 12 : 1 groupe contrôle et 3 groupes d'exercice physique sur tapis roulant, composés de rats au même stade de maturité (jeunes adultes) et de même sexe à raison de 1 séance de 1 heure par jour, 5 jours par semaine pendant 10 semaines.

Les 3 groupes d'exercice ont été choisis en raison de l'absence de consensus sur les bénéfices pour le métabolisme osseux.

- groupe course modérée d'intensité constante (Groupe CC)
- groupe course par intervalles de haute intensité (alternance course rapide et course modérée, Groupe CI)
- groupe course mixte (alternant course continue ou course par intervalle de haute intensité en fonction des jours, Groupe CM).
- groupe de rats sédentaires (groupe CTRL) de mêmes sexe et âge permettant de contrôler les effets de l'exercice.

Le premier sous-groupe de 12 rats pour chaque groupe de 24 animaux concernera l'étude des effets de l'exercice donné sur le tissu osseux et les cellules souches, le second aura un défaut osseux de taille non critique (qui peut se réparer seul) créé pour l'étude des effets du conditionnement par l'exercice physique sur la réparation d'un défaut osseux.

2- d'identifier, à l'aide d'un modèle de défaut osseux de taille non critique, lequel de ces modèles de conditionnement par l'exercice serait le plus favorable à la cicatrisation d'un défaut osseux, si celui-ci devait se produire. Le défaut osseux de taille non critique sera créé sous anesthésie générale par une technique peu invasive impliquant le forage du condyle fémoral (partie distale du fémur) par une petite incision cutanée.

In vivo :

L'intensité et l'efficacité de l'entraînement seront déterminées par la mesure de la vitesse maximale aérobie (vitesse au-delà de laquelle le rat ne pourra fournir d'effort supplémentaire, sans pour autant entraîner l'épuisement).

L'évolution de la composition corporelle (masses maigre et grasse), de la microarchitecture osseuse (à la fois pour le tissu osseux objectif 1 et pour le tissu de cicatrisation osseuse objectif 2) sera évaluée en micro-scanner. Les biomarqueurs sanguins du métabolisme osseux, des facteurs de croissance et de l'état inflammatoire systémique seront également dosés. Les acquisitions au microscanner et les prises de sang seront réalisées pour les 4 groupes de rats dans le même temps sous anesthésie gazeuse.

L'absence de souffrance (diminution de l'appétit, de l'activité, boiterie...) sera contrôlée par une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude et évaluée grâce à un tableau de score fixant des points limites adaptés au projet. En cas d'inconfort ou de douleur, une médication adaptée sera apportée. Si celle-ci s'avère inefficace, l'animal sera euthanasié.

Les échantillons osseux seront prélevés post mortem et les propriétés structurales (microscanner, histochimie, marquages aux tétracyclines) et biomécaniques (nano-indentation) de l'os ou du tissu de cicatrisation osseuse étudiées. Les caractéristiques cellulaires à l'échelle de l'ostéocyte et de sa matrice (Imagerie grands instruments) seront déterminées. Des prélèvements de moelle osseuse seront effectués afin d'analyser la viabilité des cellules souches mésenchymateuses, leur capacité de différenciation ainsi que les facteurs de croissance qu'elles sécrètent.

Afin de réduire le nombre d'animaux, nous utiliserons un même os pour plusieurs méthodes de caractérisation (biologiques, mécaniques et imagerie multimodale).

Cette étude permettra de mieux comprendre l'impact de l'exercice sur les propriétés structurales, mécaniques et biochimiques du tissu osseux, et sur la viabilité et les propriétés de différenciations des cellules souches, par l'obtention d'informations fondamentales méconnues aujourd'hui.

5133. La maîtrise du moment de l'ovulation permet d'optimiser l'insémination des poulinières et représente un intérêt économique important pour les éleveurs. Notre projet a pour objectif d'étudier la pharmacocinétique du Nerve Growth Factor beta (β -NGF) qui vient d'être identifié comme le facteur d'induction d'ovulation (OIF) chez l'alpaga (espèce à ovulation provoquée). Chez la jument, le contrôle hormonal de l'ovulation fait appel à des mécanismes différents de ceux connus chez d'autres mammifères comme la brebis. En particulier, on n'observe pas de pic de LH (Luteinizing Hormone) avant l'ovulation, mais une augmentation de la sécrétion de GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone). Notre hypothèse est que le β -NGF pourrait être un élément impliqué dans l'augmentation de l'activité des neurones à GnRH. Par ailleurs, le β -NGF est connu pour avoir des récepteurs au niveau de l'hypothalamus, zone du cerveau impliquée dans le contrôle de la reproduction, et au niveau des follicules ovariens. Notre objectif est de connaître la pharmacocinétique du β NGF administré par voie intra-veineuse, intra-musculaire et sous-cutanée afin de connaître sa biodisponibilité et de déterminer un schéma posologique.

Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales (paille et foin de qualité, soins quotidiens) et nous choisirons des animaux sociables, habitués aux manipulations. La procédure de cathétérisme intra veineux est réalisée sous anesthésie locale.

Notre protocole est en accord avec la règle des 3R :

- "Remplacer", toute la partie pharmacologie se fait in vitro sur un modèle de culture cellulaires et sur des coupes d'hypothalamus (cerveau) obtenues post-mortem (abattoir commercial).

- "Réduire" :

* se limiter aux seules expériences indispensables, ce qui est le cas ici puisque nous voulons décrire la pharmacocinétique du β NGF dans l'espèce équine et qu'il n'existe pas de données bibliographiques,

* de ne pas faire de répétitions inutiles et de rédiger un protocole expérimental avant l'expérimentation, ce qui est aussi le cas ici puisque nous avons rédigé un plan expérimental en carré latin qui permet de limiter les animaux (6 ponettes) et de s'affranchir de variables aléatoires.

- "Raffiner": optimiser l'expérimentation afin de réduire ou supprimer l'inconfort de l'animal, et obtenir plus d'informations à partir de l'expérimentation. Dans notre protocole, nous avons limité l'expérimentation animale aux seules expérimentations qui le nécessitent, les protocoles ont été établis à l'avance afin de limiter le nombre d'animaux et le temps d'expérimentation, les animaux seront habitués aux locaux avant le début de l'expérimentation, placés avec leur congénères habituels dans un grand boxe paillé, eau et foin *ad libitum*. Un suivi comportemental de l'inconfort par les mimiques faciales sera mis en place.

5134. La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative fréquente en France ne bénéficiant pas de traitement curatif à l'heure actuelle. Cette pathologie fait partie d'un ensemble de maladies dont l'atrophie multi-systématisée fait également partie. Ces maladies se caractérisent par la présence, dans le cerveau des malades, d'agrégats d'alpha-synucléine, une protéine du système nerveux dont le rôle est pour le moment peu connu. Nous proposons dans ce projet de tester une stratégie d'inhibition de l'agrégation de l'alpha-synucléine pour freiner l'évolution de cette maladie, dans un modèle de maladie de Parkinson, chez la souris. Cette stratégie d'inhibition a déjà permis de réduire l'accumulation de l'alpha-synucléine dans un modèle de maladie de Parkinson qui ne développe pas de symptomatologie, la souris génétiquement modifiée D. Nous souhaitons maintenant tester cette stratégie avec des virus différents, non pathogènes et génétiquement modifiés, dans un autre modèle de maladie de Parkinson qui a la particularité de développer des troubles moteurs sévères, la souris M83. Ces symptômes sont associés à l'agrégation de l'alpha-synucléine, dans les régions postérieures du cerveau et la moelle épinière. Un effet bénéfique de cette stratégie pourrait se manifester par un éventuel retard dans l'apparition de la maladie de ces souris. Ce projet a déjà fait l'objet d'une précédente demande d'autorisation de projet. Les expérimentations qui ont été réalisées suggèrent que cette stratégie n'a pas eu d'effet, ou trop peu d'effet, sur le développement de la maladie de la souris M83 pour en observer un impact sur l'apparition des symptômes et les niveaux d'alpha-synucléine pathologique. Cependant, nous ne connaissons pas les effets que pourraient avoir l'inoculation d'une dose plus élevée de virus sur le développement de la maladie. Ainsi, lors de nos prochaines expérimentations, nous inoculerons ces virus à une dose supérieure chez la souris M83 et, en guise de contrôle et pour vérifier l'efficacité de nos virus dans un système dans lequel cette stratégie thérapeutique a déjà fonctionné, nous inoculerons ces virus chez la souris D. Au total, 170 souris seront utilisées pour la réalisation de ce projet, sur une durée de 5 ans. Ce nombre a été réduit au maximum pour nous permettre d'obtenir des résultats statistiquement fiables. Toutes les souris de ces expérimentations sont élevées dans un environnement enrichi et feront l'objet d'un suivi clinique individuel, qui sera particulièrement soutenu pour la lignée M83, afin de déceler la moindre apparition de symptômes et d'éviter toute souffrance chez l'animal. A l'apparition des premiers signes, l'animal est déclaré malade et est euthanasié. Les analyses biochimiques et immunohistochimiques accompagnées des données de survie, dans le cas des expérimentations chez la souris M83, permettront d'évaluer l'efficacité de notre virus génétiquement modifié dans sa lutte contre le développement de la maladie chez les souris M83 et D.

5135. L'ataxie de Friedreich (AF) est la forme la plus répandue des ataxies héréditaires (1/40000), elle se manifeste par une diminution progressive de la coordination motrice et des troubles de l'équilibre associés à une cardiomyopathie hypertrophique. Les tissus les plus affectés sont le système nerveux ainsi que le muscle cardiaque. La pathologie débute au niveau des ganglions dorso rachidiens (DRG) où se situent les gros neurones sensitifs qui dégèrent chez les patients évoluant en une dégénérescence des faisceaux spino-cérébelleux, qui partent du DRG et remontent vers le cerveau. Les patients développent de plus une atrophie d'un noyau cérébelleux profond. Le gène responsable de la pathologie code pour la frataxine, une protéine mitochondriale impliquée dans la biosynthèse des protéines à centre fer-soufre. A ce jour, aucun traitement n'est disponible pour l'AF. Nous avons généré dans le laboratoire des modèles murins de la pathologie qui reproduisent notamment les symptômes neurologiques associés à l'AF. Ces souris constituent un bon modèle pour tester des approches thérapeutiques de la pathologie mais le modèle reste néanmoins imparfait car les souris ont une déficience totale en frataxine dans les cellules d'intérêt qui n'est pas retrouvée chez les patients qui présentent des niveaux résiduels de protéine. L'objectif de ce projet est de caractériser un modèle de souris dans notre laboratoire exprimant des niveaux résiduels de frataxine et de valider notre approche thérapeutique dans ce modèle afin de rendre plus robuste notre étude préclinique.

Notre laboratoire a d'ores et déjà démontré la faisabilité et l'efficacité d'une approche de thérapie génique pour cibler l'atteinte neuronale de l'AF dans un autre modèle murin de la pathologie.

Le but de l'expérience est de déterminer si l'expression de la frataxine humaine dans les tissus affectés à l'aide d'un vecteur viral permet de prévenir et/ ou de corriger le phénotype des souris dans le système nerveux central et principalement dans les DRG affectés en premier chez les patients. Notre projet se divisera en différentes phases, tout d'abord la caractérisation du modèle. Enfin, la deuxième phase du projet permettra d'évaluer la prévention de l'apparition des symptômes neurologiques associés à l'AF dans notre modèle. Si nos résultats sont encourageants, la troisième phase consistera à l'évaluation de la correction du phénotype dans notre modèle. Un nombre total de 60 souris sauvages et 90 souris mutantes sera utilisées. Cet effectif correspond au nombre d'animaux nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique suffisante. En parallèle de nos études chez la souris, nous réaliserons des cultures primaires de neurones afin d'étudier les voies moléculaires et de réduire le nombre d'animaux utilisés. Enfin, un soin particulier sera apporté aux animaux et dès les premiers signes d'ataxie de la nourriture gélatinée sera mise à disposition dans la cage.

Le but ultime du projet est de trouver une thérapie efficace pour l'AF afin d'améliorer la vie des patients et si possible de stopper ou au moins ralentir la progression de la maladie.

5136. Parmi les différents composants tissulaires, les lipides font partie des déterminants majeurs de la qualité globale des espèces d'intérêt agronomique. Leur teneur, leur composition et leur répartition dans les différents compartiments corporels, sont autant de paramètres qui affectent la qualité finale du produit. Ceci est d'autant plus vrai chez le canard à foie gras. Identifier des biomarqueurs de l'aptitude à la production de foie gras chez le canard permettrait de sélectionner les animaux les plus adaptés au gavage et de limiter le temps de gavage. Les adipocytokines sont des molécules produites et sécrétées principalement par le tissu adipeux chez les mammifères. Elles sont corrélées à l'indice de masse corporelle et impliquées dans la régulation de l'engraissement et de la prise alimentaire. Depuis la découverte de la leptine, de nombreuses autres adipocytokines ont été décrites chez l'homme et les rongeurs. Trois d'entre elles, l'adiponectine, la visfatine et la chémérine méritent d'être étudiées chez le

canard. La visfatine pourrait être impliquée dans le développement du gras intra et intermusculaire. L'adiponectine est différenciellement exprimée dans le tissu adipeux de poulet de lignées grasse et maigre. Chez l'homme, la concentration plasmatique de la chémérine et son expression hépatique sont augmentées dans le cas d'un engraissement hépatique non lié à la prise d'alcool. A ce jour, aucun dosage plasmatique de ces trois adipocytokines n'a été réalisé chez le canard.

Les objectifs du projet sont de déterminer si ces 3 molécules sont de bons indicateurs de l'aptitude à la production de foie gras chez le canard. Notre stratégie consistera à analyser aux niveaux plasmatique et tissulaire ces trois molécules et leurs récepteurs tissulaires respectifs. Les modèles seront les canards de Barbarie et Pékin dont les aptitudes à l'engraissement hépatique et périphérique diffèrent. Les mesures seront réalisées sur des échantillons de sang prélevés en cours de gavage et des échantillons de tissus prélevés sur 12 canards par espèce abattus en début, milieu et fin de gavage. Remplacement : compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico. Réduction : le nombre d'animaux mis en élevage puis gavage (50 par espèce) prend en compte les besoins expérimentaux, la mortalité éventuelle et la variabilité de réponse au gavage. Raffinement : les canards seront élevés en conditions standards et feront l'objet d'une surveillance quotidienne. Toute manifestation de symptômes comportementaux persistants définis par un point limite entraînera le retrait de l'animal de l'expérimentation.

5137. Une transition nutritionnelle s'est opérée dans les pays industrialisés ces 50 dernières années, avec une consommation plus élevée d'aliments raffinés riches en graisses saturées et en sucres rapides, laquelle joue un rôle central dans l'épidémie d'obésité et de maladies chroniques associées.

Ce projet vise à étudier les effets potentiellement préventifs d'un extrait de polyphénols, obtenu à partir de coque de cacao, sur les dysfonctionnements métaboliques provoqués par des régimes obésogènes riches en graisses. Les polyphénols que nous testerons seront extraits en utilisant une méthode respectueuse de l'environnement. Le but de cette recherche est :

a) de déterminer si ces polyphénols permettent de limiter les dysfonctionnements métaboliques associés aux régimes obésogènes tels que l'accumulation de graisse dans le foie et l'apparition du diabète,

b) de déterminer par quels mécanismes s'exercent les effets préventifs de ces polyphénols. Ainsi, ces travaux doivent permettre de mieux comprendre comment intervient l'effet protecteur des polyphénols de la coque de cacao dans les déséquilibres nutritionnels. Nous avons choisi pour cette étude le modèle du rat car il présente des symptômes similaires à ceux qui définissent le syndrome métabolique chez l'Homme. Nous déterminerons chez 32 rats Wistar mâles pesant environ 200 g (4 lots de 8) et nourris pendant 3 mois avec un régime obésogène (35 % lipides) contenant ou non l'extrait polyphénolique (2 g de polyphénols totaux/kg de régime) ou le solvant naturel seul (NADES):

a) si ces extraits polyphénoliques dans le NADES permettent de limiter les désordres métaboliques associés aux régimes obésogènes (stéatose hépatique, insulino-résistance), comme cela a été montré pour de nombreux polyphénols extraits à l'aide de solvants, et l'innocuité du NADES ;

b) si les effets potentiellement bénéfiques de ces extraits passent par une amélioration de la fonction des mitochondries, les centrales énergétiques des cellules,

c) si la teneur en lipides mitochondriaux, en particulier le cardiolipide, un phospholipide important et spécifique de la mitochondrie, est modulée par ces extraits polyphénoliques.

Les animaux seront hébergés par 4. Nous ajouterons des bâtonnets de peuplier, à la fois pour l'enrichissement et pour éviter les problèmes de malocclusion à cause de la tendreté de la nourriture riche en graisse. Nous effectuerons une surveillance quotidienne y compris les week-ends. Les animaux subiront la procédure 1 (régime riche en graisses) puis au bout de 3 mois la procédure 2 (test OGTT de tolérance au glucose).

Ces travaux permettront de mieux comprendre comment intervient l'effet protecteur de bioactifs végétaux, les polyphénols de la coque de cacao, dans les déséquilibres nutritionnels et leurs conséquences. Cette proposition se place dans le contexte de la valorisation des agro-ressources, de la chimie verte et de la nutrition préventive.

5138. L'objectif de cette étude est d'évaluer in vivo chez la souris, le potentiel de minéralisation induit par un matériau à base phospho-calcique (brushite) dans le cadre du coiffage pulpaire direct.

Ce coiffage pulpaire par un tel matériau est couramment réalisé par le chirurgien-dentiste suite à l'exposition pulpaire suite à un traumatisme dentaire ou au curetage d'une lésion carieuse profonde. Cette méthode de coiffage présente l'intérêt majeur de préserver le tissu pulpaire interne de la dent, voire engager sa régénération in situ, dans le canal.

Afin de respecter au mieux la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner), nos études préliminaires ont été réalisées in vitro (remplacer) et elles ont permis de montrer l'aptitude biomimétique de la brushite.

Nos investigations in vitro ont donc montré une capacité de ce matériau à stimuler la minéralisation. La poursuite de ce travail nécessite de tester ce matériau en conditions physiologiques. Ces investigations imposent une expérimentation animale afin d'évaluer dans le cadre du coiffage pulpaire direct, la réponse pulpaire et la formation d'un pont dentinaire ou l'aptitude de ce matériau à induire une barrière de protection minéralisée.

Le modèle murin représente le modèle le plus adapté pour réaliser des coiffages pulpaires directs. La molaire de souris partage en effet des similarités morphologiques et des conditions analogues de vascularisation et d'innervation avec les molaires humaines.

Afin de respecter au mieux la règle des 3R, la molaire contralatérale gauche servira de témoin afin de réduire le nombre des animaux.

Dans le but d'améliorer la procédure expérimentale (raffinement), pour anticiper l'apparition de douleurs post opératoires possibles après ce type de traitement, l'utilisation d'antalgique sera prévue. Cette étude portera sur 18 souris. Deux stades

différents de minéralisation seront étudiés : 5 semaines (initiation de la minéralisation) et 11 semaines (minéralisation tardive) après chirurgie. Pour chacun de ces stades, 3 groupes de 3 souris seront nécessaires à l'étude immuno-histologique, en spectrophotométrie et en microscopie électronique des molaires. Il faut en effet un nombre de 3 souris pour avoir le matériel nécessaire à ces études et on réalise 3 groupes de 3 souris pour être statistiquement significatif pour palier à la variabilité génétique et expérimentale.

Si les résultats obtenus *in vivo* confirment les résultats *in vitro*, la Brushite pourra être utilisée dans le cadre de procédures endodontiques régénératives et de coiffage pulpaire direct. Ce matériau déjà commercialisé en tant que substitut osseux, pourra alors voir ses domaines d'indications étendues à des situations cliniques qui tendent à devenir un véritable problème de santé publique.

5139. Les maladies électriques cardiaques sont directement responsables de la mort subite cardiaque, de l'insuffisance cardiaque et de l'accident vasculaire cérébral. Ces maladies résultent d'une interaction complexe entre l'activation électrique myocardique et l'hétérogénéité structurelle. La stratégie diagnostique actuelle, basée sur des explorations séparées par électrocardiogramme et imagerie, est incapable de saisir de manière combinée ces deux aspects. Des améliorations dans le diagnostic personnalisé sont nécessaires car les thérapies curatives ou préventives existantes (ablation par cathéter, stimulation cardiaque multi site et défibrillateurs implantables) ne peuvent être offertes que si les patients sont correctement reconnus.

L'objectif du projet est de réaliser une avancée majeure dans la façon dont les maladies électriques cardiaques sont caractérisées, donc diagnostiquées et traitées, en développant une nouvelle modalité non invasive (tomographie électro-structurale), combinant l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la cartographie cardiaque non invasive (NIM).

La validation expérimentale de cette nouvelle modalité non invasive sera faite sur des modèles d'infarctus du myocarde chez le gros animal (mouton ou porc), avec des techniques *ex vivo* et *in vivo* bien éprouvées. Le choix de l'espèce se basera sur une étude préliminaire de faisabilité. Dans le cadre de ce projet 59 animaux sur 5 ans seront inclus. Selon les recommandations dans le préambule de la directive 2010/63/UE sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, la conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement est appliquée :

Le nombre d'animaux a été REDUIT au minimum tout en conservant la faisabilité du projet. En effet, on se limite aux seules expériences considérées comme absolument indispensables et selon un protocole expérimental bien défini et bien éprouvé, fournissant évidemment des résultats concluants. Ce qui évite de vérifier par d'autres essais portant sur de nouvelles séries d'animaux.

Le projet est réalisé en chronique entre 3 et 6 mois, ainsi leur bien-être sera particulièrement pris en compte lors de leur prise en charge, toutes les mesures de RAFFINEMENT seront mises en place (anesthésie, suivi des constantes, analgésie...).

Pour le principe de REMPLACEMENT, aucune méthode de substitution (modèle de cœur en matériau synthétique ou modèle numérique par exemple) n'est à l'heure actuelle disponible pour permettre de reproduire la physiologie (activités mécanique, électrique et physiologique) du cœur.

Ce projet aura un impact considérable sur la gestion personnalisée des troubles électriques cardiaques, avec des applications en diagnostic, dans la stratification du risque / sélection des patients et dans le guidage des thérapies par stimulation et ablation par cathéter.

5140. Les traitements conventionnels contre le cancer (radiothérapie, chimiothérapie et chirurgie) ont une action destructrice directe sur les cellules cancéreuses mais également sur les cellules saines. Par ailleurs, ils ne préviennent pas du risque de récurrences. Il apparaît donc essentiel de créer de nouveaux traitements anticancéreux. Depuis quelques années, les laboratoires travaillent sur la possibilité de créer des traitements contre le cancer faisant intervenir notre système immunitaire. En effet, le système immunitaire semble avoir une action contre les cellules tumorales comme l'atteste l'observation d'infiltration intra tumorale de cellules spécifiques du système immunitaire : les globules blancs, et ouvre ainsi la voie d'un possible vaccin anti-cancéreux pour le futur. Certains traitements anti-cancéreux dits "immunogènes" peuvent induire une mort immunogène *in vitro* en déclenchant une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique. Des données récentes de notre laboratoire ont permis d'identifier une nouvelle classe de traitements anticancéreux appelés inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) ayant la propriété *in vitro* d'être immunogène. Notre projet ici est d'étudier si une cette classe thérapeutique présente également cette propriété *in vivo*.

Dans un premier temps, nous réaliserons une étude pilote avec l'ITK connu pour être le plus immunogène d'après nos données: le crizotinib et nous évaluerons si ce traitement active le système immunitaire. Si tel est le cas, nous élargirons notre recherche à 3 autres ITKs les plus fortement immunogènes (parmi 26 ITKs testés): les taurtinib, foretinib et le ceritinib. Dans le cas contraire, nous ne poursuivrons pas le projet.

Tout sera mis en œuvre pour réaliser le projet éthiquement sans souffrance, sans douleur et sans angoisse pour les souris dans le respect de la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement).

Pour le remplacement: l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant entier, peut permettre d'étudier dans sa globalité, l'immunité anti-tumorale avec toutes les interactions nécessaires, impossibles à reproduire *in vitro* ou *ex vivo*. Les études de vaccination anti-tumorale *in vivo* sont actuellement la seule approche permettant d'évaluer les effets du système immunitaire de l'hôte sur le développement tumoral.

Pour la réduction: Le nombre de souris a été calculé rigoureusement et mathématiquement. Seul le nombre minimal de souris sera utilisé dans l'étude. Nous prévoyons que la réalisation de ce projet nécessitera un nombre estimé maximal de 840 souris si on teste les 4 ITKs (sinon 210 souris pour le crizotinib seul).

Pour le raffinement: Les souris seront hébergées dans une animalerie agréée. Les souris seront logées dans des cages grandes, propres, nettoyées et dans un environnement enrichi avec un renouvellement de l'air régulier, température et éclairage contrôlés afin de respecter le cycle physiologique des souris. De l'eau potable et de la nourriture fraîche seront toujours disponibles.

Le stress des animaux sera évalué quotidiennement par des échelles d'hétéroévaluation (relevant des signes indirects de stress: perte de poids, pelade, agressivité, prostration, hypotonie, agitation, les petits yeux, les oreilles en arrière...). Des mesures seront prises pour limiter le stress: plusieurs souris par cage pour un élevage social (mais maximum 5 par cage, exclusion des souris agressives), apport de coton et de maison en carton pour faire des aires de repos, apport nutritif (« Diet Gel »), animaux hébergés au calme. Les interventions chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale à l'écart des animaux hébergés et par des personnes expérimentées.

5141. Le syndrome de l'intestin irritable (SII) représente une pathologie fonctionnelle très commune (10-15% de la population dans les pays développés) et une cause majeure de consultations médicales dans le monde occidental. Les symptômes principaux sont représentés par la douleur viscérale et une altération de la motricité intestinale (diarrhée, constipation ou les deux conditions alternées). Bien que l'étiologie du SII ne soit pas clarifiée, la recherche a mis en évidence une altération de la barrière intestinale (augmentation de la perméabilité intestinale). De plus, chez les patients, le stress aigu ou chronique est reconnu comme un important facteur de risque impliqué dans la l'initiation et l'aggravation des principaux symptômes. Récemment, des études ont mis en évidence que la flore intestinale joue un rôle important dans le SII. L'intérêt scientifique s'est donc davantage concentré sur la consommation des probiotiques dans la prévention ou la thérapie du SII. Le but de cette étude est d'évaluer et comparer les effets physiologiques d'une consommation orale de dix produits et dix différentes souches bactériennes dans un modèle animal de stress chronique «SII-like » proche de la pathologie humaine. Nous caractériserons en parallèle l'augmentation de la perméabilité intestinale, l'hyperalgésie viscérale, les niveaux du stress oxydatif et les médiateurs périphériques libérés dans le sang. Pour cette étude d'une durée de 5 ans, seront utilisés 1890 rats Wistar adultes d'un poids de 200g. Les animaux seront hébergés dans des locaux d'animalerie agréés, dans un environnement contrôlé (température, hygrométrie, éclairage...) leur assurant des conditions sanitaires et de bien-être optimal. Le nombre d'animaux utilisé sera le minimum nécessaire pour obtenir des résultats permettant une analyse statistique robuste (chaque groupe étant constitué de 15 rats). Les paramètres évalués in vivo le seront en prenant les précautions nécessaires pour minimiser tout gêne, inconfort ou douleur à l'animal.

5142. L'implant cochléaire est à l'heure actuelle le seul moyen de réhabiliter les surdités de perception profondes ou totales. Son indication tend à s'élargir aux patients possédant encore une audition résiduelle sur les fréquences graves ce qui entraîne, entre autres une modification des techniques chirurgicales et du matériel afin de préserver ces restes auditifs. La conception d'un porte-électrodes étant longue et coûteuse, il est nécessaire de déterminer les critères principaux (diamètre, rigidité) permettant de diminuer le traumatisme pouvant accompagner l'implantation cochléaire.

L'objectif de cette étude est de montrer s'il existe un lien entre le diamètre de l'implant et/ou sa rigidité et les microtraumatismes causés par son insertion dans une cochlée saine.

Une étude préliminaire sera réalisée avec différents types de porte-électrodes qui seront insérés dans des cochlées artificielles en mesurant les forces d'insertion.

Une expérimentation animale sera réalisée chez 40 cobayes normo-entendant (4 animaux pour l'acquisition des différentes techniques puis trois groupes de 12 cobayes). Le cobaye est l'animal de choix pour ce genre d'étude : la taille relativement grande de sa cochlée (5 mm) permet l'insertion du porte-électrode.

Le nombre de groupe et le nombre des animaux par groupe a été calculé en prenant en compte le fait que nous avons déjà réalisé au laboratoire des expériences similaires dont les résultats pourront être utilisés comme témoin et, compte tenu de notre expérience dans cette technique 12 animaux par groupe est un nombre suffisant et nécessaire pour avoir une bonne validité statistique.

Les animaux seront implantés sous anesthésie générale. Ils recevront des antalgiques le jour et le lendemain de l'intervention et seront surveillés quotidiennement afin de vérifier, et traiter, le moindre signe de souffrance.

Trois prototypes de porte-électrodes de diamètre et de rigidité différents seront insérés dans les deux cochlées de cobayes. L'enregistrement des seuils des Potentiels évoqués auditifs (PEA) seront effectués afin d'étudier l'audition, puis les cochlées des cobayes seront étudiées en imagerie au synchrotron de Grenoble. Une étude histologique sera réalisée au décours de l'imagerie.

Les résultats attendus sont une diminution des forces d'insertion et du traumatisme de la cochlée lors de l'utilisation en de porte-électrodes plus souples et / ou plus fins.

Les perspectives d'avenir sont le développement de porte-électrodes avec un design optimisé permettant une implantation conservant l'intégrité des structures encore fonctionnelles des cochlées des patients implantés afin d'améliorer la qualité de leur compréhension de la parole dans le bruit et l'écoute de la musique, deux objectifs qui restent aujourd'hui difficiles à atteindre.

5143. Le mélanome malin, survenant à partir des mélanocytes, est un cancer de la peau très dangereux, et présente une forte tendance à générer des métastases. Il est reconnu que les cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement des tumeurs non seulement échouent à générer une réponse anti-tumorale efficace, mais interagissent également avec les cellules malades pour promouvoir l'expansion et l'invasion des tumeurs. Chez l'Homme, il existe plusieurs types de réponses immunitaires. La catégorie du pronostic est influencée par le type de réponse immunitaire à l'œuvre pour lutter contre l'invasion cancéreuse. Il est actuellement suggéré qu'une réponse immunitaire dite "de type 2" dans le microenvironnement de la tumeur est associée à un mauvais pronostic en comparaison aux tumeurs chez lesquelles une réponse "de type 1" est prédominante.

Lors d'études précédentes, notre laboratoire a identifié une molécule (thymic stromal lymphopoietin (TSLP)), produite par les kératinocytes de la peau, suffisante et nécessaire pour induire une réaction inflammatoire de type 2. Ce type de réponse immunitaire est impliqué notamment dans les dermatites atopiques (eczéma), et dans l'asthme. Récemment, une fonction nouvelle et inattendue de cette molécule a été découverte: l'induction et la régulation de plusieurs variétés de tumeurs, même si plusieurs de ces résultats restent sujet à controverse.

Notre laboratoire a généré des modèles murins permettant soit d'inactiver le gène codant pour TSLP, soit de forcer l'activation ce gène. Afin d'étudier les rôles de TSLP dans la tumorigénèse du mélanome, nous allons inoculer des cellules d'une lignée cellulaire issue d'un mélanome à ces souris. Nous pourrons alors comparer la croissance et la progression des tumeurs dans ces lignées murines et vérifier si l'inactivation ou l'activation de TSLP peut modifier ces paramètres. Ce projet pourrait ainsi aboutir à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour combattre ce type de cancer.

Remplacement: les lignées de souris n'exprimant pas TSLP, soit dans tous les tissus soit dans les kératinocytes de la peau, permettent d'étudier le rôle de cette molécule dans différentes maladies, et notamment dans le microenvironnement tumoral. Actuellement, il n'existe pas de modèle *in vitro* capable de reproduire ce type d'environnement.

Réduction: Afin de différencier les rôles de différentes molécules pouvant être impliquées dans le développement des mélanomes, ce projet va nécessiter l'utilisation de 5 lignées de souris composées chacune de 12 animaux. De plus, nous souhaitons analyser l'établissement des métastases pour 2 de ces lignées, sur des groupes composés de 15 animaux. Ce projet nécessitera donc l'utilisation d'un maximum de 90 animaux. Ce nombre d'animaux nous permettra d'obtenir des conclusions statistiquement significatives quant à l'accroissement ou à la diminution des tumeurs et à l'établissement des métastases.

Raffinement: après l'injection des cellules, le suivi des animaux sera effectué deux fois par semaine. Les animaux seront euthanasiés si la tumeur atteint 1 cm³ ou 30 jours après l'injection. Le diamètre des tumeurs sera mesuré avec un pied à coulisse. Les animaux seront pesés 2 fois par semaine, l'évolution du poids de la tumeur sera estimée afin de ne pas interférer avec la mesure du poids des animaux. Une attention particulière sera portée au niveau du site d'injection et les tumeurs seront attentivement observées. En cas de diminution du poids de l'animal supérieures à 20%, si des signes de nécrose de la tumeur sur une durée supérieure à 72 heures, et si des signes de douleur (observation de l'expression faciale des animaux) ou d'altération de l'activité ou des problèmes de pelage sont observés (ou en cas de combinaison de ces différents paramètres), l'animal sera euthanasié.

5144. La capacité d'une bactérie comme *Staphylococcus aureus* à produire un biofilm joue un rôle important dans de nombreuses infections telles l'ostéomyélite, les infections de prothèses articulaires ou celles liées à des cathéters. Le biofilm offre en effet à la bactérie une protection contre les cellules immunitaires et les antibiotiques induisant des infections difficiles à traiter et pouvant être sources d'impasses thérapeutiques. Il est donc indispensable de rechercher de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement d'infections liées au biofilm.

Le but de cette étude est donc d'évaluer l'activité de nouvelles molécules seules ou en association avec la ciprofloxacine dans un modèle murin expérimental de biofilm sur cathéter. Pour cela, après formation préalable d'un biofilm sur des segments de cathéters, ces matériaux seront implantés en sous cutané chez la souris. Six jours après l'opération, les animaux seront traités pendant 4 jours par ces nouveaux composés seuls ou en association, par la ciprofloxacine seule ou la rifampicine, antibiotique de référence pour comparaison des activités. Afin de mener à bien ce projet, un nombre de 210 souris sera nécessaire.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'évaluation et la comparaison de l'activité d'antibiotique seuls ou en association sur une souche et particulièrement sur du biofilm ne peuvent pas être simplement réalisées *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*). Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. Le bien-être des animaux sera surveillé tout au long de l'étude.

5145. L'anévrisme de l'aorte thoraco-abdominal (AATA) est une dilation d'une partie de l'aorte qui concerne le segment viscéral de l'aorte, compris entre la traversée diaphragmatique et les artères rénales ; sans intervention cette dilatation peut aller jusqu'à la rupture de l'aorte. L'AATA est associé actuellement à un taux élevé de mortalité. Des endoprothèses fenêtrées et branchées (EFBs) ont été développées pour traiter ces anévrismes aortiques complexes. Ces endoprothèses ont la particularité d'être munies d'orifices ou de branches destinés à perfuser les artères rénales et viscérales.

Cependant, la fabrication d'une EFB doit être faite sur mesure et nécessite un délai de 6 à 8 semaines. Par ailleurs, le coût de ces EFB est très élevé. Ces éléments limitent leur utilisation en urgence et à large échelle.

Réaliser des techniques de fenestration *in situ* (FIS) d'endoprothèses aortiques représente une alternative attractive chez ces patients atteints d'anévrismes complexes.

L'objectif principal sera d'évaluer la faisabilité de la fenestration *in situ* au laser d'endoprothèses lors du traitement endovasculaire des anévrismes de l'aorte thoraco-abdominale, et d'analyser le comportement biomécanique de ces montages.

Nous procéderons à une étude chez l'animal car les conditions physiologiques, physiques et hémodynamiques sont difficilement reproductibles "*in vitro*" et l'évaluation de la faisabilité de notre technique doit être faite "*in vivo*" pour pouvoir être validée au niveau chirurgical. Le choix de l'espèce animale se portera sur les ovins. En effet le diamètre de l'aorte de brebis et son anatomie se rapprochent le plus de l'homme. Afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, nous nous limiterons à 20 ovins correspondant à l'étude de 5 endoprothèses du marché et nous réaliserons deux techniques chirurgicales pour chaque type d'endoprothèse. Toutes les interventions seront réalisées chez des animaux sous anesthésie générale et sous analgésie. La procédure sera arrêtée précocement pour limiter la souffrance de l'animal et l'euthanasie sera pratiquée en cas de complications chirurgicales peropératoires (hémorragies non maîtrisées) ou de signes de souffrance malgré l'utilisation d'antalgiques. Ces signes

pourront être détectés à partir d'indicateurs physiologiques (tels que la tachycardie, augmentation ou baisse de la température corporelle), les animaux étant monitorés en continu. La mise à mort sera réalisée par injection IV létale de pentobarbital.

Nous étudierons dans un premier temps *in vitro*, les fenestrations physique (laser endo-artériel) et mécanique (aiguille transseptal) des différentes endoprothèses du marché. Nous analyserons la qualité et les dommages engendrés sur les matériaux ainsi que la qualité des fenêtres réalisées avant et après dilatation des endoprothèses par ballons d'angioplastie, macroscopiquement, en microscopie optique et en microscopie électronique. Ensuite nous étudierons l'association prothèses fenêtrées et stents (petits tubes métalliques maillés) par des tests de résistance et de fatigue. Car chez le patient la pose de stents est nécessaire après de la mise en place de prothèses afin d'assurer l'étanchéité du montage.

Dans un second temps, la faisabilité de la technique de fenestrations à l'aide d'un laser endo-artériel au niveau des artères viscérales sera testée *in vivo* en conditions physiologiques et anatomiques, sur ovins anesthésiés. Nous réaliserons les mêmes modèles d'études des explants, que celles réalisées, *in vitro*.

Nous souhaitons comparer les techniques de fenestrations au laser par rapport aux techniques déjà décrites dans la littérature et démontrer la supériorité des techniques de fenestrations au laser endo-artériel. Toutes les endoprothèses du marché seront testées afin d'établir un modèle pour lequel la technique serait la plus reproductible. Enfin nous souhaitons, pour la première fois étudier la relation entre fenestrations *in situ* et stent.

L'objectif serait d'aboutir à une technique fiable, reproductible, peu coûteuse et pérenne afin de pouvoir l'appliquer à l'homme.

5146. Le stress est un problème de santé publique majeure. Si des travaux existent dans ce domaine, peu nombreux sont ceux qui se sont intéressés à évaluer les effets cérébraux du stress d'une manière dose-dépendante. En général, les études se contentent de contraster les effets d'un stress par rapport à une situation sans stress. Notre hypothèse est que des circuits différents sont recrutés en fonction de l'intensité qui a été appliqué.

Pour cette expérience, 32 souris sont requises soit 4 lots de 8 souris.

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

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes).

Remplacement : aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. L'étude des effets du stress repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Les études cérébrales requièrent des prélèvements frais.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les analyses tissulaires nécessitent une taille d'effectif suffisante compte tenu de la variabilité interindividuelle (n=8 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

5147. Le virus de la diarrhée épidémique porcine (DEP) provoque d'importantes diarrhées, des vomissements et des déshydratations chez les porcs atteints. Ce virus (vDEP) s'est propagé depuis les années 1970 et est resté endémique dans certains pays européens. En 2013, une épizootie (épidémie frappant les animaux) très sévère de DEP est apparue aux Etats-Unis provoquant la perte de 7 millions de porcelets en moins d'un an. La maladie s'est propagée à travers tout le pays puis au Canada ainsi qu'en Amérique du Sud. Elle est toujours d'actualité et sa rapidité de propagation motive une vigilance accrue à l'égard de cette maladie en Europe. Les cas de DEP aux Etats-Unis ont permis d'isoler deux types de souches: des souches dites INDEL et des souches dites non INDEL qualifiées de plus virulentes. Les souches INDEL sont proches des souches européennes alors que les souches non INDEL sont de nouveaux variants présentant des mutations génétiques. Malgré les études réalisées sur ce virus, aucune donnée ne permet de savoir si le virus se transmet via les semences. Ce projet vise donc à amener des connaissances sur la possibilité de transmission de ces deux types de souches virales INDEL et non INDEL de vDEP via les semences. Le porc étant l'espèce cible et aucune méthode alternative n'étant disponible, ce projet nécessite le recours à l'expérimentation animale. Une procédure expérimentale sera réalisée sur 6 verrats. Elle permettra d'évaluer la transmission du vDEP via les semences selon le type de souche étudiée (INDEL ou non INDEL) avec 2 animaux par conditions et 2 animaux comme contrôle négatifs. Au cours de ces essais, des prélèvements réguliers de sang, de semences et de fèces seront effectués. Les animaux inoculés seront abattus à la fin des essais. Les 2 témoins sont conservés à la fin des essais, ils ne subissent que les prélèvements. Les résultats ainsi obtenus permettront de déterminer la présence de particules virales dans la semence, la durée de l'excrétion ainsi que de la virémie. Le nombre d'animaux utilisés (6 verrats) est le plus faible possible tout en permettant l'obtention de résultats statistiquement robustes. Des points limites seront précisément définis pour que les animaux soient euthanasiés avant que la souffrance ait atteint un seuil non acceptable.

5148. Les mycoplasmes aviaires (maladies bactériennes) sont à l'origine d'infections respiratoires, articulaires ou génitales, qui entraînent de lourdes pertes économiques dans les élevages. Les mycoplasmoses aviaires sont des maladies réglementées, car elles figurent parmi les maladies infectieuses les plus fréquentes dans les élevages de poules et de dindes.

Ce projet a pour but la production de sérums positifs nécessaires aux tests de diagnostic de ces maladies. Il nécessite l'infection expérimentale de poulets ou de dindonneaux par des mycoplasmes spécifiques de ces espèces (*Mycoplasma gallisepticum* (MG) et *M. synoviae* (MS) chez le poulet, MG, MS et *M. meleagridis* (MM) chez la dinde), le suivi de la réponse sérologique de ces animaux infectés (par des prises de sang hebdomadaires), et l'euthanasie pour récolter le sang lorsque les animaux ont développé une réponse immunitaire sérique spécifique de l'espèce mycoplasmique inoculée.

Les protocoles suivants seront utilisés pour obtenir des sérums positifs : chez le poulet (MS et MG) et chez le dindonneau (MS, MG et MM). Les animaux utilisés sont EOPS (exempts d'organismes pathogènes spécifiques).

Pour MG et MS, les animaux seront inoculés à deux reprises, à deux semaines d'intervalle, par voies intra-trachéale et intranasale. La diffusion du mycoplasme aux animaux « contacts » sera suivie via des prises de sang hebdomadaires. Les animaux seront euthanasiés lorsqu'ils auront développé une réponse sérologique spécifique de MS ou de MG. Au total, 100 poulets et 30 dindonneaux seront utilisés.

Pour MM, les dindonneaux seront infectés à deux reprises, à deux semaines d'intervalle, par voies intraveineuse et intra-trachéale. Les animaux seront euthanasiés lorsqu'ils auront développé une réponse sérologique spécifique de MM, détectée via des prises de sang hebdomadaires. Au total, 10 dindonneaux seront utilisés.

Ces sérums ne peuvent être obtenus que par expérimentation sur espèces cibles. Le nombre d'animaux est calculé de manière à obtenir des volumes de sérums suffisants pour constituer des stocks sur 3 à 5 ans nécessaires au diagnostic et éviter de multiplier les essais. Ces procédures concerneront 200 poulets et 70 dindonneaux au maximum sur une période de 5 ans. Le protocole expérimental est conçu pour limiter au maximum la souffrance animale, en privilégiant les inoculations par voie orale ou nasale et en limitant les interventions sur animaux (une prise de sang hebdomadaire pour suivre la réponse sérologique des animaux à l'infection). Les infections par MG, MS ou MM n'entraînent généralement que peu ou pas de signes cliniques chez des poulets ou dindonneaux EOPS en absence de toute surinfection. Toutes les expérimentations seront effectuées dans des locaux agréés et des conditions d'hébergement adaptées.

5149. *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma vivax*, *Leishmania donovani* et *Leishmania major* sont des parasites respectivement responsables de la Maladie de Chagas humaine, de la Maladie du Sommeil animale et des formes cutanées ou viscérales des leishmanioses humaines et animales. Notre projet vise à étudier les processus infectieux causés par ces parasites afin de mieux connaître les mécanismes d'échappement aux réponses immunitaires mises en place par l'hôte et ceux permettant aux parasites de persister et générer des pathologies graves. In fine, le projet vise à identifier des molécules parasitaires permettant de développer de nouvelles approches vaccinales et/ou thérapeutiques. Des modèles expérimentaux chez des rongeurs (souris et hamsters) ont été mis en place afin de répondre aux objectifs scientifiques inclus dans les protocoles suivants :

1. Maintien, production et purification des formes infectantes sauvages ou génétiquement modifiées de ces parasites pour des inoculations in vivo et in vitro, préparations d'antigènes ou d'acides nucléiques, et des tests en microplaques pour l'évaluation de composés chimiques antiparasitaires ex-vivo.
2. Analyse par imagerie du petit animal du processus infectieux et de la pathogénèse induits par l'inoculation de parasites fluorescents et/ou bioluminescents.
3. Etude des liens de virulence des parasites et des mécanisme(s) d'échappement au système immunitaire de l'hôte.
4. Evaluation puis validation du pouvoir thérapeutique de nouveaux composés antiparasitaires par l'imagerie en temps réel de rongeurs préalablement inoculés par des parasites fluorescents et/ou bioluminescents.

6240 souris et 220 hamsters seront utilisés pendant 5 ans. Le recours à des rongeurs est indispensable afin d'étudier les mécanismes impliqués dans l'échappement aux réponses immunitaires de l'hôte mammifère dans leur globalité, en suivant parallèlement le devenir du parasite dans les différents tissus cibles (peau, rate, foie, ganglions lymphatiques, cœur, cerveau) ainsi que les réponses de l'hôte consécutives à l'infection. Des approches in vitro seront utilisées dès que l'infection animale n'est pas nécessaire : maintien des formes non-infectantes, différenciation de formes non-infectantes vers des formes infectantes en culture, inactivation de gènes d'intérêt, analyse des interactions cellulaires hôte/parasite, analyse du pouvoir thérapeutique d'un composé chimique sur des cellules de l'hôte infectées in vitro. Des parasites luminescents et/ou fluorescents ont été générés afin de réduire le nombre d'animaux par groupe expérimental grâce à l'utilisation de l'imagerie du petit animal. Cette approche permet d'évaluer le processus infectieux et le développement de la pathologie chez un nombre de rongeurs statistiquement acceptable et qui est maintenu en vie pendant tout le long du protocole expérimental.

L'expérience des membres du laboratoire et la maîtrise des procédures expérimentales nécessaires garantissent la bonne marche des protocoles conçus afin de minimiser toutes douleurs et souffrances majeures aux animaux. La surveillance journalière des animaux, les conditions d'hébergement de haut niveau de sécurité, les bâtonnets de coton ou les morceaux de papier dans les cages contribuent à réduire leur stress. Dès que les processus infectieux s'avèrent plus importants que ceux prévus dans les protocoles initiaux, les animaux sont anesthésiés puis mis à mort pour limiter la souffrance.

5150. Le syndrome d'apnées du sommeil (SAS) est l'une des complications courantes de la grossesse, dont la fréquence atteint 25%. L'apnée du sommeil provoque des séquences successives d'hypoxie, suivies de réoxygénation. On considère ces séquences comme un facteur de risque de troubles du développement de l'enfant. Cependant, ces effets sont très mal connus. Pour connaître les conséquences du SAS sur le développement, on a recours à des modèles animaux (généralement rats ou souris) qui consistent à exposer une femelle gestante à des épisodes d'hypoxie intermittente qui miment les apnées. Notre étude consiste à analyser les conséquences de l'hypoxie intermittente gestationnelle (sur des femelles souris gestantes) sur le métabolisme glucidique chez la souris adulte.

Remplacement: Il est extrêmement difficile d'étudier les mécanismes et les conséquences de l'apnée de la femme enceinte chez l'humain. Les problèmes principaux sont d'ordre éthique, et d'ordre scientifique, ces derniers tenant à la multiplicité de facteurs confondus. L'analyse chez un modèle animal tel que la souris reflètera au mieux les effets biologiques au niveau de l'organisme entier, et notamment les effets de l'apnée sur la génération suivante (analyse impossible in vitro).

L'étude sera réalisée sur 30 souris de type Swiss âgés de 4 mois. Ces souris seront réparties en 3 groupes de 10 animaux:

- 1 groupe contrôle de 10 souris dont les mères n'auront pas été exposées aux épisodes d'hypoxie intermittente (mêmes conditions environnementales, en normoxie);
- 1 groupe de 10 souris dont les mères auront été exposées aux épisodes d'hypoxie intermittente selon un protocole #1 (10 jours d'hypoxie intermittente durant la gestation);
- 1 groupe de 10 souris dont les mères auront été exposées aux épisodes d'hypoxie intermittente selon un protocole #2 (15 jours d'hypoxie intermittente durant la gestation).

Cet effectif de 30 animaux sera utilisé afin d'obtenir une puissance statistique suffisante à l'étude.

Raffinement: Nous n'attendons pas de symptômes dommageables chez ces souris. Cependant, le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état général des animaux. De plus, chez les adultes, les tests sont des méthodes couramment appliquées peu douloureuses (glycémie capillaire au niveau de la queue après administration per os de glucose).

Des résultats concluants permettraient de mieux évaluer les risques encourus suite au SAS, de faciliter la surveillance et la prise en charge des enfants, ainsi que la prévention de certaines pathologies de l'adulte.

5151. L'anémie de Fanconi (AF) est une maladie génétique rare dont les symptômes incluent une insuffisance médullaire et une propension importante à développer des leucémies et des tumeurs solides des voies aérodigestives supérieures. Présente dans tous les groupes ethniques, l'AF a une incidence estimée à 1/350 000 naissance. La greffe reste à ce jour le principal traitement relativement efficace. La transformation cancéreuse complique la prise en charge entraînant un pronostic réservé et une espérance de vie réduite.

A ce jour, 21 gènes *Fanc* ont été identifiés. Une mutation des deux copies de l'un de ces gènes entraîne le développement de l'AF. La mutation du gène *Fanca*, présente chez plus de 60% des patients, est la mutation la plus répandue. Des données bibliographiques ont montré que la voie *Fanc* est impliquée dans la régulation de certaines régions du génome, les Sites Fragiles Communs (SFC), dont le rôle dans la transformation cancéreuse n'est pas établi. Nous nous proposons d'analyser l'implication des SFC dans la progression de la maladie AF et d'identifier l'ordre des événements conduisant au développement de cancers dans un modèle de souris où les deux copies du gène *Fanca* a été invalidé (*Fanca*^{-/-}). La compréhension de ces événements pourrait constituer une base de développement de nouveaux agents thérapeutiques chez les patients AF et à plus grande échelle chez les patients leucémiques ou présentant des tumeurs solides.

Pour respecter la règle des 3R, une première étude a été réalisée dans des lignées cellulaires. Dans les cellules AF, nous avons montré la dérégulation de certains gènes situés au niveau des SFC. L'utilisation de lignées cellulaires permettant de reconstituer les mécanismes moléculaires impliqués dans l'AF de façon partielle uniquement, il est essentiel d'utiliser des modèles de souris *Fanc* afin de comprendre les mécanismes globaux et réels impliqués dans l'évolution de la maladie dans un organisme entier.

L'hématopoïèse se déroule dans la moelle osseuse dont le microenvironnement joue un rôle complexe et prépondérant dans l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques et la différenciation des cellules hématopoïétiques. A l'heure actuelle, il n'est pas possible de reproduire *in vitro* la structure complexe et les interactions cellulaires de la niche hématopoïétique. Il est donc indispensable d'utiliser des modèles *in vivo* car seul un animal entier peut permettre d'étudier l'évolution de la maladie et les mécanismes moléculaires réels prenant place dans la niche hématopoïétique. Nous estimons que pour répondre aux questions posées par le projet, un maximum de 740 souris sera nécessaire.

Des travaux récents ont montré que l'exposition de souris *Fanca*^{-/-} à un stress physiologique, telle qu'une infection, induit une anémie sévère, symptomatique de l'AF. Nous nous proposons d'induire ce type de stress en injectant, dans les souris *Fanca*^{-/-}, d'un immunostimulant qui simule une infection virale, et démontrer les mécanismes moléculaires par lesquels la voie *Fanc* régule les SFC. L'AF étant une maladie progressive, nous nous proposons également de réaliser ces expériences dans des souris âgées. En parallèle, pour identifier le rôle des gènes associés aux SFC dans le développement de l'AF, nous développerons un modèle de souris où *Fanca* ainsi que *Fhit*, un gène SFC dont le rôle dans l'AF a été déterminé dans nos expériences préliminaires, seront invalidés et étudierons les phénotypes associés à l'absence de ces deux gènes sur l'organisme.

Toutes les injections et interventions (dont les prélèvements de sang) seront faites sous anesthésie générale. Pour certaines interventions, de la buprénorphine sera administrée au décours pour pallier la douleur engendrée. Les animaux bénéficieront d'une surveillance rapprochée et d'un enrichissement environnemental permanent, ainsi que d'alimentation adaptée en cas de besoin.

5152. 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 être réactivées même 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 fortement impliqué dans les processus émotionnels et motivationnels. Au sein de ce circuit, la neurotransmission glutamatergique joue un rôle capital car elle est à l'origine des informations qui le traversent et qui permettent le développement d'un comportement motivé et donc celui caractérisant l'état de dépendance aux drogues, y compris la vulnérabilité à la rechute après sevrage. Depuis quelques années, la recherche de nouveaux agents thérapeutiques s'intéresse au développement d'agonistes sélectifs des récepteurs métabotropiques du glutamate (RmGlu), en particulier les RmGlu4 et RmGlu7 du groupe III car ils assurent une inhibition de la neurotransmission du glutamate. Dans ce cadre, nous proposons d'étudier l'effet d'un nouvel agoniste, que nous appellerons LSP, développé par un laboratoire CNRS de chimie de Paris. Maîtrisant la technique d'auto-administration intraveineuse (AAiv) de cocaïne chez le rat, nous mesurerons l'impact de l'administration du LSP 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) REDUCTION. Nous avons réduit au maximum le nombre de rats nécessaires aux analyses statistiques en tenant compte (notamment) de la variabilité interindividuelle dans le comportement (12 rats/conditions pharmacologiques) et dans la biologie moléculaire (6 rats/conditions pharmacologique pour les groupes témoins non soumis au comportement). (iii) 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.

5153. Depuis quelques années l'étude du microbiote intestinal et de son incidence sur la santé humaine est devenu un domaine de recherche majeur. Cette vaste communauté microbienne, hébergée dans l'intestin, exerce de nombreuses fonctions biologiques et métaboliques et confère de nombreux avantages à l'hôte. Ces études ont mis en évidence les fonctions de coopération, y compris un effet barrière contre les microbes pathogènes, la fermentation des sucres complexes et de la maturation du système immunitaire. Enfin, les bactéries appartenant au microbiote intestinal apparaissent de plus en plus impliquées dans divers processus métaboliques tels que la résistance à l'insuline, l'obésité ou encore le diabète.

Les bactéries de la flore intestinale pourraient affecter des voies nutritionnelles/métaboliques et ainsi moduler le métabolisme glucidique et lipidique de leur hôte. Cependant, les mécanismes moléculaires précis qui sous-tendent cette régulation du métabolisme de l'hôte par le microbiote ne sont que très partiellement élucidés et les études sont le plus souvent réalisées de manière globale, i.e. modification globale des populations bactériennes et leurs conséquences métaboliques/nutritionnelles globales chez l'hôte.

L'objectif de ce projet de recherche concerne l'absorption, le transport et la sécrétion des lipides alimentaires chez la souris. Nous étudions les effets d'une seule espèce bactérienne commensale et potentiellement probiotique, *Lactobacillus casei*, sur le transport, le métabolisme et la sécrétion des lipides au niveau intestinal ainsi que les conséquences sur la composition lipidique plasmatique chez la souris. Nous avons par ailleurs mis en évidence dans des modèles cellulaires des modifications des capacités d'absorption et de sécrétion des lipides par les cellules épithéliales intestinales. Afin de valider ces données expérimentales dans des modèles animaux, nous proposons de collecter la lymphe, dans laquelle sont sécrétés les lipides par les entérocytes, par canulation du lymphatique mésentérique et/ou du canal thoracique afin d'en étudier directement la composition. La technique de canulation à proprement parler (voie d'abord, choix et mise en place du cathéter, choix et mise en place de la « poche de collection ») sera mise au point au cours de ce projet.

Les expérimentations se déclinent via une procédure qui sera mise en œuvre en nous conformant aux deux valences - réduction et raffinement- de la démarche 3R. Seront intégrées dans les groupes expérimentaux au maximum 30 souris et rats de laboratoire adultes, mâles ou femelles, pendant les 2 années de l'étude. Ceci correspond au minimum nécessaire pour pouvoir tirer des conclusions des différentes expériences, compte tenu du nombre de groupes analysés. Ces animaux seront soumis à cette seule procédure expérimentale associée à une sévérité modérée. La canulation sera réalisée sous anesthésie et analgésie. Les animaux seront observés régulièrement pour détecter tout signe anormal de douleur, de souffrance ou de stress et pouvoir intervenir sans délai.

Ce projet permettra d'obtenir des données nouvelles et fiables sur le rôle de *L. casei* dans le métabolisme lipidique.

5154. Les objectifs généraux de ce cycle de séances de travaux pratiques de Pharmacologie sont les suivants :

- illustrer par la pratique le cours de Pharmacologie. Toutes les molécules utilisées sont étudiées, soit en pharmacologie générale, soit en pharmacologie fonctionnelle.

- appréhender la méthodologie employée en recherche pharmacologique : conception et limites d'un test pharmacologique, étapes de la réalisation d'une publication scientifique.

- aborder de façon concrète la thématique de l'utilisation de l'animal de laboratoire en recherche pharmacologique.

A l'issue de ces séances, chaque étudiant doit donc avoir atteint les objectifs ci-dessous énumérés.

- Illustration du cours

Parmi l'ensemble des substances utilisées, certaines doivent être très bien connues. Ce sont celles qui sont, par ailleurs, présentées dans le cours. Pour chacune de celles-ci, l'étudiant doit être capable notamment de la rattacher à sa classe pharmacologique et de citer les grandes lignes de son mécanisme d'action

- Les tests pharmacologiques

Pour chaque test pharmacologique employé, l'étudiant doit être capable :

- d'en évaluer les qualités métrologiques (sachant que certains des tests présentés ont été volontairement choisis imparfaits),
- d'imaginer les changements éventuels à apporter afin de l'améliorer,
- de présenter et de commenter les résultats à la façon d'une publication scientifique, sous la forme d'un compte-rendu
- d'utiliser l'animal de laboratoire

Ces tests pharmacologiques sont réalisés sur des animaux, vigiles. Leur réalisation attentive doit permettre d'acquérir les bases de l'éthique et des bonnes pratiques de l'expérimentation animale, sous le contrôle des enseignants présents, qui disposent tous d'autorisation dans le domaine de l'expérimentation animale, selon la réglementation en vigueur.

Dans la phase de screening d'une molécule nouvelle, ou pour explorer plus spécifiquement l'activité centrale d'une substance psychotrope, de nombreux tests pharmacologiques sont disponibles afin d'évaluer l'activité globale de l'animal, son comportement exploratoire, ses possibilités d'apprentissage, le tonus musculaire, l'équilibre ou la coordination motrice, etc... Pour cette séance de travaux pratiques, des souris sont utilisées pour mettre en évidence l'effet biologique de médicaments interagissant avec le système nerveux central (sédatif : diazépam, acépromazine, clomipramine – excitant : caféine). Plusieurs tests sont mis en œuvre afin de mesurer des paramètres biologiques, notamment l'activité de l'animal en absence ou après traitement (test du rota-rod, test d'actimétrie, test de curiosité).

La séquence de ce TP s'effectue sur une durée de 1 mois. Un groupe de 20 souris est utilisé à chaque séance une fois par semaine par un groupe de 8 étudiants. Ainsi, afin de respecter une période de repos pour chaque animal entre deux utilisations, un roulement est effectué avec 5 groupes de 16 souris (quatre souris sont étudiées/lot et une souris/lot sert pour l'entraînement aux injections, soit 84 souris au total). Chaque souris dispose donc d'une période de repos d'au moins 3 jours.

On ne peut envisager de remplacer l'étude des effets des médicaments psychotropes par des approches *in vitro*. De plus, il n'existe pas de modélisation mathématique ou *in silico* qui permet d'évaluer l'effet de ces médicaments sur le système nerveux central.

Le nombre d'animaux est réduit au minimum afin de permettre à l'étudiant d'effectuer une analyse descriptive correcte.

Le bien-être des animaux est surveillé par l'observation du comportement et l'état général de l'animal durant toute la séance de TP. Les étudiants sont d'abord formés (par un enseignant et une technicienne) pour la pratique de la contention et des injections sous-cutanées. De plus, pour limiter le stress de contention durant les tests, un seul étudiant de chaque groupe procède à chaque fois aux injections sous-cutanées. Les encadrants de ce TP veilleront particulièrement à surveiller la qualité de la contention pour éviter tout risque d'étouffement de l'animal. Les souris en état d'hypothermie et dont le réveil n'intervient pas rapidement après l'injection de l'acépromazine seront retirées des essais puis euthanasiées.

Les conditions d'hébergement sont les plus adaptées pour réduire toute souffrance ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

5155. La mélatonine, une hormone sécrétée par la glande pinéale pendant la nuit, est principalement connue pour son rôle central dans la régulation des rythmes jour-nuit, notamment celui du sommeil. Depuis quelques années, les neurobiologistes s'intéressent à d'autres propriétés de la mélatonine, notamment ses effets antioxydants neuro-protecteurs, son action modulatrice de l'appétit et des états affectifs, mais aussi plus récemment ses effets bénéfiques sur la mémoire. Au niveau du cerveau des mammifères, cette hormone agit sur les récepteurs MT1 et MT2. On ne connaît pas l'implication respective de ces deux récepteurs dans les effets bénéfiques de la mélatonine sur la mémoire. Le but du projet est de définir le rôle respectif de chacun de ces récepteurs dans cet effet bénéfique afin d'explorer cette nouvelle voie pour lutter contre les perturbations de la mémoire très handicapante dans de nombreuses pathologies du cerveau et au cours du vieillissement. Pour répondre à cette question deux approches seront testées en une expérience : Quel est l'effet de la délétion du gène (KO) du récepteur MT1 ou du récepteur MT2 sur la mémoire de reconnaissance chez la souris MT1 KO ou la souris MT2 KO? Est-ce que l'effet bénéfique de la mélatonine est conservé chez l'une ou l'autre de ces souris KO?

Pour répondre à ces questions les souris passeront des tests de reconnaissance d'objet basé sur la mesure du comportement spontané d'exploration d'un objet nouveau ou placé à un nouvel endroit et elles passeront aussi un test déterminant leur niveau d'anxiété qui est basé sur l'évitement spontané d'un compartiment fortement éclairé (boîtes clair-obscur). Les résultats de cette étude donneront une indication précieuse sur l'identité du récepteur impliqué dans la mémoire et sur lequel se focaliseront de futures recherches.

Ce projet respecte au plus près la règle des 3R :

Remplacer. L'évaluation des effets de la mélatonine sur les performances de mémoire nécessite l'utilisation de souris. Aucun modèle *in vitro* ou computationnel ne permet d'évaluer les effets d'un composé sur les fonctions de la mémoire dans leurs aspects physiologique et comportemental.

Réduire. Le nombre d'animaux est réduit au maximum: 12 souris par groupe (lignée) est l'effectif strictement minimal dans une étude sur la mémoire de reconnaissance et pour satisfaire aux contraintes des analyses statistiques sur deux facteurs (à la fois le traitement et la lignée). De plus, la stratégie expérimentale adoptée permettra d'avoir chaque souris comme son propre témoin avec ou sans traitement mélatonine (donc 2x moins de souris). Une première expérience de 12 souris vérifiera l'effet bénéfique de la mélatonine dans nos tests de reconnaissance. Le niveau d'anxiété des souris sera déterminé car il peut affecter les performances de reconnaissance d'objet. Une expérience similaire sera menée pour chaque lignée de souris (MT1 KO, puis MT2 KO) comprenant 12 souris témoins non transgéniques, 12 souris hétérozygotes et 12 souris homozygotes pour la délétion du gène. Le projet requiert donc 84 souris.

Raffiner: Les souris bénéficieront d'éléments d'enrichissement dans leur cage (matériel de construction du nid et boulettes de nourriture à manipuler dans la cage) et d'un suivi quotidien de leur état général. Elles seront maintenues en groupe sociaux jusqu'au début du traitement avec la mélatonine. Elles seront ensuite isolées pour pouvoir évaluer la consommation individuelle de mélatonine. Autres aspects de raffinement, la mélatonine est donnée dans l'eau de boisson (pas de piqûre) et les tests comportementaux sont basés sur le comportement spontané des animaux, sans aucune contrainte autre que d'être mis en présence de deux objets dans une grande boîte (tests de reconnaissance) ou dans une boîte sombre connectée à une boîte fortement éclairée (test d'anxiété).

5156. La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative fatale caractérisée par la perte des motoneurones au niveau du système nerveux central et périphérique. Cette perte des motoneurones entraîne une atrophie musculaire et une paralysie progressive menant au décès du patient par paralysie des muscles respiratoires. Considérée comme la maladie du motoneurone la plus fréquente chez l'adulte, elle se déclenche vers l'âge de 55 ans et le décès du patient intervient trois à cinq ans après le diagnostic. L'axe principal d'étude de la pathologie est l'axe moteur et les principaux tissus impliqués dans la maladie sont la moelle épinière, les nerfs moteurs et les muscles squelettiques. L'étude de l'interaction de ces trois acteurs est donc la clé de la recherche sur cette pathologie.

La SLA est une maladie multifactorielle dans laquelle le métabolisme des lipides influence la sévérité de la maladie. Il a été démontré que le métabolisme des sphingolipides (classe de lipides complexes) est fortement perturbé chez les patients SLA ainsi que dans des modèles murins de dénervation musculaire. Notre hypothèse est que la synthèse de Glucosylcéramide (GlcCer), un type de sphingolipide, permet le maintien et la régénérescence des unités motrices. Ici, nous proposons de moduler le taux de GlcCer par une approche pharmacologique après lésion d'un nerf périphérique dans un modèle de souris non-transgénique. Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation des protocoles. Le nombre de souris incluses dans le projet correspond à l'effectif minimal nécessaire à l'obtention de résultats exploitables. C'est pour cela que 48 souris non-transgéniques seront incluses dans le projet dans le but d'obtenir des résultats statistiquement robustes. Une réduction du nombre d'animaux risquerait d'invalider la significativité des résultats et donc de l'ensemble du projet. De plus, une attention particulière sera portée à la diminution du stress, avec par exemple un respect des structures sociales et un enrichissement de l'environnement.

Cette approche expérimentale permettra d'évaluer le potentiel thérapeutique de candidats médicaments pour la SLA.

5157. Un dispositif médical est un instrument, appareil, équipement ou encore un logiciel destiné, par son fabricant, à être utilisé chez l'homme à des fins, notamment, de diagnostic, de prévention, de contrôle, de traitement, d'atténuation d'une maladie ou d'une blessure. Un dispositif médical conçu pour être implanté en totalité ou en partie dans le corps humain ou placé dans un orifice naturel est dénommé dispositif médical implantable (DMI). Il s'agit par exemple des prothèses articulaires, des implants dentaires, des stents, du matériel d'ostéosynthèse (vis, plaques...)

Leur mise sur le marché demande une évaluation complète permettant de garantir leur innocuité pour le patient sur le long terme.

Pour cela de nombreux tests sont réalisés in vitro: génotoxicité, cytotoxicité, hémolyse... ces tests primaires permettent d'écarter tout dispositif ne présentant pas les qualités minimales requises.

Cependant, d'autres tests précliniques doivent obligatoirement être réalisés chez l'animal, notamment en ce qui concerne la tolérance locale et les performances en conditions normales d'utilisation.

Ces évaluations, lorsqu'elles sont faites dans un contexte réglementaire, sont encadrées par la norme ISO 10993.

Le présent projet a pour but l'évaluation de différents dispositifs médicaux implantables, résorbables ou non résorbables.

Cette évaluation aura lieu chez le Lapin ou le Rat, espèces préconisées par la norme 10993.

Au maximum 100 lapins et 200 rats seront utilisés sur 5 ans, pour l'évaluation de différents dispositifs.

La prise en charge des animaux suivra les bonnes pratiques vétérinaires en usage en analgésie afin de leur éviter tout dommage ou douleur.

Afin de limiter le stress des animaux, leurs conditions de vie répondront aux besoins de chaque espèce, en ce qui concerne les contacts sociaux, l'environnement (conditions d'ambiance, enrichissement) et l'alimentation.

5158. Le syndrome de l'intestin irritable (SII) représente une pathologie fonctionnelle très commune (10-15% de la population dans les pays développés) et une cause majeure de consultations médicales dans le monde occidental. Les symptômes principaux sont représentés par la douleur viscérale et une altération de la motricité intestinale (diarrhée, constipation ou les deux conditions alternées). Bien que l'étiologie du SII ne soit pas clarifiée, la recherche a mis en évidence une altération de la barrière intestinale (augmentation de la perméabilité intestinale). De plus, chez les patients, le stress aigu ou chronique est reconnu comme un important facteur de risque impliqué dans la l'initiation et l'aggravation des principaux symptômes. Bien que la prévalence du SII soit élevée il n'existe pas de traitements pharmacologiques satisfaisants ainsi notre projet vise à évaluer l'efficacité des substances pharmacologiques sur des modèles SII-like précliniques afin de développer des nouvelles pistes de traitement de cette pathologie. Pour cette étude d'une durée de 5 ans seront utilisés un total de 3360 rats Wistar adultes d'un poids de 200 g pour évaluer l'efficacité des substances pharmacologiques sélectionnées sur l'augmentation de la perméabilité intestinale et l'hypersensibilité viscérale en condition de stress chronique (mâles) et aigu (femelles).

L'utilisation du modèle rat se justifie par le nombre important d'études bibliographiques et d'outils méthodologiques utilisant ces modèles pour étudier cette pathologie qui, par la complexité des mécanismes physiopathologiques mis en jeu, ne peut être étudiée sur des modèles in vitro. De même, tout a été mis en œuvre pour tenir compte des règles de réduction et raffinement. En effet, le nombre d'animaux utilisés dans chaque groupe expérimental a été limité en tenant compte de la variabilité interindividuelle qui nécessite d'avoir des effectifs suffisants pour atteindre une validité statistique et en réduisant au maximum l'inconfort, ainsi que toute douleur ou angoisse susceptible d'être subie par les animaux. Les rats impliqués dans cette étude sont des animaux sains provenant d'un élevage agréé. Ils sont hébergés dans des conditions normalisées optimales, et suivis quotidiennement pour leur apporter le meilleur niveau de bien-être et les soins nécessaires.

5159. Notre équipe mène des recherches sur les maladies virales transmises par des moustiques comme la dengue qui constituent de sérieux problèmes de santé publique. Notre laboratoire étudie plus particulièrement les interactions entre les virus responsables de ces maladies et leurs moustiques vecteurs à la suite d'un repas de sang infectieux. Afin de maintenir nos colonies de moustiques au laboratoire et de les infecter expérimentalement, nous leur fournissons régulièrement un repas sanguin à travers un système de nourrissage artificiel. Le repas sanguin artificiel est préparé à partir de globules rouges de lapin lavés, mélangés ou non avec une suspension virale. Ce système artificiel nous permet de mimer in vitro un repas sanguin naturel, tout en maîtrisant les différents paramètres (concentration virale du mélange, température, temps de contact). Ce dispositif est un progrès en termes de remplacement et de raffinement puisqu'il se substitue au repas sanguin naturel impliquant la piqûre d'un animal (sain ou infecté) par des moustiques. Nous utiliserons des lapins comme donneurs de sang en raison de leur taille qui autorise des volumes de prélèvements sanguins adaptés à nos besoins. Pour ce projet, 15 lapins seront utilisés sur 5 ans. Chaque lapin ne sera prélevé qu'une fois par semaine au maximum. Le nombre d'animaux nécessaires a été décidé en fonction de nos besoins réguliers en globules rouges (nombreux projets sur plusieurs virus et sur des espèces de moustiques d'origine variée), tout en limitant le nombre de prélèvements par animal. Le prélèvement de sang à l'artère auriculaire qui constitue l'unique procédure sur l'animal, est très bien toléré par les lapins qu'il n'est pas nécessaire d'anesthésier. Cette procédure est donc de classe de sévérité légère.

5160. Les maladies génétiques affectant l'épithélium pigmentaire rétinien entraînent des pertes sévères et rapides de la vision conduisant à la cécité et touchent des millions de personnes dans le monde. Alors que la dégénérescence maculaire liée à l'âge, qui représente la forme la plus commune de cécité dans les pays occidentaux, semble déclenchée par des causes environnementales et génétiques, les rétinites pigmentaires sont dans la plupart des cas d'origine monogénique et affectent des populations plus jeunes. En France, environ 1,5 million de personnes seraient atteintes de dégénérescence maculaire et 200 000 de rétinites pigmentaires.

Une des causes de rétinites pigmentaires et dégénérescence maculaire peut être la perte des photorécepteurs, due à un dysfonctionnement ou à la dégénérescence de cet épithélium pigmentaire rétinien. Jusqu'à présent aucun traitement n'est disponible pour ces pathologies. La thérapie génique, qui pourrait rétablir certaines fonctions des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, est rendue difficile par l'hétérogénéité des mutations génétiques en causes dans l'altération des photorécepteurs. Nous proposons donc une approche cellulaire consistant à greffer un épithélium pigmentaire rétinien sain dérivé de cellules souches.

Notre étude est proposée dans le cadre de l'évaluation de la sécurité d'un produit de thérapie cellulaire composé de cellules d'épithélium pigmentaire rétinien dérivées de cellules souches embryonnaires humaines, et d'une membrane amniotique humaine servant de support. Ce produit de thérapie cellulaire sera greffé dans l'espace sous-rétinien de primates non humain. Les actes chirurgicaux se feront sous anesthésie générale, et la douleur postopératoire sera gérée par l'administration d'analgésiques. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus qui engendreraient une souffrance de l'animal pour laquelle les traitements classiques (antalgiques, analgésiques) n'auraient pas d'effet. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement s'il y a des signes de souffrance et de veiller au bien-être des animaux. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

Une première phase de ce projet consistera à valider la technique chirurgicale, la deuxième partie sera consacrée à l'étude de l'innocuité du produit.

Le modèle expérimental in vivo est indispensable pour mener notre étude car aucun système in vitro ne peut mimer l'implantation de l'épithélium pigmentaire rétinien issu de cellules souches. Pour ce projet, nous utiliserons des primates non-humains, seule espèce ayant des propriétés anatomiques similaires à l'Homme au niveau de l'anatomie de l'œil et notamment de la rétine. Ce projet s'appuie sur des études préalables in vitro et chez le rongeur. Le nombre d'animaux (12 adultes au maximum sur 5 ans) a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement significatives, et chaque animal est utilisé pour l'ensemble des étapes du projet, de l'implantation intraoculaire au prélèvement des tissus d'intérêt pour l'analyse. La technique chirurgicale sera validée dans un premier temps à la faveur d'euthanasies faites pour d'autres études afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux seront nés en captivité et proviendront d'élevages agréés à des fins scientifiques. Ils seront hébergés en groupe, dans des conditions enrichies en favorisant les interactions sociales. La mise en œuvre d'un suivi longitudinal par imagerie in vivo sur les animaux anesthésiés minimise le nombre d'animaux utilisés ainsi que la contrainte qui leur est imposée.

5161. L'hypertrophie ventriculaire gauche est la forme la plus courante d'hypertrophie cardiaque et une cause majeure de morbidité et de mortalité chez l'homme. Très peu de traitements sont actuellement disponibles ; la plupart vise à diminuer la pression artérielle comme p. ex. les inhibiteurs du système rénine-angiotensine, et aucun ne permet de remédier à l'hypertrophie ventriculaire. Notre hypothèse implique la compréhension de la pathologie dans ces débuts, notamment dans la phase inflammatoire quand l'hypertrophie n'est pas encore développée. Dans une étude précédente nous avons étudié cette hypertrophie dans un modèle de constriction de l'aorte chez le rat. Nous avons analysé l'expression de l'ensemble des chimiokines (petites protéines chimioattractantes) et leurs récepteurs dans le ventricule gauche du cœur hypertrophié et avons mis en évidence la surexpression des chimiokines liées au recrutement de monocytes/macrophages dans le ventricule gauche : de la famille des MCP (Monocyte chemotactic proteins) (CCL2, CCL7, CCL12) et de la famille des MIP (Macrophage Inflammatory Proteins) (CCL3, CCL4, CCL9) et leurs récepteurs (CCR2, CCR1, CCR5). Cette surexpression a lieu dans la phase inflammatoire tôt dans le développement de la pathologie.

Notre projet à long terme consiste en l'étude du rôle de la polarisation des macrophages dans le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche, ainsi que leur rôle dans le passage à l'insuffisance cardiaque pour pouvoir proposer de nouveaux outils thérapeutiques pour la pathologie. Afin de pouvoir profiter des avantages qu'offre l'espèce souris – souris génétiquement modifiées, séquences nucléotidiques disponibles, anticorps disponibles, un travail chez la souris s'avère nécessaire. Ce protocole est dédié à la mise au point du modèle de constriction de l'aorte chez la souris, beaucoup plus difficile dû à la taille des vaisseaux. Ce protocole d'optimisation technique et de validation de l'hypertrophie du ventricule gauche chez la souris nous permettra de choisir les meilleures conditions techniques pour la réalisation de la chirurgie, puis de prévoir le nombre optimal de souris par groupe pour les prochaines études. La technique de constriction de l'aorte chez la souris a été reportée dans la littérature mais une intubation et ventilation sont utilisées. Notre objectif est de mettre en place une technique mini-invasive de constriction de l'aorte chez la souris – une chirurgie complexe qui demande de l'entraînement.

116 souris au total seront utilisées:

- 50 souris Swiss âgées de 5 semaines (25-30g) pour la mise au point technique de la chirurgie
- puis 30 souris C57BL/6 âgées de 10 semaines (25-30g) une fois la technique mise au point chez la Swiss, pour la mise au point technique chez une souris plus âgée, plus grasse, dont les vaisseaux sont potentiellement plus petits. Les C57BL/6 sont les souris les plus utilisées dans ce modèle et les souris génétiquement modifiées sont généralement disponibles dans cette souche.

D'après l'expérience du chirurgien qui pratique cette opération chez le rat, ce nombre de 80 souris est le minimum nécessaire pour pouvoir apprendre à réaliser la technique chez la Swiss et la standardiser chez la C57BL/6.

- puis 36 souris C57BL/6 pour la réalisation d'une expérience complète qui permettra de déterminer le temps optimal de l'expérience (14 ou 21 jours), ainsi que de calculer le nombre de souris minimal nécessaire par lot permettant les analyses statistiques de l'augmentation du rapport poids du cœur/poids du corps, de l'augmentation de la surface du ventricule gauche et de l'augmentation de l'expression des ARNm de gènes liés à l'hypertrophie (ANP, BNP) après constriction de l'aorte vs l'opération factice. Cette expérience nous servira à publier la méthode de constriction de l'aorte mini-invasive avec le nombre minimal de souris par groupe et nous servira de base pour nos futures études utilisant des souris génétiquement modifiées ou des traitements thérapeutiques.

Ce projet servira également rétrospectivement à évaluer la souffrance des animaux durant la durée de l'expérience afin d'utiliser les conditions optimales pour nos prochaines études.

La chirurgie sera réalisée par un opérateur expérimenté ayant une grande expérience micro-chirurgicale, spécialiste actuellement du modèle de constriction de l'aorte chez le rat.

Nous exploiterons au maximum les données de cette étude en collectant des échantillons d'un part pour le calcul du rapport poids du cœur/poids du corps, et d'autre part pour la mise au point future d'immunomarquages en histologie, de dosages d'ARNm ou de protéines.

Le bien-être de l'animal sera assuré en respectant la surface des cages et en enrichissant le milieu par des tubes en carton. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'opération pour évaluer tout signe de souffrance : en cas de baisse du poids, de modification de l'apparence (comme les yeux mi-clos, le poil hérissé, le dos courbé, l'animal prostré), ou de problème post-chirurgical (saignement, ouverture de la cicatrice, infection cutanée), les animaux seront euthanasiés par administration intrapéritonéale d'une solution de kétamine et xylazine. Des anesthésiques à effet analgésique seront utilisés pendant l'opération afin d'éviter la douleur. La douleur post-opératoire sera prise en charge par l'administration de l'analgésique buprénorphine par voie intra-péritonéale.

Aucune méthode alternative (p. ex. cellulaire) ne permet de reproduire le développement de l'hypertrophie cardiaque ; les résultats scientifiques attendus nécessitent ce modèle animal.

5162. La consommation de charcuteries est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. Le fer sous forme hémique est proposé comme le principal responsable de cet effet en induisant une forte nitrosation luminale (formation de nitrosamines) et une forte peroxydation des lipides au niveau fécale. Compte tenu de cette forte association entre l'effet promoteur des charcuteries et la nitrosation, peroxydation luminale, ce projet va évaluer l'effet de différents apports en antioxydant pendant l'élevage des cochons sur la peroxydation et nitrosation luminale chez le rat après consommation de la charcuterie. Dans le cadre de ce projet, l'objet de la présente demande est de comparer dans un modèle animal classiquement utilisé en nutrition (25 rats Fisher F344 males de 5 semaines) différents apports en tocophérol et/ou sélénium (dans la ration du cochon) sur la modulation des biomarqueurs fécaux et urinaire de peroxydation et nitrosation, sur l'expression de gènes au niveau de la muqueuse colique. Cette expérimentation sera conduite dans la cadre de la règle des trois R, le nombre des animaux est réduit au maximum pour toutefois maintenir une puissance statistique suffisante, sans intervention sur les rongeurs (procédure non invasive avec contacts visuels et olfactifs maintenus entre les animaux) hors la distribution quotidienne de l'alimentation et la récupération des fèces et urines à J0 et de J7 à J14. Les rats seront hébergés dans des locaux d'animalerie conventionnels, leur assurant les meilleures conditions de vie et de bien-être. Il sera suivi les marqueurs de peroxydation lipidique dans les fèces et urines et les marqueurs de nitrosation dans les fèces. L'utilisation de modèle animal est indispensable car nous travaillons au niveau du côlon où le microbiote joue un rôle très important. A terme ce projet vise à limiter le risque de cancer du côlon associé à la consommation des charcuteries.

5163. La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative chronique qui touche 1 % de la population après 65 ans. On compte environ 100 000 malades en France, et 8 000 nouveaux cas se déclarent chaque année, un nombre qui est en augmentation constante.

Cette maladie touche les neurones dopaminergiques dans une région du cerveau profonde appelée "substance noire" qui dégénère progressivement. Ces neurones produisent la dopamine, un neurotransmetteur qui contrôle les mouvements automatiques du corps. L'objectif de nos études est de comprendre l'action d'une protéine propre à ces neurones, qui est essentielle à la survie de ces neurones et qui, ajoutée de l'extérieur, les protège dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson. Nous étudions donc au laboratoire cette protéine comme médicament dans la maladie de Parkinson pour a) protéger les neurones contre la dégénérescence et b) augmenter l'activité neuronale des neurones dopaminergiques. Le modèle utilisé sera la souris *Mus musculus*. La souris est devenue un modèle de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires régulant les grandes fonctions biologiques. Elle permet l'analyse in vivo de ces mécanismes et les conséquences de leurs perturbations par des manipulations génétiques et cela à différents niveaux : comportemental, physiologique et moléculaire. Elles permettent aussi de créer des modèles d'étude des pathologies humaines. Nous utilisons des modèles de la maladie chez la souris pour a) comprendre l'action de cette protéine et ses effets protecteurs, b) comprendre les voies de signalisation impliquées et ses cibles et c) tester l'efficacité de molécules qui se sont montrées efficaces dans des tests n'impliquant pas des souris vivantes. Nous remplaçons donc, dès que possible, les études sur les souris vivantes par des études sur des cellules en culture. Nous avons mis au point des techniques permettant de réduire par deux le nombre d'animaux nécessaire et nous optons pour des méthodes très sensibles qui permettent de faire plusieurs analyses à partir d'un seul prélèvement. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont appropriées pour réduire les plus possibles toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

Nous avons estimé, avec l'aide de programmes statistiques, le nombre minimal d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats scientifiquement exploitables. Nous comptons utiliser au total 856 souris. Les données quantitatives obtenues feront l'objet d'une analyse de variance suivie de tests post hoc.

Notre but est de porter cette protéine dans un essai préclinique comme médicament contre la mort des neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson.

5164. L'objectif général de ce projet de recherche est de caractériser les processus mis en œuvre lors de la réparation de la myéline dans le cerveau adulte. Les oligodendrocytes sont des cellules spécialisées dans la production de la gaine de myéline, laquelle entoure les fibres nerveuses, permettant ainsi leur isolation et une propagation rapide et efficace du signal. De nombreuses situations pathologiques (traumatismes, ischémies, inflammation) aboutissent à la mort des oligodendrocytes et à la démyélinisation des axones. L'exemple le plus fréquent est la Sclérose en plaques (SEP), maladie auto-immune se déclarant chez de jeunes adultes et aboutissant avec le temps à un handicap majeur (locomoteur, cécité, incontinence etc...). En effet, la démyélinisation induit d'abord des altérations de la conduction du signal nerveux, puis la dégénérescence des neurones démyélinisés, ce qui rend alors la perte de fonction irréversible. Les traitements actuellement proposés aux patients sont des immunomodulateurs et des anti-inflammatoires permettant de diminuer la fréquence et l'intensité des crises, mais inefficaces pour éviter l'évolution sur le long terme. Il est donc crucial de développer de nouvelles stratégies ciblant la rémyélinisation précoce des axones. Pour ce faire, il est indispensable de bien connaître les mécanismes mis en jeu au cours du processus de remyélinisation. L'analyse post-mortem de cerveaux de patients atteints de SEP a permis de montrer qu'il existe un processus de remyélinisation spontané, mais celui-ci est très variable d'un patient à l'autre et même d'une lésion à l'autre au sein du même patient, rendant la récupération fonctionnelle insatisfaisante. Les rongeurs présentent un potentiel de rémyélinisation spontané plus développé que l'homme, et l'étude de modèles murins de SEP a permis d'identifier différents types cellulaires participant à la régénération de la myéline. Notre projet vise à mieux caractériser ces différentes populations cellulaires et leur contribution à la remyélinisation. Ainsi, nous étudierons le rôle (1) des cellules souches neurales résidant dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) du cerveau adulte, (2) des progéniteurs d'oligodendrocytes (OPC) disséminés dans l'ensemble du parenchyme cérébral, et (3) des OLG matures périlésionnels.

Ce projet de recherche mobilisera toutes les ressources humaines et financière de l'équipe sur une durée de 5 ans.

Les principes de Remplacement, de Réduction, et de Raffinement seront strictement mis en application :

- Remplacement :

Malheureusement, l'étude de la réparation de la myéline nécessite l'utilisation de modèles murins de sclérose en plaques. Cependant certaines questions de biologie cellulaire fondamentale, peuvent être adressées sur des modèles de cultures cellulaires (cultures primaires mais aussi lignées cellulaires). Nous privilégions, quand c'est possible, l'utilisation de cultures cellulaires plutôt que le travail sur animal vivant.

- Réduction :

Le maintien des animaux dans un statut sanitaire EOPS permet de limiter les variabilités inter-individuelles et les biais expérimentaux qui nécessitent souvent d'augmenter le nombre d'animaux utilisés pour obtenir des résultats significatifs. De plus, la planification des expériences en intégrant une analyse statistique (test de puissance) pour déterminer le nombre minimal d'animaux nécessaires pour l'obtention de résultats robustes nous permet de réduire autant que possible le nombre d'animaux sacrifiés (360 souris "sauvages", 1400 souris génétiquement modifiées).

- Raffinement :

L'animalerie du laboratoire est agréée. Les animaux sont donc entretenus dans un parfait état de santé. L'ajout de nouveaux objets (en alternance chaque semaine : nid, coton, morceaux de bois...) permet d'enrichir le milieu pour le bien être des souris.

Le personnel formé s'occupe de l'entretien des animaux et contrôle quotidiennement l'absence d'anomalies chez les animaux ou dans leur environnement. Ainsi, en cas de signes de souffrance animale, des mesures correctives peuvent être prises très rapidement. Conformément à la réglementation, une structure du bien-être animal a été mise en place au laboratoire, permettant un suivi des procédures et une communication optimale entre animaliers et expérimentateurs. En pratique, une formation sérieuse aux

procédures expérimentales utilisées dans ce projet est assurée par des chercheurs expérimentés de façon à ce que celles-ci soient réalisées dans les règles de l'art.

Enfin, des injections d'anti-inflammatoire et/ou d'antalgiques sont effectuées lorsque les procédures expérimentales sont susceptibles d'induire une douleur.

5165. La consommation de charcuteries est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. Les données épidémiologiques, rapportées dans le rapport de l'OMS (The Lancet Oncology, 2015) ont été consolidées par des études expérimentales du laboratoire à l'aide de modèle animaux. Ces études animales ont permis de déterminer les mécanismes impliqués : le fer sous forme héminique est proposé comme le principal responsable de cet effet promoteur. Cette promotion de la carcinogenèse colorectale par le fer héminique, est expliquée par une formation importante de composés toxiques dans la lumière colique. La nitrosation luminale est expliquée en moins en partie par l'interaction entre le fer héminique de la viande de porc utilisée pour produire la charcuterie et le sel nitrité rajouté pendant la fabrication. Compte tenu de cette forte association entre l'effet promoteur des charcuteries et la nitrosation / peroxydation luminale, ce projet va évaluer l'effet de différents apports de nitrites pendant la fabrication des charcuteries sur la formation des composés toxiques au niveau du côlon. Ce projet vise à comparer différents apports en nitrite dans du jambon cuit sur la modulation des biomarqueurs fécaux de la carcinogenèse colorectale lorsque le nitrite est apporté par du sel nitrité ou synthétisé à partir de nitrates d'un jus de légumes via une flore technologique inoculée volontairement. Ce projet sera centré sur le suivi de biomarqueurs fécaux et urinaires lors d'une expérimentation nutritionnelle de 15 jours chez le rat Fischer 344 avec des groupes expérimentaux de 5 rats par groupe (soit 30 rats au total pour 6 groupes expérimentaux, dans la cadre de la règle des trois R, le nombre des animaux est réduit au maximum pour toutefois maintenir une puissance statistique suffisante) sans intervention sur les rongeurs (procédure non invasive avec contacts visuels et olfactifs maintenus entre les animaux) hors la distribution quotidienne de l'alimentation et la récupération des fèces et urines à J0 et de J7 à J14.

5166. La taurine est un acide aminé dont les propriétés anti-oxydantes et protectrices sont largement étudiées. Elle semble jouer un rôle prépondérant au niveau de la rétine, où la baisse de sa concentration est associée à la mort des photorécepteurs et des cellules ganglionnaires, dont les prolongements forment le nerf optique. Les taux plasmatique et vitréen de taurine baissant au cours d'un diabète, ceci pourrait entraîner une diminution de la taurine rétinienne, et contribuer aux symptômes visuels associés à cette maladie. Comme la taurine est fournie en large partie par l'alimentation, elle pourrait être un nutriment permettant de préserver la rétine chez les patients diabétiques.

L'étude proposée consiste, chez des souris diabétiques de type 1 (absence de production d'insuline), à mesurer les taux rétinien et plasmatiques de cet acide aminé, en recherchant une corrélation entre ces taux et les anomalies rétiniennes anatomiques et fonctionnelles, ainsi qu'un effet protecteur d'une supplémentation en taurine via l'eau de boisson.

La littérature taurine + rétine est beaucoup plus étoffée chez les mammifères que chez les vertébrés aquatiques (232 articles pour le rat, 47 pour la souris, 4 pour le poisson-zèbre). De plus la tension en oxygène est plus élevée chez les animaux aquatiques que chez les mammifères, ce qui peut interférer avec l'action anti-oxydante de la taurine. Les effets du diabète sur la rétine sont également mieux caractérisés chez les mammifères que chez les poissons (589 articles souris + diabète + rétine, 4 chez le poisson-zèbre). Si la concentration plasmatique de taurine est plus élevée chez les rongeurs que chez les primates, la concentration rétinienne mesurée chez la souris est proche de celle rapportée chez le singe (elle n'a pas encore été déterminée chez l'homme). La souris nous semble donc être un modèle approprié pour étudier les interactions entre diabète et taurine au niveau de la rétine, et rechercher un effet protecteur de cet acide aminé sur les lésions rétiniennes précoces causées par le diabète.

A part les dosages de taurine, réalisés post mortem, les expériences proposées reprennent des approches de clinique humaine (électrorétinographie, imagerie de l'œil, dosage du glucose dans le sang) réalisées sans anesthésie chez les patients. Elles seront pratiquées de façon équivalente chez la souris, mais sous anesthésie puisque qu'elles nécessitent l'immobilité du "patient". L'anesthésie gazeuse sera préférée à une anesthésie par injection pour le dosage du glucose et l'imagerie de l'œil, expériences courtes. Un anesthésique local sera utilisé pour l'électrorétinographie, afin de minimiser l'inconfort pouvant être causé par le contact de l'électrode sur la cornée. Pendant toute la période de diabète, les animaux seront régulièrement observés, avec un change des cages tous les deux jours, un suivi de la glycémie et un apport d'insuline si besoin. Le nombre total de souris nécessaires à l'étude (88) a été établi en fonction de la baisse espérée du taux rétinien de taurine et des écart-types des mesures de ce type déjà effectuées, afin d'assurer la validité statistique des résultats.

5167. L'information visuelle véhiculée par la lumière, encodée par la rétine, est envoyée aux structures cérébrales responsables de la vision mais la lumière joue également un rôle essentiel comme synchroniseur entre l'environnement, la physiologie interne et le comportement (i.e. dépression liée au travail posté, agressivité). Récemment, il a été démontré que la lumière pouvait influencer l'humeur, notamment dans le trouble affectif saisonnier ou encore dans la dépression induite par le décalage horaire. Ces effets passent par le tractus rétinohypothalamique, constitué majoritairement par les axones des cellules ganglionnaires intrinsèquement photosensibles à mélanopsine de la rétine et les centres de traitements supérieurs dont l'horloge biologique principale localisée dans les noyaux suprachiasmatiques (NSC) de l'hypothalamus. Ce système mélanopsinergique est particulièrement sensible à la lumière bleue (480nm) et il a été récemment démontré, que la lumière bleue émise par l'utilisation d'outils numériques à des heures inappropriées entraînait des dérèglements du rythme circadien et une diminution de la vigilance matinale. L'utilisation régulière en soirée des smartphones et des ordinateurs peut provoquer une aggravation des troubles du

sommeil et des rythmes circadiens, pouvant entraîner divers effets comportementaux, notamment une augmentation de l'agressivité. En replaçant ces informations dans le contexte général de l'endocrinement et le recrutement à distance à travers internet, nous pourrions nous demander comment évolue le comportement d'une personne à travers différentes phases qui se succèdent de l'exposition répétée à de la lumière toxique (bleue) à des moments inappropriés (la nuit) à une agressivité extrême envers d'autres hommes. Notre objectif est de préciser les changements physiologiques de la rétine induits par l'exposition inappropriée à de la lumière bleue mais également son effet en aval notamment au niveau hypothalamique et sur le circuit de l'agression (amygdale médian, septum latéral (agressivité), et cortex orbitofrontal (prise de décision, contrôle et inhibition comportementale, agressivité)). Notre travail permettra d'établir l'implication de la voie mélanopsinergique dans le traitement de l'information lumineuse de façon à influencer le circuit cérébral du comportement agressif. Cette question est importante pour comprendre comment le fonctionnement du cerveau peut être modifié par l'environnement dans certains contextes (i.e. endocrinement dans le terrorisme). Nous souhaitons étudier l'effet de la lumière bleue sur le cerveau et nos résultats pourraient contribuer à établir des méthodes simples (photothérapies) pour limiter l'agressivité en éliminant les facteurs synergiques (telles la lumière, les drogues) dans la population.

Nous porterons une attention particulière aux aspects éthiques de la recherche sur animal. En termes de remplacement, nous ne pouvons pas travailler sur des cellules isolées car notre étude porte sur la rétine, ses projections vers l'hypothalamus, le dosage de neurotransmetteurs dans le cerveau et les tests comportementaux résident-intrus pour évaluer l'agressivité des animaux. En termes de réduction, nous avons établi un nombre d'animaux à 12 par groupe expérimental (tests statistiques de type ANOVA) pour obtenir des résultats statistiquement valides et nous aurons besoin de 232 souris au total sur 5 ans (récapitulatif annexe 2). En termes de raffinement, le milieu sera enrichi avec un nid et un barreau à ronger. Ce projet ne nécessite pas une approche invasive et le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux tout au long de l'expérience (habituation à l'expérimentateur, anesthésiques, analgésiques, suivi du score de douleur annexe 1).

5168. Aujourd'hui, l'industrie des biomédicaments, tels que les anticorps monoclonaux est en plein essor. En effet leur utilisation a complètement modifié la prise en charge des patients atteints de cancers, de maladies auto-immunes et/ou inflammatoires. Ces anticorps thérapeutiques offrent un vrai potentiel pour le traitement des maladies respiratoires, notamment des infections respiratoires qui sont la première cause de mortalité infectieuse chez l'enfant, dans le monde, et des facteurs aggravant les pathologies respiratoires chroniques.

Aujourd'hui les anticorps disponibles sur le marché sont majoritairement administrés par la voie intraveineuse, qui n'est pas optimale pour le ciblage pulmonaire, et est invasive. D'autres voies alternatives sont donc envisagées pour administrer les anticorps.

La voie pulmonaire est utilisée depuis longtemps pour délivrer des petites molécules pour le traitement de certaines pathologies respiratoires (exemple les broncho-dilatateurs pour l'asthme). L'administration par voie pulmonaire est non-invasive, permettant d'envisager un traitement à domicile, ce qui est plus confortable pour le patient et réduit les coûts supportés par la société.

Nos travaux antérieurs ont déjà permis de démontrer que cette voie d'administration était pertinente pour certains formats d'anticorps thérapeutiques (anticorps entiers). L'administration pulmonaire d'anticorps entiers permet d'obtenir une réponse thérapeutique dans différents modèles animaux de pathologies respiratoires et limite la diffusion des anticorps dans le sang, ce qui réduirait de possibles effets systémiques indésirables.

Dans le cadre de ce projet, il s'agira de comparer la voie pulmonaire qui émerge (intra-nasale ou Microsprayer™) aux autres voies d'administration (sous-cutanée, intrapéritonéale, intraveineuse), pour démontrer sa supériorité pour le traitement des infections respiratoires. Pour se rapprocher des conditions d'utilisation en clinique nous utiliserons deux modalités d'administration : préventive (avant l'infection) ou curative (après infection, lorsque la rupture de la barrière alvéolo capillaire commence à se mettre en place). L'administration curative permettant aussi de reproduire une situation avec une rupture partielle de la barrière alvéolo-capillaire, qui peut être rencontrée chez les patients.

Nous élargirons aussi notre étude aux fragments d'anticorps, puisque les anticorps thérapeutiques existent sous différents formats, avec des propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques spécifiques. En effet, les fragments pourraient avoir un comportement différent de celui des anticorps entiers selon la voie d'administration.

Par ailleurs, afin d'avoir une approche plus mécanistique du devenir des anticorps, nous étudierons l'impact de la protéine FcRn sur le devenir des différents formats d'anticorps. En effet, il est connu que la protéine FcRn (Neonatal Fc Receptor) joue un rôle dans la biodisponibilité des anticorps entiers. Il sera intéressant de comparer le comportement des fragments d'anticorps en présence ou en absence de FcRn.

Le projet se découpera donc en trois parties : 1) comparaison de l'efficacité thérapeutique et du devenir de 7 formats d'anticorps dans un modèle de poumon intact (approche préventive) 2) comparaison de l'efficacité thérapeutique et du devenir de 7 formats d'anticorps dans un modèle de poumon lésé (rupture de la barrière alvéolo-capillaire, approche curative). 3) Etude de l'impact du FcRn sur le devenir des différents formats d'anticorps thérapeutiques, administrés par voie pulmonaire

Le projet fait intervenir 8 procédures et un total de 5232 animaux sur 5 ans.

Afin de respecter la Règle des 3R :

Remplacer : les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse thérapeutique, d'un organisme entier, à une infection pulmonaire et sont insuffisants pour envisager des essais cliniques chez l'Homme. Les modèles murins d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* sont bien établis et permettent de mimer le phénomène observé chez l'Homme.

Réduire : le modèle d'infection à *P. aeruginosa* est maîtrisé par l'équipe, ce qui permet de limiter les étapes de mises au point. De plus, les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter le nombre d'animaux. La

souris est le modèle le plus adapté pour ces études précliniques car nous pouvons étudier la pharmacologie et l'efficacité de ces médicaments en présence (souris WT) ou absence du FcRn (souris transgénique FcRn KO).

Raffiner : les souris seront élevées en communauté dans des cages enrichies avec du papier et des fragments de boîte à œuf. La grande majorité des procédures sera réalisée pour limiter la souffrance des animaux (anesthésie,...).

5169. Dans le cadre de recherche de nouveaux traitements ciblant divers types de cancers, nous souhaitons mettre en place plusieurs modèles de croissance tumorale chez la Souris.

En effet, afin de permettre un développement cohérent et objectif de vaccins, nous avons besoin de données sur les croissances tumorales, en termes de rapidité de croissance, de potentielles métastases et de la proportion de tumeurs se développant.

Ce projet vise donc à étudier en parallèle plusieurs lignées de cellules tumorales déjà documentées, afin de les injecter dans des animaux contrôles et de nous fournir des données sur chacune d'entre-elles permettant de mettre ensuite en place des projets adéquats en terme de calendrier vaccinal, mais aussi en nombre d'animaux.

Cette démarche s'inscrit dans une optique de raffinement et de réduction du nombre d'animaux expérimentaux nécessaire à la bonne conduite des études à venir, tout en permettant d'obtenir des conclusions valides et robustes sur l'efficacité des traitements développés.

10 lignées tumorales seront ainsi testées afin d'être documentées et de confirmer les données préalablement établies dans d'autres établissements.

Il s'inscrit dans le domaine de la recherche préclinique, avec pour but de développer de nouveaux traitements contre certaines tumeurs.

Chaque lignée cellulaire sera testée sur 10 animaux.

Nous disposons d'ors et déjà d'information sur les rythme de croissance et les métastases attendues, néanmoins, de fortes variations inter-établissement peuvent apparaître, du fait de cause externes (type d'aliment, de litière, fond génétique des animaux..).

Les cellules tumorales seront injectées par voie sous-cutanée au niveau du flanc. Le protocole consistera à mettre en évidence ensuite la croissance tumorale, mesurée 3 fois par semaine de manière externe.

Un suivi de poids hebdomadaire permettra aussi de surveiller le bien-être des animaux.

Les animaux seront observés quotidiennement pour s'assurer que leur état de santé n'est pas détérioré.

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

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

Ainsi, un effectif de 10 animaux par groupe constitue un minimum acceptable d'un point de vue scientifique tout en se conformant aux principes de réduction liés à l'éthique. Ce type de protocole ne peut pas être remplacé par une approche alternative n'utilisant pas d'animaux, en effet, le modèle tumoral doit s'implanter dans un organisme vivant complexe, afin d'exprimer l'ensemble des marqueurs et des caractéristiques des tumeurs que l'on cherche à traiter.

5170. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) induit une inflammation chronique chez les patients séropositifs qui persiste même sous traitement antiviral efficace. Cette inflammation résiduelle, notamment lorsqu'elle est associée à une activation des monocytes dans le sang et des macrophages dans les tissus, est responsable de la morbidité et de la mortalité chez les patients sous traitement. Certains primates non humains (PNH) d'Afrique comme les singes verts, hôtes naturels des virus de l'immunodéficience simienne (SIV, équivalent du VIH chez l'homme), sont naturellement protégés contre l'évolution de la maladie et présentent une infection non pathogène. Cette protection est associée à une absence d'inflammation. En revanche, les PNH d'Asie comme les macaques, infectés par le SIV développent une inflammation persistante et un SIDA. L'étude de la relation hôte-pathogène chez les PNH permet donc de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de l'inflammation observée dans l'infection de l'homme par le VIH.

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

Ce projet prévoit au maximum 34 PNH nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Leur nombre dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques et permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : inoculation virale et prélèvements de sang, de fluides muqueux et biopsies sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Des échantillons biologiques produits dans ce projet seront partagés avec d'autres laboratoires. Les animaux seront hébergés par paires

avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure chargée du bien-être animal de l'établissement.

5171. Domaine: Le virus Dysgénésique et Respiratoire Porcin (Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus ou PRRSV en anglais) infecte principalement le placenta et certaines cellules immunitaires du poumon. Chez la truie gestante ce virus peut provoquer des avortements et des malformations des porcelets. Chez l'adulte ce virus induit un état d'immunodépression rendant les animaux beaucoup plus susceptibles aux autres maladies pulmonaires (grippe, circovirus, etc.). En plus de la perte de bien-être des animaux, ce virus provoque une chute de la reproduction ainsi qu'une baisse du taux de croissance des porcs adultes, et est pour cela le principal agent infectieux responsable des pertes en élevage porcin. Les vaccins aujourd'hui utilisés sont soit de type inactivés (virus tués), très peu efficaces, soit de type atténué (virus vivant non pathogène), et dans ce dernier cas leur capacité de protection des animaux est meilleure sans être idéale. De plus les virus atténués étant vivants, il existe un risque important de mutations de ces souches vaccinales les rendant à nouveau fortement infectieux et pathogènes.

Il est donc urgent de développer une stratégie vaccinale alternative aux vaccinations aujourd'hui utilisées contre le PRRSV. La vaccination ADN ou plasmidique est un mode alternatif de vaccination qui présente de nombreux atouts. Il s'agit d'injecter à l'animal un ADN inerte, qui une fois injecté permettra la production de petites parties (antigènes) du virus, sans jamais produire un virus complet. Ces antigènes, reconnus par le système immunitaire permettront l'induction d'une réponse immunitaire protectrice contre le virus. L'objectif de cette DAP est de développer un vaccin ADN contre le PRRSV qui soit efficace, sûr, peu coûteux, et facile d'utilisation en élevage. En particulier nous proposons i) d'identifier les antigènes du PRRSV à inclure dans le vaccin ADN, ii) d'optimiser l'immunogénicité du vaccin ADN chez le porc en jouant sur la voie d'administration (patches cutanés ou injection intramusculaire), la formulation (adjuvant ou non) ainsi que sur la forme des antigènes produits permettant de faciliter leur reconnaissance par le système immunitaire, et iii) d'évaluer la protection des porcs vaccinés à l'aide de ces nouveaux vaccins par des infections expérimentales

Règle des trois R :

Remplacement: le projet portant sur la vaccination, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Les animaux utilisés sont des porcs qui proviennent d'élevages autorisés.

Réduction : le projet prévoit le recours à un maximum de 264 animaux provenant d'élevages autorisés. Le nombre a été réduit au minimum pour permettre une analyse statistique fiable. Des expériences seront conduites en chaine pour affiner les paramètres sur la base de résultats successifs, et pour réduire ainsi le nombre de lots d'animaux de manière rationnelle.

Raffinement: 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 éventuel sachant que i) l'administration de plasmide dans de bonnes conditions n'induit pas de douleur et que ii) l'infection expérimentale du porc post-sevrage par le virus PRRSV induit une expression clinique modérée (fièvre, toux). Lors de l'administration des vaccins, les porcs seront anesthésiés pour éviter tout inconfort selon un protocole validé par un vétérinaire. La grille de douleur nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Si une inflammation aigue avec nécrose était observée après l'administration de vaccins, ou si une symptomatologie sévère était observée lors de l'épreuve, les porcs seraient euthanasiés.

5172. Afin de soigner les traumatismes impliquant la section de nerf, les techniques de réparation nerveuse ont considérablement évolué ces dernières années. Lorsqu'une suture directe n'est pas envisageable, des techniques de réparation par interposition (utilisation de guide) sont nécessaires. Cependant la taille perdue du nerf reste une limitation pour la réparation fonctionnelle. Ainsi, malgré l'efficacité de l'utilisation de conduits de collagène pour la régénération de défauts de petite taille, la seule technique efficace pour la régénération de défauts plus critiques (> 1cm chez le rat) est l'implantation de greffes autologues prélevés dans une autre région du corps du patient. Par conséquent, plusieurs articles mentionnent le besoin de guides synthétiques sous forme de conduits pour permettre une régénération plus efficace des défauts de grande taille des nerfs périphériques.

Ce projet a pour but d'évaluer la capacité de conduits synthétiques possédant des structures internes à régénérer des défauts supérieurs à 1 cm chez le rat. Tous les matériaux utilisés pour la production de ces «scaffolds» /conduits sont biocompatibles, biodégradables et ont précédemment été évalués avec succès dans la régénération des défauts du nerf périphérique de petite taille (1cm) chez le rat.

Chaque groupe expérimental du plan d'étude comporte 12 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Dans le cadre du respect de la règle des 3R, aucune méthode de remplacement ne peut être utilisée pour étudier la problématique du présent projet (culture cellulaire, analyse in silico ou modélisation bio-informatique). 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. Un suivi de la douleur et des points limites seront mis en place lors de la surveillance quotidienne des animaux. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisé.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 168 rats est envisagée.

5173. Le glioblastome (GB) représente la tumeur primitive du système nerveux central la plus fréquente et la plus agressive. Le traitement standard consiste en une exérèse chirurgicale suivie d'une radiothérapie et d'une chimiothérapie concomitante et adjuvante par Témazolomide. Cependant, le pronostic des patients reste particulièrement mauvais avec, dans 90% des cas une récurrence locale dans la zone péri-tumorale, conduisant à une médiane de survie autour de 14 mois. Trouver des outils permettant

d'éliminer les cellules tumorales infiltrées dans cette zone est un véritable challenge car il est très difficile de détruire les cellules tumorales sans détruire les cellules nerveuses normales. Nous souhaitons développer un « piège à tumeur » dont le principe consiste à placer dans la cavité de résection tumorale, une matrice chargée en facteurs attractifs, capable d'attirer les cellules tumorales résiduelles de la zone péri-tumorale et de les emprisonner afin de les détruire plus facilement par une radiochirurgie stéréotaxique. Pour mettre en place ce « piège à tumeur », il faut tout d'abord identifier une matrice de fabrication simple, biocompatible et facilement implantable. Nous avons sélectionné une matrice de cellulose qui est un polymère largement utilisé lors des procédures chirurgicales via les dispositifs de la gamme SURGICEL® pour contrôler les hémorragies. Nous avons validé in vitro que cette matrice était capable de piéger les cellules de GB via leur adhérence au maillage. Avant d'intégrer des facteurs attractifs dans la matrice, il est important d'analyser son intégration et son évolution dans le parenchyme cérébral de rats. Ayant montré in vitro que la matrice de cellulose pouvait être détectée par IRM, nous avons choisi de privilégier cette méthode d'analyse non invasive pour suivre l'évolution au cours du temps de la matrice in vivo permettant de réduire au minimum le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation du projet. De plus, pour limiter la souffrance des animaux, l'implantation de la matrice de cellulose dans le parenchyme cérébral des rats s'effectuera sous anesthésie générale et un traitement analgésique post-opératoire sera effectué pendant 3 jours. Un nombre total de 60 rats sera utilisé pour effectuer cette étude.

5174. Le diagnostic précis et précoce des tumeurs, ainsi que le développement de thérapies ciblées sont deux axes majeurs de développement en cancérologie. Dans ce contexte, les nanoparticules sont apparues comme des candidats prometteurs au cours des deux dernières décennies. En effet, les nanoparticules présentent de nombreuses propriétés qui améliorent leur détection par les différentes techniques d'imagerie.

Dans ce cadre, nous développons des nanoparticules à base de Gadolinium et d'Or.

Les premières études réalisées avec ces particules montrent qu'elles ne présentent pas de toxicité, qu'elles sont détectables par différentes méthodes d'imagerie et qu'elles s'accumulent dans les tumeurs de manière passive. Il est maintenant indispensable de les modifier pour qu'elles reconnaissent les tumeurs de manière spécifique. Cela permettra d'améliorer le diagnostic et de réaliser un suivi de l'effet du traitement. Une étude réalisée in vitro, nous a déjà permis de montrer qu'en modifiant les particules choisies elles pouvaient reconnaître spécifiquement les cellules tumorales. Une étude préclinique, couplant IRM et imagerie de fluorescence, est maintenant nécessaire avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme.

Nous avons choisi de réaliser cette étude sur différents modèles de tumeurs cérébrales (primaires et métastases). Nous étudierons un modèle de gliome humain implanté chez la souris Nude. Les souris Nude immunodéficientes représentent le modèle permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Nous travaillerons également sur un modèle de gliome de rat implanté chez des rats et sur un modèle de métastases cérébrales de mélanome implanté chez la souris.

Ces modèles sont connus et bien maîtrisés par nos laboratoires. Nous utiliserons les animaux à un stade où ils ne présentent pas de signes cliniques. Les animaux seront surveillés quotidiennement, ce qui permettra d'anticiper leur souffrance.

Tous les animaux seront hébergés dans un environnement contrôlé. Dans cette étude, nous utiliserons 204 souris Nude, 102 rats et 102 souris C57BL/6J. Afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous avons décomposé l'étude en 2 pré-expériences qui nous permettront de déterminer les paramètres optimaux à utiliser pour l'expérience à proprement dit.

- 1ère pré-expérience : Détermination de la concentration optimale de nanoparticules à injecter (4 animaux par groupe, en prenant en compte les variabilités inter-individus).

- 2ème pré-expérience : Evaluation la cinétique fine de biodistribution des nanoparticules avec les deux modalités d'imagerie (4 animaux par groupe, en prenant en compte les variabilités inter-individus). Evaluer le ciblage tumoral actif (3 groupes de 9 animaux, nombre nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables).

Des mesures antalgiques appropriées seront mise en œuvre.

5175. Un dysfonctionnement du système immunitaire peut provoquer la rupture de la tolérance au soi et être à l'origine du développement de maladies auto-immunes. Ainsi, la connaissance approfondie des mécanismes immunologiques impliqués dans la tolérance représente un enjeu capital pour améliorer à la fois la compréhension et le traitement des maladies auto-immunes.

L'objectif de ce projet est d'établir un nouveau modèle animal déficient pour le gène IL-34, codant pour une cytokine aux propriétés tolérogènes, et de caractériser ces animaux aux niveaux phénotypiques et fonctionnels.

Des souris knock-out pour l'IL-34 existent depuis 2012 mais le choix du rat repose essentiellement sur le fait que ces animaux présentent de fortes similitudes génétiques et immunologiques avec l'Homme par rapport à la souris.

Les rats déficients pour l'IL-34 ont été générés par la technique reposant sur le système CRISPR/Cas9 dans une souche de rats Sprague-Dawley.

Après établissement d'un élevage de rats KO IL-34 ayant un statut homozygote pour la mutation, une étude du phénotype de ces animaux du point de vue immunologique sera réalisée ainsi que des études fonctionnelles.

Utilisation maximum des animaux pour les procédures expérimentales limitée à 120

La mise en place de la règle des 3R étant crucial pour nous, le nombre d'animaux a été réduit au maximum, un tableau complet définissant les points limites a été établi afin qu'aucun animal ne se retrouve dans un état de souffrance important. De plus, afin d'améliorer leurs conditions de vie et d'éviter l'angoisse, des produits d'enrichissement sont placés dans la cage (rouleau de carton + « paper wool »).

5176. Le diabète de type 2 est une maladie surtout présente dans les pays développés, qui touche principalement les sujets adultes. Il s'agit de la forme de diabète la plus fréquente. Cette maladie est caractérisée par une résistance à l'insuline par les cellules de l'organisme. Ce qui entraîne dans un premier temps une augmentation de la production d'insuline, puis dans un second temps à un déficit en insuline suite à un épuisement du pancréas. Les traitements disponibles ne sont pas satisfaisants car le corps s'y habitue, il faut donc augmenter les doses et changer de classe thérapeutique. Par ailleurs, ils sont connus pour avoir de nombreux effets indésirables. C'est pourquoi, une équipe de recherche est en train de développer un nouveau traitement. De nombreuses études in vivo et in vitro ont montré qu'il permet une diminution de la quantité de glucose circulant dans le sang sans provoquer d'hypoglycémie. Toutefois, il est intéressant de se demander si cette molécule agit également sur les mécanismes de dépenses énergétiques, ainsi que sur la consommation alimentaire et en eau. C'est pourquoi nous allons étudier l'impact de cette nouvelle molécule sur les dépenses énergétique chez des souris diabétiques.

Ces analyses sont faites sur des souris ayant un diabète de type 2 dû à une mutation génétique. La cohorte est composée de 24 mâles de 12 semaines. 12 animaux seront traités par une injection en intra-péritonéale de 250 microlitres de solution saline contenant le traitement à tester, les 12 autres représentent le groupe contrôle.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante :

Ce projet implique une analyse comportementale déjà bien caractérisée chez la souris. Le nombre d'animaux utilisé sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. Ainsi 12 animaux par groupe seront utilisés. Ainsi un total de 24 souris seront utilisées pour ce projet. Enfin, nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes. Les animaux seront logés dans les meilleures conditions possibles. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie.

5177. Nos précédents travaux ont permis de mettre en évidence l'effet bénéfique d'une association de 5 extraits de végétaux sur le métabolisme de souris diabétiques, à travers différents paramètres mesurés, tels que la glycémie, les tests de tolérance à l'insuline ou à l'amidon, le profil lipidique sérique ou la composition corporelle. De cet extrait, plusieurs purifications ont été réalisées pour déterminer les principales molécules actives du mélange.

L'objectif de ce travail est de tester l'effet de ces molécules seules ou en combinaison sur le métabolisme de souris diabétiques, en comparaison avec un traitement de référence chez le diabétique, la metformine.

Les traitements seront incorporés dans la nourriture des animaux sur une durée de 8 semaines. Le projet inclut 6 groupes de 14 souris diabétiques âgées de 8 semaines en début de protocole.

Les procédures réalisées sur les animaux (pesée, composition corporelle, injection d'insuline, mesure de la glycémie à jeun) sont pour la plupart non-invasives et réalisées sans anesthésie car elles n'engendrent qu'un état de stress minimal.

Le modèle de souris diabétique est particulièrement bien adapté à l'étude des syndromes du diabète, l'âge choisi correspond au début du développement du syndrome métabolique chez ce modèle. Le recours à un modèle in vitro n'est pas souhaitable car les modèles cellulaires de mimétisme du diabète de type 2 sont très incomplets et peu représentatifs du fonctionnement in vivo.

Une justification statistique prédictive du nombre d'animaux nécessaire par groupe a été établie à partir de travaux similaires réalisés sur le même modèle, un minimum de 14 animaux par groupe est ainsi nécessaire pour mettre en évidence un résultat statistiquement significatif. Une attention particulière sera prêtée au comportement des animaux par les expérimentateurs et la personne chargée du bien-être animal afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes de douleur chez l'animal, auquel cas ce dernier serait immédiatement sorti du protocole. Un nombre maximal de 84 souris db/db seront utilisées pour ces travaux de recherche.

5178. Le muscle, outre sa fonction locomotrice, est le principal réservoir d'acides aminés mobilisables pour assurer la survie de l'organisme en cas de situations pathologiques. La préservation du capital musculaire contribue au maintien de la bonne santé.

La masse musculaire dépend d'un équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines sous la dépendance directe de l'apport en acides aminés issus de la digestion des protéines alimentaires. Un déséquilibre, lié à une pathologie ou au vieillissement, entre les vitesses de synthèse et de dégradation protéique entraîne une fonte musculaire. Si les causes peuvent être différentes, il a été systématiquement observé une diminution de l'effet anabolique du repas, même si celui-ci contient l'apport protéique conseillé. Ceci s'explique par la mise en place d'une résistance de la synthèse des protéines musculaires à l'effet stimulateur des acides aminés issus de la digestion des protéines alimentaires. En d'autres termes, dans ces situations, il faut apporter plus d'acides aminés et donc générer une aminoacidémie plus importante suite à l'absorption d'un repas (phase post-prandiale) pour créer un effet anabolique similaire à celui obtenu chez un individu dont le capital musculaire est normal et non-résistant.

Jusqu'à présent, la majeure partie des études se sont focalisées sur l'apport de protéines à digestion rapide générant rapidement d'importantes aminoacidémies et à forte teneur en leucine. Ces études ont montré que l'hyperaminoacidémie est un levier important pour restimuler la synthèse des protéines quand celle-ci devient moins sensible à la prise alimentaire et ceci quel que soit la situation physiopathologique étudiée.

Le maintien de la masse protéique musculaire ou la récupération de son capital musculaire après un état d'atrophie dépend donc de la capacité des acides aminés alimentaires à stimuler de façon maximale l'anabolisme protéique (hyperaminoacidémie adaptée).

Un autre facteur prépondérant dans le gain de masse musculaire est la durée pendant laquelle l'anabolisme va être présent et efficace pour générer une accréation (gain net) protéique dans les muscles. Plus la période d'accréation protéique post-prandiale sera longue, plus les protéines alimentaires seront efficaces pour la synthèse musculaire.

Ce projet fait suite à un autre projet dans lequel nous avons proposé des stratégies innovantes pour palier à la résistance anabolique à l'effet du repas. Ces stratégies étaient basées sur l'étude de l'effet cinétique de protéines lentes ou rapides (caséine vs lactosérum ou protéines végétales) et la modification cinétique des apports énergétiques. Nous avons montré que la protéine à digestion lente (caséine) ne permet pas de stimuler la synthèse protéique musculaire chez le rat âgé et confirmé ainsi la résistance anabolique à l'effet du repas déjà observée. Les deux autres régimes testés ont permis de contrecarrer la résistance anabolique en permettant une stimulation de la synthèse protéique musculaire. Cependant, même si l'intensité de la réponse semble identique, elle se produit à des temps différents et il semble que les effets des protéines alimentaires soient médiés par des facteurs ou voies de signalisation différentes.

L'objectif de ce nouveau projet sera de comparer l'intensité et la cinétique de l'effet anabolique de différents régimes contenant des protéines végétales seules ou en mélange avec du lactosérum.

Le modèle choisi est le rat Wistar âgé (20 mois) connu pour présenter une résistance anabolique.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R pour l'expérimentation animale. Nous ne pouvons pas remplacer cette expérimentation animale par une expérimentation *in vitro* ou *ex vivo*, mais nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux utilisés en optimisant le nombre d'animaux par lots. Nous mettrons en œuvre des méthodes pour limiter au maximum la douleur chez nos animaux, en utilisant des cages adaptées, en utilisant une anesthésie avant sacrifice et en surveillant quotidiennement les animaux afin de prendre rapidement des décisions d'exclusion d'animaux en souffrance.

Le projet prévoit la mise en place d'une intervention nutritionnelle chez le rat âgé (n= 180) afin de caractériser les effets de sources protéiques optimisées sur le maintien de la masse musculaire. In fine, l'étude proposée permettra l'élaboration d'une formulation protéique à teneur optimisée en protéines végétales afin d'améliorer l'anabolisme musculaire post-prandial et ainsi limiter la fonte musculaire liée à l'âge.

5179. Nos précédents travaux ont permis de mettre en évidence l'effet bénéfique d'une association de 5 extraits de végétaux sur le métabolisme de souris diabétiques, à travers différents paramètres mesurés, tels que la glycémie, les tests de tolérance à l'insuline ou à l'amidon, le profil lipidique sérique ou la composition corporelle. Toutefois, les mécanismes physiologiques qui sous-tendent ces adaptations positives restent à élucider. Ce projet propose ainsi de combiner différentes conditions qui permettent l'activation de certains mécanismes qui nous permettront de mettre en lumière ceux qui sont impliqués. La combinaison d'extraits de végétaux sera ainsi incorporée dans la nourriture des animaux sur une durée de 16 semaines. Le projet inclut 8 groupes de 12 souris saines. Les procédures réalisées sur les animaux (pesée, composition corporelle, injection d'insuline, mesure de la glycémie à jeun) sont pour la plupart non-invasives et réalisées sans anesthésie car elles n'engendrent qu'un état de stress minimal.

Seule une étape du projet implique pour certains animaux leur détention en cages calorimétriques pendant une durée de 48h. Le modèle de souris de souris saines nourries avec un régime riche en graisse permet de développer une obésité et une insulino-résistance particulièrement adaptés à l'étude d'un produit qui se placera dans une finalité de prévention de facteurs de risques du syndrome métabolique.

Une justification statistique prédictive du nombre d'animaux nécessaire par groupe a été établie à partir de travaux similaires réalisés sur le même modèle, un minimum de 12 animaux par groupe est ainsi nécessaire pour mettre en évidence un résultat statistiquement significatif. Ce projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3R, ainsi le nombre d'animaux utilisés est déterminé au minimum de la relevance statistique et une attention particulière sera prêtée au comportement des animaux par les expérimentateurs et la personne chargée du bien-être animal afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes de douleur chez l'animal, auquel cas ce dernier serait immédiatement sorti du protocole. Un nombre maximal de 96 souris saines seront utilisées pour ces travaux de recherche.

5180. La sclérose en plaque (SEP) est une maladie très invalidante, auto-immune et définie par la destruction de la gaine entourant le bras principal des neurones dans le système nerveux central. Des données préliminaires du laboratoire suggèrent un rôle protecteur de la molécule d'intérêt APRIL, membre de la superfamille des TNF, via sa fixation sur un type particulier de cellules de soutien des neurones, les astrocytes réactionnels.

Des expériences préliminaires ont montré que le modèle animal murin de la SEP, l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE), était plus sévère dans des souris génétiquement déficientes pour la molécule APRIL.

Dans un projet parallèle, nous souhaitons tester si l'injection d'APRIL recombinant (APRILrec.) par voie intraveineuse permet de diminuer la sévérité de l'EAE induite dans des souris C57Bl/6. Mais avant cela nous devons vérifier que notre molécule APRIL injectée par voie intraveineuse atteint bien sa cible : le système nerveux central.

Dans ce projet, on se propose donc d'étudier la biodistribution de la molécule APRIL radiomarquée à l'iode 125.

Pour cela nous utiliserons le modèle murin de SEP induite appelé EAE et bien décrit dans la littérature scientifique.

Nous avons à notre disposition une molécule APRIL recombinante marquée à l'iode 125 pour laquelle nous souhaitons effectuer une étude dynamique afin d'évaluer sa pharmacocinétique.

Nous prévoyons d'utiliser 21 souris : 15 souris EAE et 6 souris contrôles.

Respect de la règle des 3R : De nombreuses formes de molécules APRIL recombinantes ont été évaluées *in vitro* et seule la molécule présentant les meilleures caractéristiques a été conservée pour les évaluations *in vivo*. En outre, pour mettre en œuvre ce projet de recherche, nous utiliserons le nombre minimum mais suffisant d'individus pour permettre une analyse statistique des résultats. Les animaux seront hébergés en groupe avec un milieu enrichi. Enfin, la mise en œuvre de cette demande se fera en conformité avec la législation et les règles éthiques en vigueur relatives au bien-être animal et à la prise en charge de la douleur.

5181. Ce projet avait fait l'objet d'une autorisation de projet éthique pour un autre établissement utilisateur et a pour but de mettre en évidence les effets thérapeutiques de traitements viraux sur des animaux porteurs de tumeurs pulmonaires.

Il s'inscrit dans le domaine de la recherche préclinique, avec pour but de développer de nouveaux traitements contre certaines tumeurs.

100 souris seront utilisées pour ce projet afin de tester l'efficacité de deux nouveaux candidats thérapeutiques sur le développement d'une lignée tumorale se développant au niveau pulmonaire.

11 groupes d'animaux seront utilisés afin de mettre en évidence l'efficacité d'un traitement permettant de renforcer la réponse immunitaire face à la tumeur.

Les cellules tumorales seront injectées par voie intraveineuse au niveau de la queue.

Le protocole consistera à mettre en évidence sur des souris porteuses de tumeurs pulmonaire l'effet thérapeutique de traitements. Leur état de santé et leur poids constituent des indicateurs pertinents pour définir l'efficacité de ces traitements.

Les animaux seront observés quotidiennement pour s'assurer que leur état de santé n'est pas détérioré, et pesés 2 fois par semaine.

Les points limites de mise à mort pour raison éthique seront liés au poids de l'animal, à son état de santé afin d'éviter une souffrance de l'animal.

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

Ainsi, les effectifs des groupes ont été adaptés selon les expériences pratiquées. Ainsi pour les groupes fournissant l'information sur la croissance tumorale, 15 animaux par groupe constitue un minimum acceptable d'un point de vue scientifique tout en se conformant aux principes de réduction liés à l'éthique. Pour les études de culture cellulaire, 5 animaux par conditions sont utilisés.

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

5182. La réovirose est une maladie virale à transmission verticale provoquant des troubles locomoteurs importants et caractéristiques sur les poulets de chair. Les réovirus sont également suspectés de participer à des troubles digestifs. La maladie touche essentiellement les poulets de chair souche label ou conventionnelle.

La prévention de cette maladie repose sur une vaccination des reproducteurs à l'aide de vaccins vivants et inactivés.

Depuis 2011 sont apparus plusieurs cas de réovirose sur des poulets de chair, de souche label ou standard. De nombreuses analyses ont été effectuées mettant en évidence un nouveau réovirus non couvert par les vaccins utilisés sur le terrain.

Ce réovirus est apparu très pathogène, provoquant des épisodes cliniques importants sur la descendance des lots de reproducteurs affectés et entraînant également des retards de croissance sur des lots de poussins ayant été en contact avec les lots atteints dans le couvoir.

La mise au point d'un nouveau vaccin efficace contre ce virus permettrait d'enrayer sa diffusion.

Les essais prévus sur animaux sont ceux uniquement réalisables sur animaux, le test permettant de vérifier l'inactivation du principe actif viral du vaccin est réalisé sur des cultures cellulaires, ce qui permet d'éviter l'utilisation d'animaux.

Le nombre d'animaux utilisés pour chaque essai est celui exigé par la pharmacopée européenne.

Ces essais seront réalisés sur la poule domestique, il s'agit de l'espèce cible du vaccin, sensible au réovirus, permettant d'apporter les informations les plus pertinentes.

Un minimum de 148 animaux utilisés est prévu pour le développement, un maximum de 493 animaux est susceptible d'être utilisé selon la nécessité de reproduction de certaines procédures.

Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, les mesures suivantes sont appliquées :

- Respect des normes d'hébergement (taille des cages, densité etc.) spécifiées dans la réglementation française ;
- Application de conditions d'ambiance en accord avec l'âge et l'espèce (température, éclairage, hygrométrie) ;
- Fourniture d'eau et d'aliment (adapté aux besoins d'entretien ou de croissance des poulets) sans restriction ;
- Manipulation des poulets dans des box isolés prévus à cet effet par du personnel qualifié ;
- Mise en place d'un suivi clinique rapproché par le vétérinaire responsable de l'essai ;
- Mise en place d'une procédure d'évaluation des points limites spécifiques de la réovirose du poulet permettant d'euthanasier les animaux de façon anticipée.

5183. Les fumées de cigarette constituent le facteur environnemental majeur chez l'homme d'apparition de pathologies pulmonaires comme les bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO) consécutives à une exposition durant des années aux fumées de cigarette. En revanche, des expositions courtes à ces fumées provoquent une inflammation des voies aériennes et une hyperplasie des cellules à mucus. Il s'agit de ces caractéristiques que nous souhaitons étudier dans ce protocole court. Ce modèle qui dure moins de 5 jours est très intéressant car il utilise un facteur environnemental réaliste par rapport à l'homme, et permet d'obtenir une inflammation de type neutrophilique majoritairement, avec un remodelage des voies aériennes inférieures mais avec une hyperplasie des cellules à mucus qui est une caractéristique intéressante à étudier et absente des modèles déjà présents dans le laboratoire. La mise au point de ce modèle court permettra de définir les conditions d'exposition des souris aux fumées de cigarette pour une exposition chronique par la suite. Dans ce modèle il sera aussi très intéressant de déterminer si l'inflammation induite par les fumées de cigarette est réversible ou atténuée avec l'utilisation de glucocorticoïdes, les données

publiées étant divergentes sur cet aspect. Jusqu'à présent, nous n'avons pas trouvé les conditions permettant d'obtenir une inflammation au niveau pulmonaire, il s'agit donc ici de modifier les conditions d'exposition des souris pour obtenir une inflammation avec des polynucléaires neutrophiles.

Remplacement : Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle *in vitro* ou de culture cellulaire ne nous permet d'étudier les symptômes inflammatoires au niveau pulmonaire. De plus, la souris est déjà utilisée et bien étudiée dans les études d'inflammation au niveau respiratoire, du fait des similitudes avec la pathologie humaine.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés sera optimisé pour obtenir des résultats exploitables. En effet, 114 animaux au total seront utilisés afin de déterminer les conditions expérimentales permettant d'obtenir une inflammation des voies aériennes et les symptômes associés. De plus, les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter toute redondance dans cette mise au point

Raffinement : Le modèle utilisé ici n'engendre pas de douleur particulière. En cas d'observation de douleur, les souris recevront un traitement analgésique, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient mis à mort pour éviter toute souffrance. Enfin, le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux.

5184. L'olfaction est un des premiers sens à être utilisé pour localiser et évaluer un aliment. Puis, son association avec le goût forme une saveur qui est perçue lors de l'ingestion d'un aliment. L'olfaction, seule ou couplée au goût, influence le comportement alimentaire des individus notamment via la valeur hédonique des odorants (perception plaisante/déplaisante) et via des apprentissages olfactifs. Plusieurs études se sont intéressées aux effets d'expériences olfactives précoces sur le comportement alimentaire humain et animal (principalement chez les rongeurs). Néanmoins, peu d'études restreignent la période d'exposition olfactive (au cours de laquelle les apprentissages olfactifs vont se produire) à la période prénatale et les résultats de cette exposition sur le comportement alimentaire de la descendance varient selon les études. Les expériences olfactives prénatales représentent pourtant une méthode prometteuse afin d'orienter le comportement alimentaire des individus (améliorer l'acceptabilité d'aliments nouveaux ou faiblement attractifs). De plus, les odeurs sont capables d'influencer le bien-être des individus soit parce qu'elles leur rappellent une situation positive, soit parce qu'elles possèdent naturellement des propriétés apaisantes.

Ce projet vise à investiguer l'influence des odorants sur le comportement alimentaire et le bien-être d'individus y ayant été exposés en période prénatale. Il s'intéresse également aux mécanismes régissant la réception du signal odorant et son traitement au niveau du système olfactif. L'étude du comportement alimentaire inclut des mesures de préférences alimentaires, de quantités ingérées, de latences de consommation d'un aliment connu ou non, odorisé (avec l'odeur impliquée pendant l'exposition olfactive prénatale) ou non. Le bien-être animal pourra être amélioré si la réactivité émotionnelle des individus ayant été exposés à un odorant en période prénatale est diminuée en réponse à une situation stressante, en présence de l'odeur impliquée pendant l'exposition olfactive prénatale. L'étude du système olfactif est réalisée après l'euthanasie des individus et prélèvements des structures anatomiques d'intérêt. Un modèle rongeur est adapté à ce projet pour des raisons pratiques (contrôle des conditions d'odorisation, intervalle intergénérationnel court, fécondité élevée) et théoriques (nombreuses données bibliographiques disponibles sur son comportement, sa neuro-anatomie et sa physiologie). Un total de 1644 rats sera nécessaire pour mener ce projet, d'une durée de 5 ans. Ce projet nécessite une interaction *in utero* entre la mère et sa descendance pour évaluer les effets d'une exposition olfactive prénatale sur différents aspects de la biologie de la descendance. Ainsi, de trop nombreuses influences biologiques interviennent pour pouvoir se passer du modèle animal. Les effectifs sont déterminés au plus juste afin d'assurer des résultats statistiquement exploitables, en se basant sur la littérature et sur la variabilité interindividuelle attendue sur les variables mesurées. Il nous faut valider le fait que l'odorant (consommé par la rate gestante) passe bien dans le liquide amniotique mais pas dans le lait (exposition olfactive prénatale uniquement). Afin d'éviter tout stress et/ou douleur chez les femelles lors des prélèvements de lait, elles seront anesthésiées. Les animaux sont élevés en cages individuelles pour un suivi des consommations. Les cages sont enrichies avec des cubes en bois et sont également enrichies pour les femelles gestantes avec des copeaux de bois afin qu'elles constituent leur nid. De plus, les animaux sont plusieurs dans la même pièce ce qui autorise des communications sociales. Au sevrage, le transfert en cage individuelle se fait progressivement : les petits sont d'abord placés en groupe, sans leur mère, pendant 3 jours (transition) puis ils sont transférés en cage individuelle. Les effets de l'exposition olfactive prénatale sont évalués sur les rats, à j1-2 de vie, via des tests de motivation à atteindre l'odeur (perçue *in utero*) et des tests de choix entre cette odeur et un stimulus neutre. Pour éviter que les rats soient endormis par une tétée trop proche de ces tests, une séparation maternelle (d'une durée d'1 heure) est nécessaire. Dans ce cas, les rats d'une même portée sont maintenus ensemble pour réduire le stress, et sous une lampe chauffante pour leur confort thermique. Le rythme d'alimentation des mères et des jeunes rats (après sevrage) comporte une privation alimentaire de 6h en fin de phase éclairée d'un cycle jour/nuit pour homogénéiser la motivation alimentaire entre les individus avant les tests de consommation/préférence. L'effet sur ces animaux nocturnes est minimisé puisque la privation alimentaire survient pendant une phase éclairée où les animaux ne consomment que 10% de leur ration quotidienne. Enfin, l'aliment odorisé (considéré comme nouveau par l'animal) est d'abord présenté avec l'aliment standard afin d'assurer une transition alimentaire visant à réduire le stress.

5185. Les expositions professionnelles prédominantes qui peuvent affecter le travailleur de l'industrie nucléaire sont, l'inhalation et la blessure cutanée de façon aiguë ou subchronique selon le poste de travail considéré. L'uranium incorporé par l'individu se retrouve rapidement dans la circulation sanguine d'où il diffuse vers tout l'organisme pour être, pour une partie rapidement éliminé dans les urines et pour l'autre partie retenu en plus ou moins grande proportion au niveau d'organes majeurs avant d'être progressivement excrété par le rein (unique voie d'élimination de l'uranium). Des études biocinétiques ont montré que 50% de

l'uranium incorporé, est immédiatement éliminé durant les premières 24 heures alors que le reste, accumulé dans certains organes sera éliminé plus lentement (période biologique de l'uranium estimée à environ 100 jours). C'est essentiellement pendant ce temps de rétention que le radionucléide peut-être cytotoxique. En milieu professionnel, Le suivi médical réalisé sur un individu accidenté consiste à doser périodiquement l'uranium dans les urines (dans certains cas dans les fèces) et suivre en parallèlement certains paramètres biochimiques tels que les marqueurs cliniques associés à la fonction rénale. Ce suivi permet d'évaluer le degré de gravité d'une contamination interne par mesure directe de la concentration d'uranium présente dans les urines de 24 heures et d'y associer des analyses biochimiques ciblées sur des marqueurs spécifiques d'état pathologiques (néphrotoxicité). A contrario, Il s'avère inadapté au diagnostic des expositions à faibles doses et de surcroît incapables d'être prédictif d'effets biologiques à long terme. Pour mieux comprendre les mécanismes biologiques mis en œuvre lors d'une contamination aiguë à faible dose d'uranium (à court, moyen et long terme) sur différents systèmes métaboliques et physiologiques (en particulier rénal) et pallier à ce manque d'outils cliniques adaptés au domaine des faibles doses (par la mise en évidence des marqueurs biologiques prédictifs utilisables en situation post-accidentelle), ce projet expérimental a pour objectif de mimer sur un modèle de rongeur (le rat), une situation d'exposition professionnelle. Il s'agira, suite à une contamination aiguë à faible dose par l'uranium (temps zéro du protocole), de réaliser un suivi longitudinal de décorporation de l'uranium dans les urines mais aussi de réaliser un suivi à court, moyen et long terme des individus (9 mois post-exposition) par des analyses biochimiques, biologiques à larges spectres (urine et sang) et de réaliser un suivi clinique (pesées de l'animal et consommation associés à des tests comportementaux) dont l'objectif permettra de contrôler de l'état de santé physique et psychologique de l'animal. Des analyses biologiques à larges spectres du tissu rénal seront réalisées en fin de protocole.

De plus, ce modèle expérimental sera mis à profit par la cryoconservation d'autres tissus d'intérêt (sang, os, cerveau, foie, gonades, rate, cœur, artères...) qui pourront être utilisés ultérieurement dans le cadre d'études complémentaires. Ce protocole d'étude utilisera 120 rats (modèle usuellement utilisé en toxicologie). Il sera réalisé en deux périodes successives (2 cohortes de 60 animaux chacune). Le fait de travailler sur deux cohortes successives permet non seulement d'augmenter le nombre d'individus (et par conséquent la puissance statistique) mais aussi d'augmenter la robustesse et la pertinence des marqueurs observés (par la reproductibilité des résultats sur deux cohortes distincts). Les groupes expérimentaux seront répartis en 4 doses d'exposition croissantes avec un groupe contrôle de référence (non contaminé). L'utilisation d'un modèle animal se justifie ici pleinement car, l'étude de la réponse dynamique d'un organisme faiblement exposé se confronte à l'analyse d'effets subtils qui sont observés dans des systèmes complexes et finement régulés et dont l'amplitude des signaux mesurés restent proche du bruit de fond homéostatique. Il s'avère donc nécessaire de pouvoir étudier l'organisme dans sa globalité. Il est aussi nécessaire de travailler avec des effectifs de 20 individus par groupe expérimental car des études précédentes, réalisées à faibles doses d'uranium, ont révélé que les effets biologiques (non-toxiques) étaient suffisamment subtils pour ne pas être statistiquement significatifs lorsqu'on travaillait avec des cohortes d'effectif réduits. Ce protocole n'induera aucune souffrance des animaux. L'anesthésie gazeuse sera utilisée à chaque fois qu'un stress pourrait être infligé à l'animal (prélèvements biologiques).

5186. Les sources d'exposition aux faibles concentrations de substances chimiques sont multiples, d'origine naturelle ou générées par l'activité humaine. Le rein est l'un des principaux organes cibles de la toxicité induite du fait de ses fonctions de filtration, transport et réabsorption de substances chimiques. L'uranium et le fluor sont deux substances induisant une toxicité rénale d'origine naturelle ou générée par l'activité humaine. Bien que leurs effets toxiques sur le système rénal à forte dose soient bien documentés, les risques sanitaires lors d'exposition chronique à faible dose restent peu connus et leurs effets en faibles concentrations sur la fonctionnalité rénale restent controversés.

Des études récentes ont suggéré que les effets biologiques de l'uranium et du fluor ne seraient pas aussi délétères pour le système rénal lors d'expositions chroniques à de faibles concentrations comparé aux effets à fortes doses. L'objectif de ce projet est d'identifier des mécanismes d'adaptation qui pourraient être impliqués dans cette réponse lors d'une contamination chronique à faible dose de ces agents environnementaux habituellement néphrotoxiques : le fluor et l'uranium.

Pour ce faire, des études in vivo seront réalisées chez la souris C57BL/6J. Les animaux seront soumis à une exposition à de faibles doses d'uranium et /ou de fluor dans l'eau de boisson, et le but sera de regarder à l'aide d'étude biochimiques et histologiques si cela confère un effet protecteur ou non à l'organisme vis-à-vis d'une dose « challenge » plus fortement concentrée. Les doses utilisées lors de l'exposition chronique seront de faibles doses ne causant aucune altération de l'état général de l'animal. L'étude de la réponse adaptative (système antioxydant, inflammation, autophagie,...) à de faibles concentrations devrait permettre de combler le manque de connaissances expérimentales dans ce domaine afin de mieux évaluer le risque sanitaire lié à ces expositions chroniques.

Le projet se déroulera en 2 phases et nécessitera l'utilisation de 260 animaux au maximum:

- Déterminer la dose « challenge » aiguë de fluor et d'uranium nécessaire à l'induction d'une atteinte modérée de la fonction rénale: 14 groupes d'animaux (n=10)

- Mise en évidence de la réponse adaptative lors d'une exposition chronique à faible dose: 10 groupes d'animaux (n=12)

La conception de ce protocole répond aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement relatives à l'expérimentation animale. Le nombre de souris choisi pour ce protocole est déterminé d'un point de vue statistique afin d'exploiter les résultats obtenus. Des études in vitro sont également développées en parallèle afin d'étudier les mécanismes biologiques. Dans le contexte du bien-être animal, les animaux seront anesthésiés, prélevés et euthanasiés selon la réglementation en vigueur.

5187. Nous faisons face à un nombre croissant de maladies infectieuses émergentes et ré-émergentes pour lesquelles il n'existe pas ou peu d'options thérapeutiques. Par ailleurs de nombreuses intoxications et envenimations n'ont aujourd'hui pas de traitement.

De ce fait, le développement de nouvelles approches thérapeutiques est devenu un impératif de santé publique à l'échelon national et international.

L'entreprise est une société pharmaceutique dont le but est de développer des produits à base d'immunoglobulines, afin de traiter des pathologies orphelines de traitements.

Elle capitalise sur une plateforme technologique solide et reconnue permettant une réponse rapide aux situations épidémiques au travers du développement et de la production de traitements à usage humain, en développant, à partir d'un immunogène donné, les anticorps polyclonaux associés.

L'immunothérapie passive utilisant des immunoglobulines polyclonales spécifiques a déjà démontré son efficacité dans le domaine des maladies infectieuses, des intoxications et des envenimations; plusieurs publications visent actuellement à promouvoir leur plus large utilisation et fournissent des preuves de cette efficacité.

L'objectif de ce projet est de réaliser une production d'anticorps polyclonaux spécifiques contre des cibles virales et / ou toxiques. Pour cela des chevaux seront immunisés avec des immunogènes préalablement qualifiés en termes de sécurité et de qualité, permettant notamment de garantir la sécurité de leur utilisation chez l'animal et pour le manipulateur. Les plasmas récoltés en cours de protocole seront utilisés afin de purifier les immunoglobulines et d'en extraire des fragments, en condition standard dans un premier temps, afin d'assurer les phases de développement préclinique des produits, puis en condition BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication), afin de pouvoir tester son efficacité chez l'Homme. Ces fragments hautement purifiés pourront apporter une solution thérapeutique à des problématiques majeures de santé publiques.

Ce projet nécessite l'utilisation de 20 chevaux sur 5 ans. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats robustes.

Le cheval est l'animal producteur de référence dans le cadre de ces produits. La production d'anticorps polyclonaux n'est possible que par des moyens in-vivo. Aucune méthode alternative n'est aujourd'hui connue.

Les animaux sont hébergés en petits groupes et soignés quotidiennement par un personnel qualifié, avec une surveillance intensifiée, dans des conditions conformes à la réglementation et assurant leur bien-être. L'observation de signes cliniques de souffrance déclenche des soins spécifiques sur les conseils d'un vétérinaire.

5188. Les maladies neurodégénératives liées à l'âge constituent un des problèmes sociétaux majeurs du monde moderne. Ce problème a d'autant plus d'impact qu'il n'existe aucun traitement préventif ou curatif. Ces maladies sont souvent caractérisées par des troubles cognitifs dont la gravité est évolutive. Une des méthodes susceptibles d'atténuer ces troubles est celle de la stimulation cérébrale profonde (deep brain stimulation ou DBS). Elle est d'ailleurs utilisée comme traitement dans la maladie de Parkinson et certains désordres psychiatriques. Pourquoi a-t-elle un intérêt par rapport aux fonctions mnésiques? Ces fonctions impliquent, entre autres ; le cortex préfrontal et l'hippocampe. Nous avons découvert récemment chez le rat qu'une lésion de deux noyaux thalamiques appelés reuniens et rhomboïde accéléreraient l'oubli d'une information apprise (localisation d'une échappatoire dans une piscine de Morris). Ces deux noyaux sont de véritables « hub » dans la circulation de l'information entre le cortex préfrontal et l'hippocampe, avec lesquels ils sont bi-directionnellement connectés. Des données électrophysiologiques préliminaires (acquises dans un laboratoire partenaire) montrent que l'activation des noyaux reuniens et rhomboïde influence l'activité préfrontale et hippocampique. Ces deux structures ont un rôle crucial dans la consolidation et donc la persistance d'un souvenir. Ce sont ces observations qui nous ont conduits à essayer, chez le Rat, de prolonger la durée d'un souvenir en stimulant ces noyaux à différents moments d'un apprentissage spatial. L'objectif de ce projet est donc de déterminer si la durée d'un souvenir spatial qu'un rat oublie spontanément en quatre semaines peut être prolongée par l'intermédiaire d'une stimulation profonde des noyaux reuniens et rhomboïde. La stimulation sera appliquée avant les séances d'acquisition, pendant celles-ci ou après. Nous recherchons en effet la fenêtre idéale pour un maximum de bénéfice cognitif. Le nombre total de rats sera 126 pour 3 expériences (stimulation avant, pendant, ou après chaque séance d'apprentissage) et pour chaque expérience, 42 rats seront répartis en 3 groupes : i) rats opérés et stimulés (groupe 'DBS'), ii) rats opérés et non stimulés (groupe « sham-DBS ») et iii) rats « naïfs » non opérés. L'analyse statistique des données utilisera une ANOVA à 1 ou plusieurs facteurs et des tests post-hoc (Newman-Keuls) si nécessaire. Les conditions d'élevage et d'expériences prendront en compte la règle des « 3R » : réduire le nombre d'animaux avec 12 rats/groupe pour une puissance statistique suffisante à l'interprétation des données comportementales et raffiner, soit limiter au maximum le stress et l'angoisse des rats dans les procédures expérimentales par : i) l'habituation à l'expérimentateur/manipulation, ii) l'habituation à la procédure et dispositif du test comportemental, iii) l'enrichissement des cages (bâtons à ronger). En cas de succès, cette expérience nous conduira à essayer la stimulation cérébrale profonde des noyaux reuniens et rhomboïde du thalamus dans le cadre de modèles précliniques de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer.

5189. Les porcins (porcs et mini-porcs) sont régulièrement utilisés pour la recherche biomédicale, aussi bien dans le domaine de la santé humaine car ils présentent certaines similitudes avec l'homme, que de la santé animale (pour les porcs uniquement).

Ils sont notamment inclus dans des études de pharmacocinétique dont le but est de suivre la concentration d'un produit d'intérêt médical dans le sang au cours du temps.

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

L'enjeu de ce projet est donc la réalisation des études de pharmacocinétique, aussi bien chez les porcs que chez les mini-porcs, en administrant aux animaux un traitement à tester et en pratiquant ensuite des prélèvements sanguins, soit par ponction directe, soit en utilisant un cathéter intraveineux par lequel on peut aspirer du sang.

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement de reproduire la diffusion d'un produit dans le sang des animaux, il est indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier un produit.

Au maximum pour ce projet, nous prévoyons de réaliser la phase animale des études pharmacocinétiques de 60 produits au maximum, en 5 ans.

Chaque produit à tester fera l'objet d'une étude particulière. On calculera pour chaque étude le nombre d'animaux nécessaires, il sera toujours réduit au minimum, en tenant compte de la variabilité des résultats attendus. Par ailleurs des études préliminaires aux études de pharmacocinétiques pourront permettre des mises au point de la technique de pose des cathéters, de manière à l'adapter aux études ultérieures.

Au total, au maximum 800 animaux pourront être utilisés en 5 ans dans ce projet. Le mode d'administration des produits sera fonction du produit à tester mais toujours conforme aux recommandations en vigueur et aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les prélèvements sanguins seront toujours réduits au minimum. Ils pourront être réalisés par ponction avec une aiguille de la veine jugulaire. Cependant, comme sur les porcins les prises de sang sont peu aisées (contention délicate, veines difficiles d'accès car profondes et entourées de tissus graisseux), il sera possible pour éviter de trop multiplier les ponctions source de stress et de douleur de poser un cathéter intraveineux par lequel on pourra aspirer du sang et qui restera à demeure pendant toute la période des prélèvements sanguins. L'hébergement individuel pourra dans ce cas être requis afin d'éviter que les animaux ne s'arrachent leurs cathéters, une attention particulière sera alors portée au raffinement et à l'enrichissement du milieu pour éviter l'ennui : contact visuel et olfactif entre congénères, surface suffisante de l'hébergement, jouets,...

Au cours de ces études de pharmacocinétique, il est parfois nécessaire de faire des biopsies cutanées. La biopsie consiste à prélever un ou plusieurs échantillons de tissus cutanés sur animal afin d'effectuer des analyses complémentaires (suivi d'un marqueur biologique, histologie, concentration cutanée du principe actif). Pour le bien être de l'animal des analgésiques seront utilisés si besoin. Deux types de biopsie pourront être pratiqués, soit des biopsies punch soit des biopsies en "côte de melon".

Une ou plusieurs biopsies pourront être réalisées mais toujours en conformité aux recommandations en vigueur et aux bonnes pratiques vétérinaires.

Le nombre de biopsie par animal sera toujours réduit au minimum et sera évalué au cas par cas avant chaque étude.

5190. Le but du projet est d'évaluer l'effet de l'apport de vésicules extracellulaires (VE) issues de différents types cellulaires, sur la régénération tissulaire et vasculaire d'un tissu lésé par exposition aux rayonnements ionisants, dans un cadre à visée thérapeutique. L'objectif secondaire de ce projet vise à établir l'intérêt de mesurer les VE circulantes comme marqueurs d'efficacité thérapeutique après traitement.

La lésion tissulaire sera réalisée au niveau de la patte de l'animal anesthésié au préalable. L'administration des VE est faite localement au contour de la lésion ou par voie intraveineuse.

Pour évaluer cet effet dans des conditions physiologiques, nous sommes dans l'obligation d'utiliser un modèle in vivo. L'espèce choisie est la souris, modèle de référence pour les études précliniques. Des souris Nude (système immunitaire déficient) seront utilisées, autorisant la greffe de cellules humaines. Dans le but de tester la possibilité d'utiliser les VE comme outil thérapeutique et marqueur d'efficacité thérapeutique dans le contexte d'un système immunitaire normal, des souris C57BL/6JRj seront également employées. Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 2505.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale.

Différents paramètres fonctionnels (techniques non invasives) seront mesurés pour évaluer la régénération tissulaire et vasculaire, permettant ainsi d'estimer le bénéfice thérapeutique des VE en comparaison avec un traitement par injection de cellules souches mésenchymateuses. Les études moléculaires se feront sur les prélèvements réalisés sur l'animal anesthésié avant euthanasie.

5191. Les rongeurs sont régulièrement utilisés pour la recherche dans le domaine de la santé humaine. Ils sont notamment inclus dans des études réglementaires de toxicologie dont le but est d'évaluer la toxicité de nouvelles molécules mises en formulations sur l'animal afin de l'extrapoler chez l'homme.

En tant que sous-traitant de l'industrie pharmaceutique, nous proposons à nos clients de réaliser la phase expérimentale d'études permettant la détermination de la dose maximale tolérée, ce qui permettra de définir les doses qui seront ensuite utilisées dans les études réglementaires de toxicologie demandées par les autorités pour constituer les dossiers AMM.

Aucune méthode alternative ne permet actuellement de reproduire la réponse d'un être vivant suite à l'administration de nouveaux médicaments, c'est pour cela qu'il est indispensable de recourir à l'animal dans son intégralité.

Ce projet englobe plusieurs études et pour chacune le nombre d'animaux nécessaire sera calculé, il sera toujours réduit au minimum, en tenant compte de la variabilité des résultats attendus. Pour chaque étude, des groupes d'animaux recevront de façon séquentielle des doses croissantes de principe actif (une dose par groupe) jusqu'à apparition de signes cliniques.

En cas d'apparition de signes dès la première dose testée, des doses inférieures seront testées afin de déterminer la dose maximale tolérée sans apparition de signes cliniques.

Le mode d'administration des produits sera fonction du produit à tester mais toujours conforme aux recommandations en vigueur et aux bonnes pratiques vétérinaires.

Ce type de projet ne nécessitant pas d'hébergement individuel sauf si nécessaire, les animaux seront en collectivité avec un enrichissement du milieu adapté.

Les animaux seront étroitement observés sur des périodes prédéfinies dans chaque étude.

Des points limites seront préalablement définis avant la réalisation de chaque étude.
Au total, 3000 animaux pourront être utilisés en 5 ans dans ce projet.

5192. Le lien social entre mâles et femelles campagnols des champs a été utilisé comme modèle majeur pour l'étude des mécanismes proximaux de la monogamie chez les mammifères. Cependant, nous savons grâce à des études de terrain que les campagnols des champs ont une organisation sociale très flexible et vivent souvent en groupes polygames d'un mâle et plusieurs femelles. Il n'a jamais été testé si les liens sociaux dans de tels groupes polygames sont différents des liens sociaux dans des paires monogames.

Dans l'étude proposée, nous allons étudier le lien social chez la souris rayée d'Afrique, qui montre également un fort degré de flexibilité sociale. La souris rayée d'Afrique peut vivre solitairement mais forme souvent des groupes polygames, bien que la formation de couples se produise également. Le projet a les objectifs suivants:

- Mesurer le lien social dans des couples gardés monogames de souris rayée d'Afrique et comparer cela aux résultats publiés sur les campagnols des champs.
- Mesurer le lien social dans des groupes polygames et comparer cela au lien des couples monogames, notamment pour tester:
 - o Si les mâles gardés monogames sont plus liés à leur femelle que les mâles polygames à leurs femelles?
 - o Si les mâles gardés polygames sont identiquement liés à toutes les femelles, ou s'ils montrent une préférence significative pour une femelle?
- Mesurer les liens sociaux entre des membres adultes d'un groupe non reproducteur pour les deux sexes.

Au total, 360 individus seront sujets dans les études non invasives de préférence du partenaire (classe légère). Nous adhérons au principe des 3Rs :

Remplacer : Le comportement social peut-être étudié uniquement sur des animaux vivants.

Réduire : 360 animaux est le nombre optimal pour ce projet.

Raffiner : Pour le bien-être animal, les souris sont gardées en groupes sociaux et sous des conditions hautement enrichies, avec des jouets en bois et des nichoirs. De plus, les cages sont relativement larges, et chaque groupe familial a accès à deux cages connectées entre elles par un tube. Seulement une cage par semaine est nettoyée, de tel que les souris ont toujours accès à une cage familière et n'ont pas besoin d'être manipulées pour le nettoyage. Les animaux seront surveillés quotidiennement et plus particulièrement au moindre signe de souffrance, l'expérience sera arrêtée. Si des comportements agressifs sont observés, les animaux seront immédiatement séparés.

5193. La respiration est une fonction vitale qui, outre fournir l'oxygène nécessaire au corps, régule de nombreux processus physiologiques et neuronaux. Par exemple, les effets de la respiration sur le rythme cardiaque ne sont plus à démontrer et les techniques de respiration profonde sont bien connues pour diminuer l'anxiété et le stress. De plus, de par sa nature périodique, la respiration influence de façon rythmique les organes des sens et par là-même les rythmes du cerveau. Or, ces rythmes sont des éléments capitaux dans la perception de l'environnement, la mise en mémoire des informations et la production d'une réponse motrice adaptée. L'hypothèse proposée est que la respiration pourrait jouer le rôle d'horloge centrale permettant à des aires cérébrales éloignées de synchroniser leur activité et ainsi améliorer les processus sensoriels et cognitifs. Si cette horloge ne fonctionne plus (ou fonctionne mal), comme dans des pathologies telle que la maladie de parkinson, cela pourrait expliquer en partie la dégradation des fonctions cérébrales. L'hypothèse supplémentaire forte est de proposer que cette influence respiratoire « passerait par le nez », via les flux d'air circulant dans la cavité nasale lors des inspirations et expirations successives.

Cette étude se propose d'étudier comment ce flux d'air nasal, par sa présence et sa modulation liée aux changements de fréquence respiratoire, va influencer l'organisation fonctionnelle intrinsèque des réseaux cérébraux. Ces réseaux dits de repos (« resting state networks »), mis en évidence par l'étude des fluctuations spontanées et synchronisées du signal entre différentes structures cérébrales en l'absence de tout stimulus extérieur, font l'objet de nombreuses études chez l'Homme et leur altération est liée à de nombreuses pathologies neurologiques, psychiatriques et neurodégénératives. Grâce aux systèmes IRM spécialement adaptés à l'étude des petits animaux, ce type d'approche s'est développé chez les rongeurs et a permis de mettre en évidence des réseaux analogues à ceux de l'Homme. Ce projet, d'une durée de 3 ans, propose d'utiliser cette approche méthodologique chez le rat en s'appuyant sur un système permettant de reproduire et de contrôler le flux d'air nasal. En supprimant ou en modulant le passage de l'air dans la cavité nasale, cette étude cherchera à démontrer l'influence de ces paramètres respiratoires sur l'état et l'organisation fonctionnelle de ces réseaux cérébraux de repos.

Application de la règle des 3R et nombre d'animaux

Dans la mesure où ce projet consiste à étudier comment le flux d'air nasal peut moduler la structure des réseaux cérébraux, il n'est pas possible de travailler sur des préparations in vitro, comme des tranches ou des cultures cellulaires. Le modèle animal sera le rat anesthésié et 45 animaux seront utilisés pendant les trois années que durera ce projet. L'utilisation de l'imagerie cérébrale par IRM présente plusieurs avantages en vue de réduire le nombre d'animaux utilisés : d'une part, cette technique permet d'appréhender l'activité cérébrale dans l'ensemble des structures nerveuses au cours d'un seul enregistrement ; d'autre part, plusieurs conditions expérimentales (dans le projet proposé, plusieurs paramètres respiratoires) peuvent être testées sur un même animal. Les animaux sont donc leur propre témoin permettant ainsi de réduire le nombre total utilisé pour atteindre des résultats statistiquement valides. Enfin, comme le système olfactif est très conservé à travers les différentes espèces, les résultats de notre étude permettront de mieux extrapoler les résultats chez l'Homme. Un raffinement continu des pratiques d'expérimentation sera pratiqué. Les rats seront

hébergés dans des cages aux normes avec à disposition des formes d'enrichissement (nid végétal à base de fibres courtes de coton et igloo) afin de réduire le stress.

A travers la mise en évidence d'une influence des flux d'air liés à la respiration sur l'état des réseaux cérébraux, ce projet, au-delà de son aspect fondamental, pourrait avoir des retombées cliniques vis-à-vis des risques liés à l'absence ou à la perturbation du flux d'air nasal. En effet, si l'hypothèse du rôle d'horloge centrale jouée par le rythme respiratoire est validée, son dysfonctionnement entraînerait une perturbation des rythmes cérébraux et donc des fonctions qui y sont associées. Mais de manière inverse, la restauration de cette horloge via des méthodes de rééducation devrait compenser les déficits observés. Ainsi, les patients parkinsoniens présentent des déficits olfactifs qui seraient liés, en partie, à une dégradation du flux respiratoire. Or ces déficits peuvent être compensés via un entraînement basé sur la rééducation respiratoire. Outre les déficits moteurs, ces patients présentent également des déficits d'encodage du temps entraînant par exemple une perturbation dans la production ou la perception des rythmes. Basée sur l'hypothèse proposée dans ce projet, on peut prédire que respiration, rythmes cérébraux et fonctions cognitives sont fonctionnellement liés et que les fonctions cérébrales détériorées dans ce type de pathologie pourraient être améliorées par la réhabilitation du rythme respiratoire.

5194. 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, en absence de toute consommation d'alcool ou d'hépatite liée à une infection virale ou une maladie auto-immune. Elles sont, dans la majorité des cas, considérées comme une maladie bénigne du foie. Si la prévalence des NAFLD est de 25% dans la population mondiale, certains patients (~10-40% des personnes atteintes de NAFLD) développent 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. Dans les cas extrêmes, la NASH peut évoluer vers 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 dans cette indication précise.

L'objectif de ce projet est de caractériser des candidats médicaments présélectionnés dans des tests *in vitro* sur des critères d'efficacité sur les cibles d'intérêt dans des modèles animaux de NAFLD/NASH. Il existe différents modèles animaux de NAFLD/NASH présentant certaines physiopathologies communes à la pathologie observée chez l'homme : 1) les animaux présentant des mutations génétiques qui développent une stéatose hépatique n'évoluant pas ou peu en stéato-hépatite et 2) les 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.

Les études réalisées dans le cadre de ce projet 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), d'histologie ainsi que sur des paramètres métaboliques. L'effet potentiel d'un composé sur la stéato-hépatite sera testé dans un des modèles mis en place dans le laboratoire induit par un régime alimentaire et qui permet de reproduire 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. 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 que d'un suivi de prise alimentaire et hydrique régulier.

Dans le cadre de notre approche de recherche de nouvelles molécules, on estime à 60 animaux par étude et on pense réaliser 12 études par an, soit une prévision de 3600 souris pour toute la durée du projet (5 ans).

5195. Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation : des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une ré-intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : ISO 10993, Pharmacopées Nationales, lignes directrices (OCDE), directive 2007/47/CE), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Nous sommes fortement engagés dans le développement de méthodes alternatives *in vitro* : tests de cytotoxicité, test d'irritation *in vitro*, test de sensibilisation *in vitro*, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité,

en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'assurer de la sécurité et des performances des produits de santé sur des modèles animaux, les rongeurs, les lagomorphes, les petits ruminants ou les porcins sont des modèles privilégiés pour ce type d'étude étant données les similitudes reconnues avec l'organisme humain. L'utilisation du modèle canin est également envisageable dans des cas exceptionnels, mais elle reste très rare pour raison éthique.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). L'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur les cinq années du projet est de 2900 rats, 2500 lapins, 200 ovins, 200 porcins, 100 caprins, et 100 chiens.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les ruminants sont hébergés en groupes sociaux harmonieux et le plus souvent en extérieur hors période post-opératoire. Les rongeurs et porcins sont hébergés en groupes sociaux harmonieux sauf lorsque les contraintes de l'étude l'empêchent. Dans tous les cas, pour toutes les espèces sociales, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure du bien-être animal. Concernant les lagomorphes, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments. Des jouets sont disponibles pour les lagomorphes, les chiens et les porcins. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

Un comité d'éthique, une structure du bien-être animal et plusieurs vétérinaires sont intégrés aux équipes à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

5196. Les veaux de boucherie sont des animaux jeunes (moins de huit mois d'âge) élevés pour la production de viande à partir d'aliments d'allaitement et d'aliment fibreux. En conditions d'élevage, les veaux ne sont pas alimentés à volonté mais selon un plan de rationnement visant à atteindre un objectif de performances de croissance. Ainsi, la quantité d'aliment allouée par jour dépend des besoins énergétiques des animaux, qui sont généralement déterminés comme la somme des besoins correspondant à l'entretien et des besoins correspondant à la croissance. Un travail préliminaire a été réalisé afin de déterminer des équations de prédiction de ces besoins chez les veaux mâles de race Prim'Holstein. L'objectif du projet est d'adapter les équations développées chez les veaux de race Prim'Holstein à des veaux issus d'un croisement de race Prim'Holstein et de race Bleu Blanc Belge. Pour cela, 30 veaux mâles de race croisée et d'un poids moyen de 70 kg (10 animaux), 150 kg (10 animaux) et 230 kg (10 animaux) seront alimentés à 85 ou 95% du plan de référence appliqué en élevage pendant 2 semaines puis leurs performances de croissance et leurs besoins d'entretien et de croissance seront mesurés pendant une semaine.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de caractériser les besoins énergétiques des animaux en fonction de leurs performances de croissance. Réduction : nous avons choisi d'adapter les équations précédemment établies sur d'autres races plutôt que de déterminer de nouvelles équations à partir d'un dispositif expérimental complet et impliquant un plus grand nombre d'animaux (au moins le double). En outre, le nombre d'animaux et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin d'atteindre les objectifs du protocole. Raffinement : les mesures nécessitent de placer les animaux à l'intérieur d'enceintes. Les enceintes seront équipées de systèmes audio permettant aux animaux de s'entendre. De plus, les cages dans lesquelles seront hébergés les animaux seront équipées de tétines, constituant un élément manipulable.

5197. Ce projet a comme but principal de mettre en place un protocole pour étudier le comportement compulsif de prise de drogue à fin de mieux comprendre l'addiction aux drogues chez le rat. En effet, Il est admis que les drogues altèrent de façon durable le fonctionnement du cerveau, donnant lieu au développement de comportements compulsifs allant jusqu'à une perte de contrôle sur la prise malgré l'existence de conséquences néfastes associées à cette consommation. De façon générale, il a été montré chez l'Homme que les conséquences négatives liées à la prise de drogues sont l'une des raisons majeures de l'abstinence. De plus en plus dans la littérature scientifique on voit la mise en place des modèles animaux d'addiction qui essaient de mimer ces aspects de l'addiction en associant les injections de drogue à une punition physique consistant à un léger choc électrique délivré aux pattes des rongeurs. Ces modèles ont permis de mettre en évidence qu'après plusieurs semaines d'auto-administration de drogues une partie des animaux montre une compulsivité manifestée par la prise de drogue malgré le fait que celle-ci soit associée à une punition. Ce modèle servirait donc à départager les animaux qui développent une véritable addiction des animaux qui sont encore capable de contrôler leur comportement vis à vis des drogues. Néanmoins il est fondamental de mieux caractériser le comportement de recherche et de prise de drogue face à une punition afin de raffiner nos modèles d'addiction et de mieux comprendre les mécanismes neurobiologiques et comportementaux responsables de l'addiction. Le principal aspect innovateur de notre recherche est de donner aux animaux la possibilité de contrôler le niveau de punition qu'ils sont prêts à accepter pour continuer à prendre la drogue. Pour ceci nous allons mettre en place une procédure où après plusieurs semaines d'auto-administration nous allons alterner les sessions normales d'auto-administration avec des sessions dans lesquelles les injections de drogues seront associées à des punitions. Ces sessions seront signalées à l'animal par l'illumination d'une lumière dans la cage d'auto-administration afin qu'il puisse prédire la présence d'un risque. Les punitions consistent en des chocs électriques délivrés par des barreaux métalliques qui constituent le sol de cages d'auto-administration. Ces chocs seront très légers voir imperceptibles

pour les premières injections de cocaïne mais ils augmenteront progressivement en intensité si l'animal ne cesse pas de s'auto-administrer la drogue. Si l'animal ne produit aucune réponse de recherche de drogue pendant une période de 30 min, la lumière signalant le risque de choc sera éteinte et le niveau de choc sera diminué.

Pour mieux caractériser ce comportement nous allons tester : 1) si signaler ou pas la présence du choc a un effet sur la prise de drogue; 2) si la probabilité de choc a un effet sur la prise de drogue; 3) si le délai d'un choc a un effet sur la prise de drogue. Nous allons systématiquement comparer les effets du choc sur la drogue aux effets sur une récompense naturelle telle que la nourriture. Ces expériences se déroulent en 3 phases différentes.

La phase 1 correspond à la chirurgie pour l'implantation d'un cathéter dans la veine jugulaire des rats.

La phase 2 correspond à l'auto-administration (grâce à ce cathéter) d'une drogue.

La phase 3 correspond à l'auto-administration de drogue que l'on associe ou non avec une punition d'intensité croissante, représentée sous forme d'émission d'un choc électrique au niveau plantaire.

Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner). Ce type de recherche, visant à comprendre les bases d'une maladie psychiatrique telle que l'addiction, peut uniquement être menée sur un animal vivant (remplacer). Nous minimiserons le nombre d'animaux utilisés par des méthodes expérimentales validées et reproductibles. Et nous utiliserons des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA qui nous permettront de faire des comparaisons multiples et de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduire). Les animaux subissant une chirurgie seront traités pour de possibles douleurs post-opératoires et seront hébergés avec du matériel d'enrichissement (raffiner). Nous avons calculé que pour cette étude 1120 rats seront nécessaires pour obtenir des données qui soient analysables statistiquement.

Cette recherche est innovante et a le potentiel de fournir des informations critiques pour la compréhension de l'addiction, informations qui peuvent amener à une meilleure prise en charge de cette maladie chez l'Homme.

5198. Les patients traités par radiothérapie pour des cancers de la zone pelvienne développent pour 10 à 20% d'entre eux des effets secondaires (douleurs abdominales, diarrhées, hémorragies...) associés à un dysfonctionnement du tractus gastro-intestinal, et ce, plusieurs années après la fin du traitement. Ces complications chroniques modifient la qualité de vie des patients (inconfort intestinal et états dépressifs) et peuvent dans certains cas compromettre leur pronostic vital. Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace. Notre travail s'inscrit dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques combinées afin de réduire les effets toxiques de l'irradiation au niveau de la sphère digestive et ainsi d'optimiser les processus de réparation. Nos travaux expérimentaux et ceux réalisés chez les patients ont montré une action multiple des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) leur permettant d'induire un bénéfice thérapeutique significatif. Néanmoins, l'efficacité des CSM reste transitoire et partielle notamment sur la régénération et la sensibilisation de la muqueuse colique. L'étude proposée vise à analyser, chez le rat (Sprague Dawley), l'effet thérapeutique d'un traitement de CSM associé à l'administration de probiotiques, et ce, sur les dommages radio-induits du côlon, ainsi que sur les effets associés à ces dommages comme la douleur viscérale et les troubles affectifs (anxiété dépression). Dans un contexte, où les probiotiques auraient une action radio-protectrice, l'efficacité thérapeutique des CSM pourrait devenir optimale même après des irradiations à des doses élevées. Nous utiliserons un modèle d'irradiation colorectal à la dose de 29 Gy qui a été caractérisé au laboratoire comme reproduisant des altérations histologiques similaires à celles observées chez des patients traités par radiothérapie et souffrant de complications gastro-intestinales. Les CSM seront administrées par voie sanguine et les probiotiques par voie orale comme cela est effectué en clinique. Ce travail s'articulera en 3 parties : 1. La caractérisation des modalités d'injection des probiotiques (880 rats), 2. La démonstration d'une efficacité thérapeutique des probiotiques (960), 3. La potentialisation de l'efficacité thérapeutique des CSM par une co-administration de probiotiques (1620). Un suivi particulier des animaux sera assuré afin de limiter le plus possible leur souffrance. Dans le cadre d'un transfert clinique des CSM pour soigner des lésions radio-induites, l'association au traitement par CSM de probiotiques pourrait permettre 1) d'optimiser les propriétés de régénération et 2) de diminuer le coût lié à une thérapie cellulaire par une réduction du nombre d'injection de CSM.

5199. D'origine infectieuse ou liées à la consommation excessive d'alcool ou de régime alimentaire riche en graisses, les maladies du foie deviennent souvent chroniques avec un risque de développement de cancer du foie grave et préoccupant en termes de santé publique. Afin d'améliorer la connaissance de ces maladies, notre équipe se consacre à la caractérisation des facteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement et la régulation de ces maladies du foie que l'on appelle hépatites. Notre équipe a récemment obtenu des données qui suggèrent qu'une protéine impliquée dans le contrôle de la mort des cellules, la kinase RIPK1, serait essentielle dans la sensibilité des cellules du foie à plusieurs facteurs de mort à l'origine du processus pathologique. Nous avons aussi obtenu des résultats qui montrent l'importance d'une molécule nommée TNF dans l'induction de la mort des cellules du foie. Notre projet est d'étudier le rôle de cette molécule TNF dans l'hépatite en comparant le développement de la maladie induite par 2 molécules différentes, Jo2 et ConA, chez des souris normales et des souris n'exprimant pas la kinase RIPK1 dans les cellules du foie. Les événements étudiés ayant lieu dans les premières heures du développement de la maladie, les animaux seront traités pendant moins de 12h. Les organes prélevés seront analysés par différentes méthodes pour quantifier l'atteinte hépatique et l'avancée des processus de mort dans le foie. Le nombre de souris engagées dans ces expériences est évalué au nombre de 96, nous avons pensé ce protocole en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner » :

- Il faut noter qu'il n'existe aucun moyen de remplacer de telles études qui englobent l'ensemble de l'organisme dans sa réponse physiopathologique, et que seule l'expérimentation animale permet un suivi complet de la maladie depuis ses phases les plus précoces.

- Nous avons réduit le nombre de souris à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats ; et nous avons envisagé plusieurs mesures sur les échantillons prélevés au niveau des 2 organes touchés par la maladie pour ainsi récolter un maximum d'informations qui viendront compléter celles déjà obtenues.

- Nous avons raffiné le protocole en prenant soin de traiter les souris dans une pièce isolée de leurs congénères sur un temps court ne permettant pas le développement de douleur.

Ce travail permettra de préciser le rôle du TNF et de la molécule RIPK1 dans la mise en place de la maladie « hépatite » chez la souris. A terme, les données de ce travail pourraient permettre de développer de nouvelles stratégies de traitement des maladies du foie basées sur l'utilisation de nouveaux inhibiteurs pharmacologiques du TNF ou de la molécule RIPK1.

5200. La leishmaniose est une parasitose vectorielle transmise par la piqûre d'insectes infectés, les phlébotomes. Il existe une vingtaine d'espèces de *Leishmania* dans le monde, responsables de 1 à 2 millions de cas humains par an dans 98 pays, dont la France. Selon l'espèce, l'infection prend des formes cliniques différentes : leishmaniose cutanée, cutanéomuqueuse ou viscérale. La leishmaniose viscérale (LV) est mortelle en l'absence de traitement. Après la piqûre infectante, le parasite se multiplie dans les cellules phagocytaires et gagne la moelle osseuse, le foie, la rate, et les ganglions. La LV pose des problèmes thérapeutiques, chez l'homme comme chez le chien. Le traitement de 1ère intention chez l'homme en France, l'amphotéricine B liposomale (Ambisome®), est efficace dans plus de 90% des cas, mais ne s'administre que par voie intraveineuse, est très onéreux et possède une toxicité rénale. Dans les pays en voie de développement (Inde, Soudan, Brésil), où surviennent 90% des cas mondiaux, des traitements moins chers sont utilisés, mais posent des problèmes de résistances (dérivés de l'antimoine), de toxicité ou de tératogénéicité (miltefosine), imposant une contraception parfois compliquée à mettre en place. La recherche de nouvelles molécules de faible coût, peu toxiques et administrables si possible par voie orale sont donc un enjeu majeur.

Notre équipe travaille depuis 2010 sur la mise au point et l'évaluation d'analogues furanosidiques de synthèse, mimant des motifs sucrés présents à la surface des leishmanies. Ces motifs, absents de la membrane cellulaire des mammifères, en font une cible thérapeutique de choix, car spécifique. Nous avons montré récemment que certains dérivés octyl-galactofuranoses (octyl-Galf) présentaient une activité anti-leishmanienne très intéressante *in vitro*, similaire à celle de la miltefosine, et beaucoup moins toxique que cette dernière. Deux octyl-Galfs seront utilisés dans ce projet et seront testés « nus » ou incorporés dans des liposomes pour améliorer l'adressage dans les cellules cibles (macrophages des organes profonds). Ces deux molécules ont montré par ailleurs un effet immunomodulateur stimulant la réponse immunitaire anti-parasitaire des macrophages infectés *in vitro*. L'ensemble de ces effets doit maintenant être confirmé sur modèle *in vivo*, le modèle murin étant particulièrement bien connu dans le cadre de la leishmaniose viscérale.

Nous allons tester ces 4 traitements (G1, G2, liposomes G1 et liposomes G2) sur les deux espèces de leishmanies responsables de leishmaniose viscérale (*L. infantum* et *L. donovani*). Ces souches parasitaires isolées de patients infectés sont cultivées dans notre laboratoire qui dispose de pièces de cultures adaptées. Ces parasites ne sont pas disséminés dans l'environnement et ne présentent pas de danger pour l'homme par contact ou inhalation, leur cycle de vie naturel nécessitant une transmission par piqûre de phlébotome. Dans le modèle envisagé, les souris seront infectées par injection intrapéritonéale d'une dose de parasites. Ce modèle reproduit la LV humaine, avec dissémination des parasites vers les organes cibles profonds (foie, rate, moelle osseuse). Les animaux infectés ne sont pas dangereux pour l'environnement ni pour les personnels les manipulant (pas de transmission du parasite par contact, déjections, morsure).

Le projet est conçu en plusieurs étapes, dont la mise en œuvre dépendra des premiers résultats. Nous ferons tout d'abord quelques essais de biodistribution afin de sélectionner la voie d'injection des traitements. Puis nous testerons 4 doses différentes des 4 molécules (G1, G2, liposomes G1 et liposomes G2), sur les deux espèces parasitaires, afin de sélectionner la dose optimale. L'évaluation se fera par rapport à un traitement placebo (injection de sérum physiologique) ; chaque lot comprendra 5 souris. La suite des essais dépendra de ces premières expérimentations. Les molécules inefficaces seront abandonnées. Une seule espèce de leishmanies sera sélectionnée pour la suite. Si un traitement présente une efficacité, la dose optimale sera retenue pour un essai de plus grande envergure (10 souris par lot), contre un traitement de référence (Ambisome®), et par comparaison à un placebo. Tout résultat égal ou supérieur à l'Ambisome sera confirmé au cours d'un nouvel essai. Enfin, si un traitement est confirmé comme intéressant, il sera évalué sur des souris C57BL/6, dans le but de s'assurer de l'absence d'influence du fonds génétique. Au total, au maximum 442 souris seront utilisées, en fonction des succès des traitements.

Les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure l'élevage et le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation et la règle des 3R. De notre côté nous veillons à bien respecter la règle des 3R :

Remplacer : à ce stade du projet, la preuve *in vitro* a été faite et l'utilisation de modèles animaux reste inévitable pour s'assurer de l'action antiparasitaire sur les organes cibles profonds.

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable. Le projet est conçu en plusieurs phases et s'adaptera progressivement aux résultats obtenus, afin de réduire le nombre d'animaux au minimum.

Raffiner : Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'un enrichissement adapté. A noter qu'aux temps d'observation utilisés dans le protocole, l'infection est asymptomatique et ne génère aucune souffrance physique aux animaux, ni aucun signe visible d'infection.

Ce projet a été évalué très positivement par l'HCERES en 2016 (au cours de l'évaluation de notre unité INSERM).